# Développement d'une plateforme de production d'anticorps monoclonaux

François Laborde

▶ **To cite this version:**

François Laborde. Développement d'une plateforme de production d'anticorps monoclonaux. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-01104942

**HAL Id: dumas-01104942**

**https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01104942**

Submitted on 19 Jan 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Université Bordeaux 2 - Victor Segalen**

**U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

Année 2014 N°87

Thèse pour l'obtention du

**DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement

Par Laborde François

Né le 05/04/1988, à Pau

# Développement d'une plateforme de production d'anticorps monoclonaux

**Directeur de thèse**

Mr Sébastien Vilain

**Jury**

PRESIDENT : Mr Jean-Michel Mérillon - Professeur des Sciences végétales et des biotechnologies, Université Bordeaux 2

MEMBRES :

Mr Alain Decendit - Maitre de conférences des universités, Université Bordeaux 2

Mr Sébastien Vilain – Enseignant Chercheur, Institut polytechnique de Bordeaux – ENSTBB

# Remerciements

**A Monsieur Sébastien Vilain,**

Pour avoir accepté de prendre la responsabilité du poste de directeur de thèse, sa disponibilité, son enthousiasme et son soutien, pour m'avoir guidé tout au long de cette thèse, qu'il trouve ici l'expression de mes plus sincères remerciements et toute ma gratitude.

**A Monsieur Jean-Michel Mérillon,**

Pour me faire l'honneur de présider ce jury et pour m'avoir fait découvrir le domaine des biotechnologies, domaine dans lequel j'évolue aujourd'hui, qu'il accepte ma sincère reconnaissance.

**A Monsieur Alain Decendit,**

Pour avoir accepté d'être membre du jury, d'évaluer mon travail et m'avoir transmis sa passion pour la mycologie, qu'il reçoit tous mes remerciements.

**A mes amis,**

Que je remercie pour ces années d'études, au cours desquelles nous avons partagé les bancs d'amphis, les paillasses de TP, de nombreux fous rires et d'excellentes soirées.

**A ma famille,**

Pour m'avoir encouragé et soutenu tout au long de mes études et d'avoir toujours été présent pour moi, qu'elle accepte tous mes remerciements et toute ma gratitude.

**A Marion,**

Pour être resté à mes côtés durant ces neuf dernières années, dans les bons comme les mauvais moments, de m'avoir toujours soutenu, encouragé et aidé tout au long de mes études et ce jusqu'à ma thèse, qu'elle reçoit tous mes remerciement, ma gratitude et mon amour.

# Sommaire

Abréviation……5

Introduction ..... 7

A. Le tournant de l'industrie pharmaceutique ..... 7

B. Protéines recombinantes et anticorps monoclonaux ..... 9

1. Structures d'un anticorps ..... 10

2. Les mécanismes d'action des anticorps ..... 11

3. Définition des anticorps monoclonaux et polyclonaux ..... 11

C. Intérêt et challenge d'une plateforme de production ..... 12

Partie 1. Génération et sélection de la lignée clonale ..... 15

A. Généralités sur le procédé d'obtention des anticorps thérapeutiques ..... 15

B. Système d'expression ..... 16

1. La cellule hôte ..... 17

2. Vecteur d'expression ..... 23

C. Génération de la lignée cellulaire par transfection : intégration du vecteur d'expression dans la cellule hôte ..... 25

1. Préparation de la cellule hôte ..... 25

2. La transfection ..... 27

D. Sélection de la lignée cellulaire ..... 29

1. Méthode de criblage et de sélection clonale ..... 29

2. Les technologies alternatives pour le criblage et la sélection clonale ..... 32

E. Ingénierie génétique ..... 35

1. Ingénierie du vecteur d'expression ..... 35

2. Ingénierie des lignées cellulaire ..... 37

F. Elaboration de banques cellulaires ..... 39

Partie 2. Procédés de production ..... 40

A. Procédés de culture cellulaire ..... 40

1. Batch ..... 40
2. Fed-batch ..... 41
3. Chémostat ..... 43
4. Procédé en perfusion ..... 43
B. Milieux de cultures ..... 43
1. Composition des milieux de culture ..... 44
2. Milieux commerciaux ..... 45
3. Optimisation des milieux ..... 46
C. Systèmes de production à petite échelle ..... 50
Partie 3. Mise en place de la plateforme de production à grande échelle ..... 54
A. Bioréacteurs ..... 55
1. Culture en suspension ..... 55
2. Culture en adhérence ..... 59
3. Paramètres physico-chimiques des bioréacteurs ..... 63
4. Caractérisation des bioréacteurs ..... 68
B. Transfert d'échelle ..... 73
1. Principes généraux ..... 73
2. Problèmes rencontrés lors du transfert d'échelle ..... 73
3. Stratégies ..... 74
C. Extraction et purification des anticorps ..... 75
D. Caractérisation et validation ..... 76
E. Transfert des techniques sur site de production ..... 76
Partie 4. Production en système acellulaire ..... 77
Conclusion ..... 79
Annexe 1 ..... 82
Bibliographie ..... 84
Abstract ..... 90

# Abréviations

Acm : Anticorps monoclonal

ADCF : Animal Derived Component Free

ADN: Acide Désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ARE : AU-rich elements

ARN: Acide Ribonucléique

ARNm: ARN messager

ARNt: ARN de transfert

ATP : Adénosine Triphosphate

CD : Chimiquement définis

CDR : Complementary Determining Regions

CHO : Chinese Hamster Ovary

CMO : Contract Manufacturing Organization

DHFR : Dihydrofolate réductase

DO : Dissolved Oxygen

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tetraacétique

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FACS : Fluorescence Activated Cell Sorter

GdI : Gène d'intérêt

GdS : Gène de sélection

GFP : Green Fluorescent Protein

GHT : Glycine, Hypoxanthine et Thymidine

GS : Glutamine Synthetase

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

Ik : Echelle de Kolmogorov

IRES : Internal Ribosome Entry Site

Kla : Transfert d'oxygène

MSX : Méthionine sulfoximine

MTX : Méthotrexate

MPT : Modification post traductionelle

pcj : picogramme d'anticorps par cellule par jour

PID : Proportionnel Intégral Dérivé

Re : Reynolds

R&D : Recherche et Développement

RTD : Resistance temperature detectors

Scfv : Fragment d'anticorps contenant les régions variables de l'immunoglobuline

STR : Stirred Tank Reactor

UCOE : Ubiquitous Chromatin Opening Element

VCC : Viable Cells Concentration

# Introduction

## A. Le tournant de l'industrie pharmaceutique

L'industrie pharmaceutique a consacré la majeure partie du XXème siècle à développer des blockbusters. Ce terme désigne un médicament générant plus d'un milliard de dollars de chiffre d'affaires par an. Ces molécules thérapeutiques sont produites essentiellement par voie chimique. Parallèlement à ce mode de production, depuis les années 80, les industriels se sont intéressés aux biotechnologies, domaine de recherche visant à développer et produire des biomolécules thérapeutiques par voie biologique. Le déclin des ventes des molécules dites traditionnelles a positionné le secteur des biotechnologies comme le domaine leader de l'industrie pharmaceutique. Les biomolécules sont apparues comme des molécules providentielles dans de nombreux domaines thérapeutiques. Les ventes de ces molécules ont atteint les 71 milliards dollars en 2008, avec une progression de 12 % chaque année [1]. Certaines grandes firmes investissent des sommes colossales dans les biotechnologies. Ainsi l'acquisition de sociétés spécialisées a permis de renforcer le portfolio et d'augmenter le pipeline de ces groupes comme en témoigne : le rachat de Wyeth par Pfizer ($68 milliard), l'acquisition de Genentech par Roche ($46,8 milliard) ou encore le rachat de Genzyme par Sanofi ($20,1 milliard) [2]. A ce jour, parmi les dix molécules les plus vendues au monde, cinq sont produites par voie biologique (protéines recombinantes) dont trois sont des anticorps monoclonaux (voir Tableau 1).

L'engouement des industriels pour le marché des biomolécules, et particulièrement celui des anticorps monoclonaux, en fera probablement le marché le plus lucratif de la prochaine décennie.

**Tableau 1 : Les dix molécules thérapeutiques les plus vendues dans le monde en 2013 [3].**

| Produit thérapeutique | Molécule | Laboratoire | Classe thérapeutique | Part du marché mondial (%) |
|---|---|---|---|---|
| **Humira** | Adalimumab | Abbott | Immunosuppresseurs | 1,1 |
| **Seretide** | Fluticasone / Salmétérol | GSK | Antiasthmatiques | 1,1 |
| **Crestor** | Rosuvastatine | Astrazenaca | Anticholestérolémiants | 0,9 |
| **Enbrel** | Etanercept | Pfizer | Immunosuppresseurs | 0,9 |
| **Lantus** | Insuline | Sanofi | Antidiabétiques | 0,9 |
| **Nexium/Inexium** | Oméprazole | Astrazenaca | Antiulcéreux | 0,9 |
| **Abilify** | Aripiprazole | BMS/Otsuka | Neuroleptiques | 0,9 |
| **Remicade** | Infliximab | Merck&Co | Immunosuppresseurs | 0,9 |
| **Cymbalta** | Duloxetine | Lilly | Antidépresseurs | 0,7 |
| **Mabthera** | Rituximab | Roche | Antinéoplasiques | 0,7 |
| **Total** | | | | 9,1 |

Protéines recombinantes

Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux sont utilisés pour traiter de nombreuses pathologies telles les cancers, les maladies auto-immune ou encore les infections virales. En effet, depuis quelques années, leur intérêt en infectiologie est croissant du fait de l'observation de résistances aux antibiotiques et de l'émergence de nouveaux agents pathogènes pour lesquels aucun traitement n'est encore disponible.

Ces trois classes thérapeutiques représentent une part importante du marché mondial des médicaments (voir Tableau 2).

**Tableau 2 : Principales classes thérapeutiques en 2013 [3].**
(Classement ATC de niveau 3, en % du marché mondial)

| | |
|---|---|
| Antinéoplasiques | 4,3 % |
| Anti-TNF | 3,1 % |
| Anticholestérolémiants | 3,0 % |
| Antiulcéreux | 2,9 % |
| Insulines humaines | 2,7 % |
| Antipsychotiques | 2,4 % |
| Antiviraux HIV | 2,3 % |
| Antidépresseurs et stabilisateurs de l'humeur | 2,1 % |
| Antiépileptiques | 1,8 % |
| B2-stimulants + corticoïdes | 1,7 % |

Les investissements requis pour produire des molécules biologiques sont extrêmement lourds, mais le retour sur investissement est important : le prix de vente des anticorps monoclonaux s'élevait en moyenne à 8000 dollars le gramme en 2009 et entre 2000 et 20000 dollars le gramme pour les 15 principaux anticorps monoclonaux vendus [4]. La principale composante du coût de commercialisation d'un anticorps monoclonal correspond aux essais cliniques et aux échecs préalables qui n'ont jamais générés de recettes. Dans ce contexte économique favorable, de nombreux partenariats entre industrie pharmaceutique et entreprises privées de biotechnologies sont en cours. Les enjeux sont considérables car les avancées scientifiques et la maîtrise des processus de génie génétique ont permis la conception de molécules de plus en plus efficaces à des coûts avantageux. La perspective d'un marché prometteur est indéniable.

## B. Protéines recombinantes et anticorps monoclonaux

Une protéine recombinante est une protéine produite par une cellule dont le matériel génétique a été modifié génétiquement [5]. Les protéines recombinantes peuvent être purifiées et utilisées à des fins thérapeutiques, industrielles ou pour des activités de recherche. Les anticorps constituent les protéines recombinantes les plus utilisés [6]. Ce sont des molécules de nature protéique appartenant au système immunitaire. Ils sont utilisés pour neutraliser les agents pathogènes de manière spécifique. Cette spécificité est l'intérêt majeur de l'utilisation des anticorps.

## 1. Structures d'un anticorps

Les anticorps humains sont constitués de quatre chaînes de polypeptides : deux chaînes légères et deux chaînes lourdes formant un « Y » (voir Figure 1).

Les deux domaines de liaison à l'antigène sont formés par les bras de ce « Y », constitués d'une partie des chaînes lourdes et des chaînes légères.

Les parties constantes des chaînes lourdes interagissent pour former la queue du « Y », ou fragment Fc. Elles sont identiques pour tous les anticorps du même type. On parle de fragment constant. Cette région peut se fixer sur des récepteurs cellulaires.

Le domaine de liaison à l'antigène, appelé région du fragment variable ou Fab, est formé de 6 régions hypervariables, nommées CDR, pour « Complementary Determining Regions ». Chaque extrémité des chaînes lourdes et légères en porte trois. Les CDR caractérisent la spécificité de chaque anticorps. Les recombinaisons génétiques permettent de générer des anticorps aux régions CDR extrêmement variées, élargissant ainsi le champ d'action de la réponse immunitaire dans la reconnaissance des agents pathogènes [7].

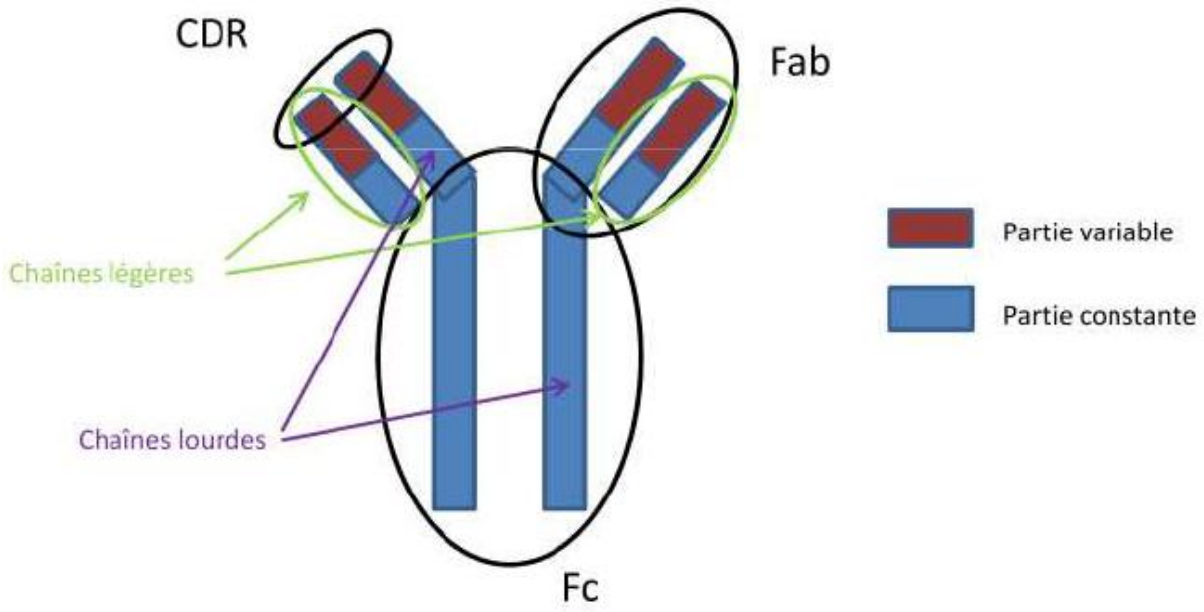



**Figure 1 : Schéma de la structure d'un anticorps humain [7].**

Les anticorps, également nommés immunoglobulines, sont subdivisés en classes ou isotypes. Selon la structure des domaines constants des chaînes lourdes, les chaînes γ, α, μ, ε et δ correspondent respectivement aux immunoglobulines IgG, IgA, IgM, IgE et IgD [8].

## 2. Les mécanismes d’action des anticorps

Les anticorps exercent leurs effets protecteurs via différents mécanismes.

Dans un premier temps, ils bloquent certaines molécules comme les facteurs de croissance, les cytokines ou les toxines dans les cas de maladies infectieuses, les empêchant ainsi de se fixer à leur cible. Ensuite, les anticorps exercent une action de neutralisation des agents pathogènes, comme les virus, en se fixant sur des récepteurs. Enfin, après avoir reconnu un antigène grâce à sa partie variable, un anticorps se lie à des cellules du système immunitaire par sa partie constante. Les anticorps fixés sur une bactérie peuvent se lier aux macrophages et déclencher une phagocytose ou l’activation du complément pour détruire des cellules cibles par perforation.

## 3. Définition des anticorps monoclonaux et polyclonaux

### a. • Anticorps polyclonaux :

Les anticorps polyclonaux sont un mélange hétérogène d’anticorps produits par des cellules différentes. La sensibilité et la spécificité de ces anticorps sont ainsi très différentes les unes des autres [9].

### b. • Anticorps monoclonaux :

Les anticorps monoclonaux sont des anticorps ne reconnaissant qu'un seul type d'épitope sur un antigène donné. Ils sont identiques et produits par une même cellule. Les anticorps monoclonaux sont très largement utilisés en biologie et en médecine, en tant qu’outils de diagnostic ou à des fin thérapeutiques. Les anticorps monoclonaux utilisés à titre de traitement médicamenteux ont une Dénomination Internationale Commune se terminant par « mab », acronyme de « monoclonal antibody ».

La faible durée de vie des plasmocytes, cellules sécrétrices d’anticorps, a été pendant longtemps un obstacle à la production d’anticorps monoclonaux *in vitro*. Les anticorps étaient alors obtenus *in vivo* après injection d’un antigène donné chez l'animal. Cette méthode coûteuse et peu fiable ne permettait de produire qu’une faible quantité d'anticorps, souvent contaminés par des impuretés.

En 1975, César Milstein et Georges Köhler ont développé la technique des hybridomes [10]. Il s’agit d’injecter l'antigène à un animal, qui après quelques semaines, subit un prélèvement des cellules de la rate. Ces cellules renferment les plasmocytes producteurs des anticorps dirigés contre l'antigène cible. Ces plasmocytes sont alors fusionnés *in vitro* avec des cellules

tumorales ayant la propriété de se multiplier indéfiniment : les myélomes. Les cellules hybrides obtenues (« hybridomes ») sont sélectionnées puis multipliées dans un milieu de culture approprié. Elles produisent ainsi des anticorps monoclonaux, purs et en quantités importantes.

Le génie génétique permet aujourd'hui de synthétiser des anticorps monoclonaux exploitables en phase clinique. Toutefois, la plupart de ces anticorps sont produits à partir de cellules de rongeurs (souris, rat, hamster, lapin), augmentant ainsi le risque de déclencher une réaction immunitaire chez le patient. Pour éviter cela, des anticorps chimériques « humanisés » sont produits par génie génétique en substituant les parties de l'anticorps de l'espèce d'origine par des fragments humains.

## C. Intérêt et challenge d'une plateforme de production

La production d'anticorps thérapeutiques est la dernière étape d'un long procédé commençant par la découverte, l'optimisation, l'expression, la purification et la caractérisation de la molécule. Les laboratoires universitaires ou les microentreprises à l'origine de la découverte de ces molécules ne disposent souvent pas des savoir-faire et des équipements pour optimiser les lignées cellulaires productrices, les procédés de production et les processus de purification de la molécule. Par conséquent, ils doivent soit vendre leur molécule aux industriels soit conclure un accord avec des « Contract Manufacturing Organization » (CMO), ces deux partenaires disposant eux des équipements nécessaires pour produire la molécule.

Le nombre croissant d'anticorps thérapeutiques en développement chez les compagnies pharmaceutiques a fait émerger la nécessité de développer des plateformes de production. Une plateforme de production d'anticorps monoclonaux maîtrise toutes les étapes permettant la production d'anticorps thérapeutiques à grande échelle. Ainsi, le temps de mise sur le marché et le coût de production de la molécule sont réduits, tout en maintenant le niveau de qualité exigé.

Un certain nombre de plateforme possèdent déjà un rendement très élevé (supérieur à 5 voir 10 g/L) [11]. Elles travaillent généralement à partir des cultures cellulaires de mammifères [12]. Depuis 1986, date de la mise sur le marché du premier anticorps monoclonal, la demande n'a cessé de croitre. Les capacités de production ont été revues à la hausse grâce à différentes stratégies : augmentation de la taille des sites de production et optimisation du

rendement des cultures cellulaires dans les bioréacteurs. Ainsi, les capacités de culture sont estimées à 4 millions de litres en 2013 alors qu'elles étaient de 2,3 millions en 2007 (voir Tableau 3), ce qui correspond à environ 100 tonnes d'anticorps produits [4].

**Tableau 3 : Capacités de culture estimées pour la production d'anticorps monoclonaux dérivés de cellules de mammifère [4].**

| Année | CMO (kL) | Laboratoires pharmaceutiques (kL) | Total (kL) |
|---|---|---|---|
| **2007** | 500 | 1800 | 2300 |
| **2010** | 700 | 2700 | 3400 |
| **2013** | 1000 | 3000 | 4000 |

Outre des capacités de culture importantes, une plateforme de production se doit de maîtriser parfaitement la production des protéines thérapeutiques.

La première phase dans la production d'anticorps monoclonaux est donc la génération et la sélection des lignées clonales productrices. Le R&D fournit en amont, un vecteur d'expression contenant la séquence de la molécule d'intérêt. Une cellule hôte est transfectée avec ce vecteur, de façon stable, générant ainsi des centaines de cellules clonales qui produiront l'anticorps. Une des étapes critiques est la sélection de la cellule clonale la plus performante.

La seconde phase vise la mise en œuvre des procédés de production afin d'optimiser la quantité d'anticorps produite. Si le coût de développement d'un médicament par voie chimique est onéreux (autour du milliard d'euros), celui des protéines recombinantes l'est plus encore, c'est pourquoi, il est essentiel d'optimiser le rendement des cellules productrices.

L'ultime phase consiste au transfert d'échelle des différents procédés évoqués, vers une plateforme de grande envergure. Le maintien des paramètres de production ainsi que la conservation des attributs de l'anticorps thérapeutique sont les principales contraintes de cette étape. Le transfert d'échelle peut modifier l'environnement dans lequel la cellule hôte est cultivée, impactant la qualité et la quantité de molécules produites. Ainsi chaque étape de

production est caractérisée puis validée afin de connaître son impact sur la molécule thérapeutique, conformément aux exigences réglementaires.

Par ailleurs, les capacités de production de la plateforme constituent un frein à la demande accrue d'anticorps. Pour pallier à ces difficultés de nombreuses sociétés ont aménagé des sites de production à grande échelle, nécessitant un transfert de tous les équipements, vers ces nouvelles zones pour les rendre opérationnelles.

Finalement, une plateforme se doit d'être flexible afin de convenir à un large panel de molécules, tout en respectant les exigences réglementaires en vigueur. Pour cela, chaque étape est rationalisée et pour certaines d'entre elles, mutualisées en regroupant les moyens, les savoirs et les savoir-faire.

# Partie 1. Génération et sélection de la lignée clonale

La plateforme de production entre en jeu une fois que le vecteur d'expression de la molécule d'intérêt est mis au point. Ces vecteurs sont généralement des plasmides (molécule d'ADN circulaire double brin, présente notamment chez les bactéries), dans lesquels sont intégrés des fragments d'ADN codant pour les protéines thérapeutiques. Ils sont transférés dans une cellule hôte possédant les mécanismes biologiques (transcription et traduction) permettant de produire la molécule d'intérêt.

Les étapes de génération et de sélection d'une lignée cellulaire clonale sont décisives puisqu'elles sont en grande partie, responsables des caractéristiques finales de la molécule et de son coût de production.

Tout d'abord, il est nécessaire de sélectionner la cellule hôte et les systèmes d'expression. Le choix de la cellule hôte doit être réfléchi afin de s'assurer que cet hôte possède les caractéristiques requises pour produire des anticorps thérapeutiques : stabilité, compatibilité aux transferts d'échelle, propriétés post-traductionnelles, élaboration d'un produit sain et viable pour le patient.

L'intégration du vecteur d'expression dans le génome de la cellule hôte s'effectue via les méthodes de transfections ; ces dernières doivent être peu délétères pour les cellules. La sélection de la cellule clonale la plus prometteuse est une étape capitale puisqu'elle permet de s'assurer de la monoclonalité des anticorps produits. Les caractéristiques attendues pour cette « cellule idéale » se résument à : productivité, stabilité, efficacité et qualité du produit.

## A. Généralités sur le procédé d'obtention des anticorps thérapeutiques

Dans un premier temps, il est nécessaire d'élaborer le vecteur d'expression contenant la séquence codante de l'anticorps thérapeutique.

Les chercheurs ont pour commencer, tenté de produire les anticorps monoclonaux à partir d'un procédé simple : générer *in vivo* un anticorps de spécificité désirée obtenu à partir d'organismes de souris, d'en produire *in vitro* une grande quantité, puis de l'injecter aux patients [13]. Malheureusement, ces essais cliniques ont rencontré deux problèmes majeurs.

D'une part, ces molécules d'origine murine étaient reconnues comme étrangères par le système immunitaire du patient, et par conséquent, rapidement détruites. D'autre part, elles n'induisaient aucune réponse thérapeutique car le fragment Fc, activateur de la réponse immunitaire n'était que faiblement reconnu par les cellules immunitaires humaines.
Finalement, c'est grâce au clonage de gènes, que les différentes chaînes d'anticorps ont pu être modifiées.
Aujourd'hui, la méthode privilégiée par les industriels est la technique dite du « phage display ». Dans les années 1990, l'équipe de G. Winter et de C. Barbas a cloné à partir de lymphocytes B de souris ou d'humains l'ensemble des gènes codant pour les anticorps afin d'exprimer ces derniers à la surface de particules phagiques [14]. Dans ce processus, la sélection des anticorps est effectuée *in vitro*, ce qui autorise une certaine liberté de « manœuvre » : variation de la quantité d'antigène à produire ou contre-sélection d'anticorps non désirés. Cette méthode a permis d'obtenir des anticorps dirigés contre des protéines spécifiques comme les toxines bactériennes ou d'envisager la sélection d'anticorps contre des cellules malades, comme les cellules cancéreuses. Surtout, elle a permis via la sélection de protéines humanisées, de simplifier grandement l'obtention d'anticorps non immunogènes pour le corps humain.

Développée en amont, une séquence codante de l'anticorps est par la suite associée à un système d'expression afin de l'insérer dans une cellule hôte et l'exprimer.

## B. Système d'expression

Aujourd'hui, les procédés basés sur les systèmes d'expression correspondent aux techniques les plus couramment utilisées pour développer des lignées cellulaires hautement productrices.

Un système d'expression combine :

- le vecteur d'expression, contenant la séquence codante de l'anticorps ou gène d'intérêt (GdI) et le système de sélection ou gène de sélection (GdS)
- la cellule hôte, dont le rôle est d'intégrer le vecteur d'expression.

Cette technologie permet au terme de la sélection d'obtenir une lignée cellulaire clonale à haut rendement.

## 1. La cellule hôte

Il existe de nombreuses cellules hôtes pouvant intégrer le vecteur mais toutes ne possèdent pas les caractéristiques nécessaires pour la production d'anticorps monoclonaux. Ces derniers sont des molécules complexes qui exigent des mécanismes bien particuliers pour leur élaboration.

Une cellule hôte doit être capable :

- de maintenir une stabilité et une expression élevée de la protéine sur une longue période.
- de s'adapter aux différents procédés de cultures cellulaires ainsi qu'aux transferts d'échelles.
- d'assurer des modifications post-traductionnelles (MPT). Les MPT consistent en une modification chimique, le plus souvent enzymatique, d'une protéine, après sa synthèse dans la cellule ; par exemple l'addition d'un groupe acétyl. Les anticorps thérapeutiques recombinants nécessitent des MPT afin d'assurer leur activité biologique dans le corps humain. Il est nécessaire que la nature des MPT des anticorps recombinants soit régulièrement analysée durant le développement de la plateforme.

La sélection de la cellule hôte est une étape de grande importance qui a un impact significatif sur tout le processus de production de l'anticorps.

### a. Hôtes procaryotes

Les cellules procaryotes disposent de nombreux avantages face aux cellules eucaryotes :

– temps de génération plus court.
– facilité dans la mise en œuvre des manipulations génétiques.
– robustesse des populations cellulaires lors des cultures.
– faible coût de production.

#### ❖ *Bactérie à Gram négatif*

*Escherichia coli (E. coli)* est le système de production le plus communément utilisé pour la production de protéines recombinantes. Elle atteint des rendements très élevés. Parmi le panel des cellules hôtes, *E. coli* est surtout utilisée pour produire des fragments d'anticorps qui seront sécrétés dans son périplasme (exemple : fragments Fabs).

Les bactéries *Bacillus brevis, Bacillus subtilis* et *Bacillus megaterium* sont également exploitées pour la synthèse de fragments d'anticorps. Deux souches lactobacillus sont utilisées pour la production du fragment scFv : *Lactobacillus zeae / casei et Lactobacillus paracasei* [15].

- ***Bactéries à Gram positif***

Les bactéries Gram positif ont la particularité de secréter les protéines dans le milieu extérieur, ce qui facilite la purification de la culture.

Par contre, les bactéries procaryotes, qu'elles soient Gram négatif ou positif, ne disposent pas des mécanismes biologiques nécessaires pour réaliser les MPT compatibles chez l'homme. Par conséquent, les protéines recombinantes produites risquent d'avoir une activité biologique ainsi qu'une stabilité limitée tandis que leur effet immunogénique sera élevé.

**b. Hôtes eucaryotes**

Les cellules eucaryotes sont dotées des mécanismes biologiques faisant défaut aux cellules procaryotes : MPT, repliement des protéines et sécrétion d'immunoglobulines complètes.

Des champignons filamenteux comme *Aspergillus niger*, des protozoaires ou encore des cellules d'insectes sont des hôtes potentiels et font l'objet de nombreuses recherches.

- ***Les plantes transgéniques***

Les plantes transgéniques peuvent être utilisées pour la production de molécules thérapeutiques car elles répondent à plusieurs critères recherchés : machinerie cellulaire complexe, absences d'agents pathogènes couramment associés aux infections humaines, faible coût de la biomasse. Cependant, les cellules hôtes issues plantes ne sont pas sans défauts car elles produisent des molécules dont la glycosylation n'est pas toujours compatible avec une application thérapeutique chez l'homme. Les N-glycanes des végétaux sont fortement immunogènes. De nombreux travaux sont actuellement en cours afin de modifier la machinerie cellulaires des plantes et d'aboutir à la production de glycanes complètement humanisés [16].

- ***Les animaux transgéniques***

Les animaux transgéniques représentent une alternative à la synthèse des protéines recombinantes, correctement glycosylées et repliées. L'efficacité de ce système de production est largement documentée puisque de nombreuses protéines recombinantes ont déjà été produites dans le lait d'animaux transgéniques [17]. Néanmoins, ce système présente des

limites : certaines molécules comme les anticorps risquent de perturber le métabolisme de l'animal. D'autre part, un doute persiste en ce qui concerne les risques de contamination par des agents pathogènes transmissibles à l'homme.

- ***Levures***

Les levures combinent certains avantages des cellules eucaryotes et des cellules procaryotes, à savoir croissance accélérée et robustesse. Les levures sont d'ailleurs utilisées depuis des millénaires comme auxiliaire dans la production alimentaire, puisqu'elles ne produisent pas d'endotoxines ; elles sont dotées du statut « GRAS » (Generally Recognized As Safe).

*Pichia pastoris* est la souche de levure la plus utilisée pour la production d'anticorps recombinants. D'autres souches comme *Saccharomyces cerevisiae, Hansenula polymorpha, Schizosaccharomyces pombe, Schwanniomyces occidentalis, Kluyveromyces lactis,* et *Yarrowiali polytica* sont également utilisées pour la production de protéines mais de façon moins importante [15].

Aujourd'hui, les levures sont principalement utilisées pour la production de fragment d'anticorps et non pour la production d'anticorps complet. Leur incapacité à sécréter de grandes protéines (> 30 kDa), la protéolyse qu'elles exercent durant les fermentations à haute densité cellulaire et leur glycosylation inadéquate des protéines constituent de sérieux freins à leur utilisation dans la production d'anticorps complet. Une solution peut alors être apportée pour limiter ces obstacles : l'ingénierie des lignées cellulaires.

- ***Cellules de mammifères***

De nos jours, 60 à 70% des protéines recombinantes et 95% des anticorps thérapeutiques sur le marché sont produits à partir de cellules de mammifères [15]. Malgré leur coût de production élevé et la difficulté à les manipuler, les cellules mammifères produisent des anticorps relativement peu différenciables de ceux sécrétés par le corps humain, diminuant ainsi les effets immunogéniques. De plus, ces cellules sont capables de sécréter des anticorps de haute masse moléculaire. Il résulte finalement de l'utilisation de ces cellules une synthèse d'anticorps thérapeutiques de haute qualité associée à une réduction du temps et du coût des procédés de purification.

Le risque de contamination par des agents pathogènes comme l'encéphalopathie spongiforme bovine (TSE/BSE) a été éliminé par la mise en place de procédures strictes « Good Manufacturing Practices » (GMP) relatives à l'origine et la composition des milieux de cultures.

En 2004, une production en IgG allant jusqu'à 5 g/L a été relevée à partir de cellules hôte de mammifères [18]. Aujourd'hui, la production industrielle a dépassé les 12 g/L d'anticorps. Ces résultats témoignent des progrès constants réalisés dans les procédés de cultures cellulaires. Cette amélioration est principalement liée aux innovations en matière de lignées cellulaires hôtes, milieux de cultures et procédés de production à haute densité cellulaire.

Une concentration maximale de 27 g/L à partir d'une lignée cellulaire de rétine embryonnaire humaine Per.C6 a été rapportée [15]. La productivité à partir de cellules de mammifères a augmenté de 10 pcj (pour pg d'anticorps par cellule par jour) en 1986 jusqu'à 90 pcj en 2004. Aujourd'hui, les titres en anticorps excèdent de peu les 100 pcj ; cette faible augmentation est due à une diminution du pic de densité cellulaire dès lors que la productivité cellulaire devient trop importante.

Les cellules des ovaires de hamster chinois (CHO) sont les cellules hôtes les plus utilisées pour la production de protéines recombinantes thérapeutiques. Cette lignée cellulaire, isolée dans les années 50, a donné une vaste gamme de lignées génétiquement différentes (CHO K1, CHO DukX B11, CHO DG44, etc) avec une productivité et une caractéristique des produits synthétisés spécifiques à chacune d'entre-elles. Parmi les autres lignées cellulaires utilisées pour la production de protéines recombinantes, on peut citer les lignées issues de souris NS0 et SP2/0, de rein de hamster (BHK), d'hybridomes ou encore la lignée Per.C6.

- Les cellules NS0 et SP2/0

Ces lignées cellulaires sont des cellules B immortelles issues de plasmocytes de souris sécrétant des IgG. Leur usage est exclusivement réservé à la production d'anticorps monoclonaux dont plusieurs sont déjà sur le marché (voir Tableau 4).

**Tableau 4: Commercialisation d'anticorps produits à partir des différentes cellules hôtes [28].**

| CHO | NS0 | Sp2/0 | Murine hybridomas |
|---|---|---|---|
| Avastin, Campath, Herceptin, Humira, Rituxan, Vectivbix, Xolair, Zevalin | Mylotarg, Soliris, Synagis, Tysabri, Zenepax | Erbitux, Remicade, Reopro, Simulect | Bexaar, Othoclone |

Ces cellules sont assez résistantes pour être exploitées dans des procédés à grande échelle (jusqu'à 20000 L).

Cependant les NS0 présentent quelques inconvénients qui compliquent leur culture. Contrairement à la plupart des lignées de cellules mammifères, ces cellules se développent rarement dans des milieux exempts de cholestérol. Ce cholestérol exogène provient de sérum d'origine animale. Or aujourd'hui les autorités réglementaires recommandent des milieux sans protéines d'origine animale afin de limiter les risques de contamination par des virus ou des prions.

D'autre part, il existe un écart entre le ratio de distribution des glycosylations des IgG produites par les lignées NS0 et SP2/0 et celui des IgG humaines [19]. En effet, même si les glycosylations sont peu différentes de celles effectuées chez l'humain, ces différences peuvent tout de même impacter sur la pharmacocinétique, la demi-vie et sur l'activité de l'anticorps. Une lignée NS0 a été développée pour être associée au système d'expression glutamine synthetase (GS) régulièrement utilisé par les industriels.

- Les cellules Per.C6

Les cellules Per.C6 correspond à une technologie relativement récente. Celles-ci sont issues de cellules embryonnaires dérivées de la rétine humaine rendues immortelles par transfection des gènes E1, issus de l'adénovirus ADN-5 [11].

Cette lignée cellulaire peut être cultivée en suspension sans ajout de sérum animal.

- Les cellules CHO

Parmi les nombreuses cellules hôtes disponibles sur le marché, les cellules CHO sont actuellement les plus répandues pour la production des protéines recombinantes (environ 70%). Cette lignée est issue de prélèvements cellulaires d'ovaires de hamsters chinois en 1957 [19]. Elles présentent de nombreux intérêts pour les sociétés pharmaceutiques :

- croissance : les cellules CHO peuvent atteindre des hautes VCC (pour « Viable Cells Concentration »).
- productivité : les titres en anticorps peuvent excéder les 10 g/L [20].
- possibilité de culture en suspension dans des milieux exempts de sérum animal.
- résistance des cellules et adaptabilité aux transferts d'échelles et aux changements d'environnements.
- association à des systèmes de sélection efficace.
- similitudes des MPT : le profil des MPT des protéines issues des cellules CHO est relativement identique à celui des protéines produites par le corps humain et entraine donc peu d'effets immunogènes chez l'être humain. Les glycosylations qui

correspondent aux MPT les plus couramment réalisées sur les anticorps sont généralement les glycosylations G0F, G1F et G2F (voir Figure 2). La glycosylation mannose-5 [20] est étroitement surveillée puisqu'un pourcentage élevé de celle-ci est réputé pour augmenter l'effet immunogénique et diminuer l'efficacité du produit. Voici un exemple de profil classique de glycosylation :

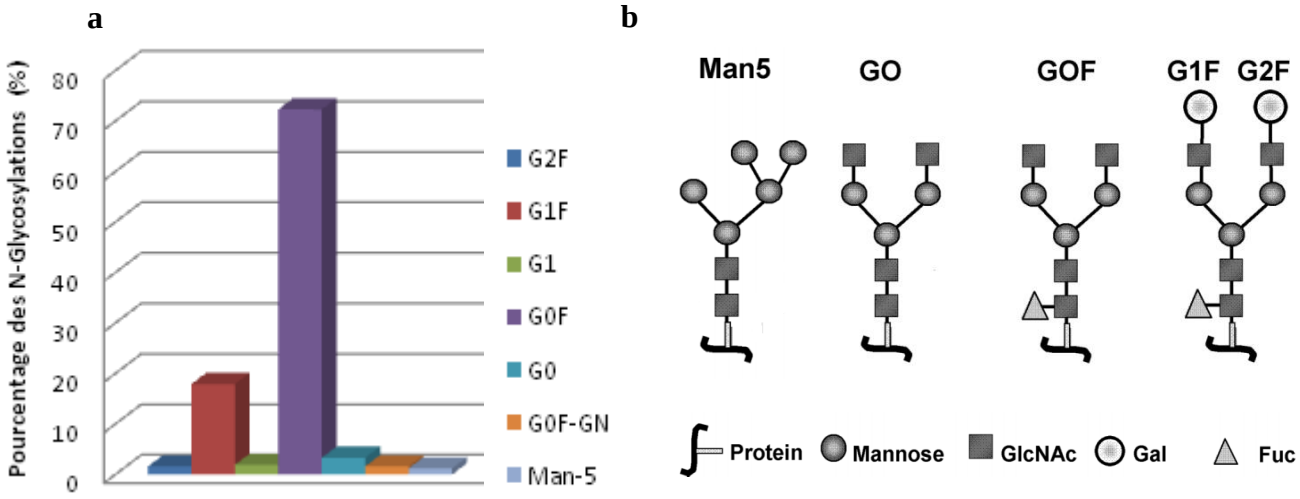



**Figure 2: a : Profil classique de glycosylations effectuées par les cellules CHO ; b : Structure des principales glycosylations présentes sur les anticorps [20].**

Ces cellules sont exploitées depuis plus de 50 ans et leur génome a été intégralement séquencé [21]. De ce fait, la manipulation des cellules CHO est un domaine d'expertise parfaitement maîtrisé par les industriels. Ils ont une connaissance pointue de la physiologie de ces cellules, de leurs métabolismes, des impuretés produites, des éléments nutritifs favorisant leur croissance ou à l'inverse de ceux qui la freine. Les agences réglementaires reconnaissent également les nombreuses qualités des cellules CHO et leur usage dans la production des protéines thérapeutiques, c'est pourquoi l'obtention d'autorisation de mise sur le marché (AMM) est souvent facilitée.

Dans le milieu des années 80, ces cellules ont été génétiquement modifiées afin de donner naissance à plusieurs lignées, qui sont largement exploitées aujourd'hui : les lignées DUKX-B11 et DG44, associées au système de sélection basé sur la dihydrofolate réductase (DHFR) et les lignées CHO-K1 et CHOK1SV, liées au système de sélection basé sur la GS [22]. Ces différentes lignées sont stables et sont capables de maintenir une expression élevée et durable en protéines recombinantes.

Plusieurs lignées cellulaires issues de cellules mammifères ont fournis des résultats probants concernant la production d'anticorps monoclonaux mais les cellules CHO restent de loin les hôtes privilégiés des industries pharmaceutiques.

### c. Banques cellulaires

Les banques cellulaires sont des centres de dépôts, nationaux ou internationaux, pour tous les types de micro-organismes. Elles sont utilisées aussi bien par les industriels que par la recherche académique. Leur but est de se procurer du matériel biologique authentifié, référencé et caractérisé qui permettra de répondre aux exigences des organismes de contrôle concernant la provenance des lignées cellulaires.

Les lignées issues de banques cellulaires sont garanties sans cross-contamination intra et inter-espèces.

L'acquisition des lignées cellulaires auprès de centres de dépôts agrées est un pré requis au développement de plateforme de culture cellulaire.

Les banques ECACC et ATCC sont les plus connues pour le recueil de cellules animales :

- ECACC : European Collection of Cell Cultures, créée en 1984.
- ATCC : American Type Culture Collection, créée en 1914.

La conservation des cellules sur le long terme s'effectue principalement par cryopréservation dans de l'azote liquide (-196°C) ou à -80°C [23]. La cryopréservation est indispensable afin de limiter les risques de contamination et les dérives génétiques (avec la perte des caractéristiques uniques) rencontrés lors de générations cellulaires successives.

## 2. Vecteur d'expression

Les vecteurs d'expression utilisés sont généralement des plasmides linéarisés (voir Figure 3) contenant des fragments d'ADN clonés codant pour l'anticorps ainsi que des fragments codant pour le système de sélection. D'autres séquences d'ADN sont intégrées dans le vecteur afin d'assurer une bonne intégration dans le génome de l'hôte, une transcription efficace des gènes d'intérêt (promoteur) mais également pour garantir la stabilité de l'ARNm (séquence polyadénylée).

**Figure 3 : Illustration simplifiée d'un vecteur d'expression pour la production de protéines recombinantes. Il comprend respectivement le promoteur, le gène d'intérêt (GdI), le gène de sélection (GdS) et la séquence polyadénylée.**

Les systèmes de sélection sont des outils qui permettent la sélection des cellules ayant intégrées le vecteur (par exemple, insérer un gène qui confère une résistance aux antibiotiques). Ils apportent le matériel génétique indispensable à la survie post transfectionnelle des cellules.

Les systèmes de sélection les plus couramment utilisés pour produire les anticorps monoclonaux sont ceux de la GS et de la DHFR [15]. Ces deux systèmes présentent généralement des promoteurs forts garantissant une meilleure expression des gènes de l'anticorps. Le promoteur est le plus souvent d'origine virale (par exemple, le cytomegalovirus), mais il peut être également issu de gènes hautement exprimés dans les cellules mammifères [22].

Les vecteurs d'expression peuvent également intégrer des séquences favorisant le transport de la molécule vers le cytoplasme ou induisant des repliements de la protéine.

### a. Système d'expression DHFR

Le méthotrexate (MTX), analogue de l'acide folique, est un inhibiteur non spécifique de la dihydrofolate réductase, enzyme présente dans les cellules CHO, dans les cellules bactériennes et les cellules cancéreuses [24].

L'inhibition de la DHFR empêche la réduction de l'acide folique (précurseur inactif), en acide tétrahydrofolique puis en acide folinique biologiquement actif, ayant pour effet final un blocage de la synthèse des bases puriques (adénine et guanine), et d'une base pyrimidique, la thymidine. Dans ces circonstances, la synthèse de l'ADN est inhibée et la cellule meurt [25].

Les lignées DUKX-B11 et DG44 sont associées au système de sélection basé sur la dihydrofoloate réductase. Elles se caractérisent par leur déficience en DHFR. Les cellules dépourvues de DHFR requièrent l'ajout de glycine, d'hypoxanthine et de thymidine (GHT) dans leur milieu de culture pour survivre. Dans un milieu dépourvu de GHT, seules les cellules ayant intégrées le vecteur d'expression peuvent survivre. La présence de la DHFR et

d'une copie du gène d'intérêt dans le plasmide permettent aux cellules survivantes de produire la protéine d'intérêt.

Le MTX, inhibiteur de la DHFR, est employé pour sélectionner les cellules les plus productives.

**b. Système d'expression GS**

La glutamine synthétase synthétise un acide aminé essentiel, la glutamine, à partir du glutamate et de l'ammonium [25]. Ce système d'expression présente deux avantages. D'une part, la transfection des cellules déficientes en GS endogène confère la capacité aux cellules ayant intégrées ce vecteur de croître dans des milieux dépourvus de glutamine. Les cellules sont également capables de produire la protéine d'intérêt grâce à la présence du GdS et d'une copie du GdI dans le plasmide. D'autre part, l'ammonium, molécule toxique à haute concentration, est consommé pour la synthèse de la glutamine [26]. L'ajout de la méthionine sulfoximine (MSX), inhibiteur de la GS, permet de sélectionner les cellules ayant intégrées le plus de vecteur et ayant donc acquis une haute productivité.

Les lignées CHO-K1, CHOK1SV et NS0 sont associées à ce système de sélection.

## C. Génération de la lignée cellulaire par transfection : intégration du vecteur d'expression dans la cellule hôte

### 1. Préparation de la cellule hôte

Préférentiellement, les plateformes de production utilisent des procédés de culture cellulaire en suspension, reconnues pour augmenter la productivité et accélérer la croissance des cellules [27].

Cependant, les cellules issues des banques sont généralement des cellules adhérentes cultivées dans des milieux contenant du sérum de veau fœtal. Si l'ajout de sérum est un catalyseur pour la croissance des cellules, ce dernier constitue un vecteur important de contamination par des virus ou des prions.

Les industriels réalisent donc deux opérations pour obtenir des cellules aptes à la production : la mise en suspension et l'adaptation aux milieux « Animal Derived Component Free » (ADCF). L'utilisation des milieux ADCF est recommandée par les autorités réglementaires car, en plus d'être dépourvus d'éléments d'origine animale, ils sont chimiquement définis

(CD). En effet, la composition de ces milieux synthétiques est parfaitement maîtrisée permettant ainsi l'obtention de lots constants.

La mise en suspension et l'adaptation aux milieux ADCF est généralement effectué avant l'étape de transfection (voir Figure 4).

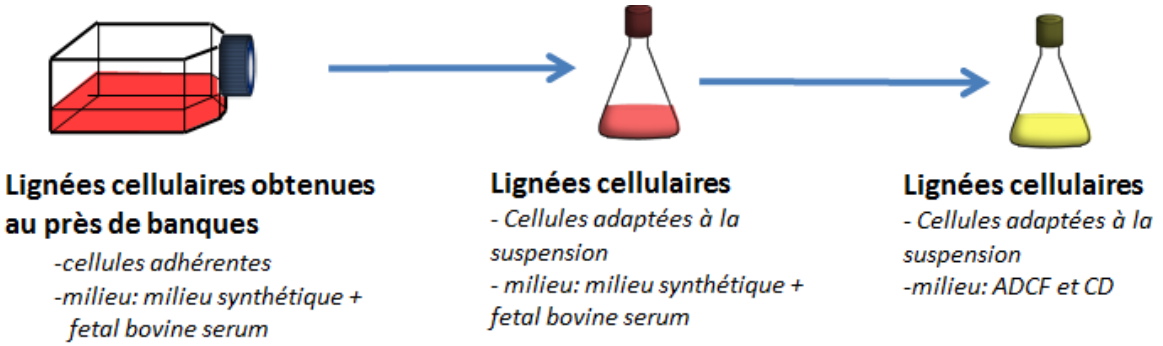



**Figure 4 : Schéma illustrant l'adaptation des lignées cellulaires aux pré-requis des industriels et des autorités réglementaires.**

### a. Adaptation en suspension

Il existe deux techniques pour adapter des cellules adhérentes à la culture en suspension :

- la technique par sélection : les cellules adhérentes cultivées en monocouches sont agitées, celles qui se détachent sont récupérées pour être ensemencées dans un nouveau contenant. Cette opération est renouvelée tant que les cellules ne sont pas en suspension.
- la technique par adaptation forcée : les cellules cultivées en monocouche sont détachées par traitement enzymatique (trypsine et EDTA, pour Acide Ethylène Diamine Tetraacétique) et ensemencées dans un erlenmeyer sous agitation, avec un milieu dépourvu d'ions bivalents ($Ca^{2+}$ et $Mg^{2+}$) nécessaire à l'adhérence des cellules. Les cellules sont cultivées durant trois jours puis elles sont centrifugées et ré-ensemencées. Elles doivent être constamment en milieu agité.

### b. Adaptation en milieu ADCF

Le transfert direct des cellules dans leur nouveau milieu entraine le plus souvent la mort des cellules. La méthode préconisée est donc d'augmenter progressivement le pourcentage du nouveau milieu (voir Figure 5). Il convient de réaliser régulièrement des banques cellulaires au cours du processus, dans le cas où les cellules ne survivraient pas, notamment lorsque le pourcentage en sérum est faible. C'est une phase laborieuse, en particulier pour certaines lignées cellulaires qui ont des difficultés à croitre sans sérum animal.

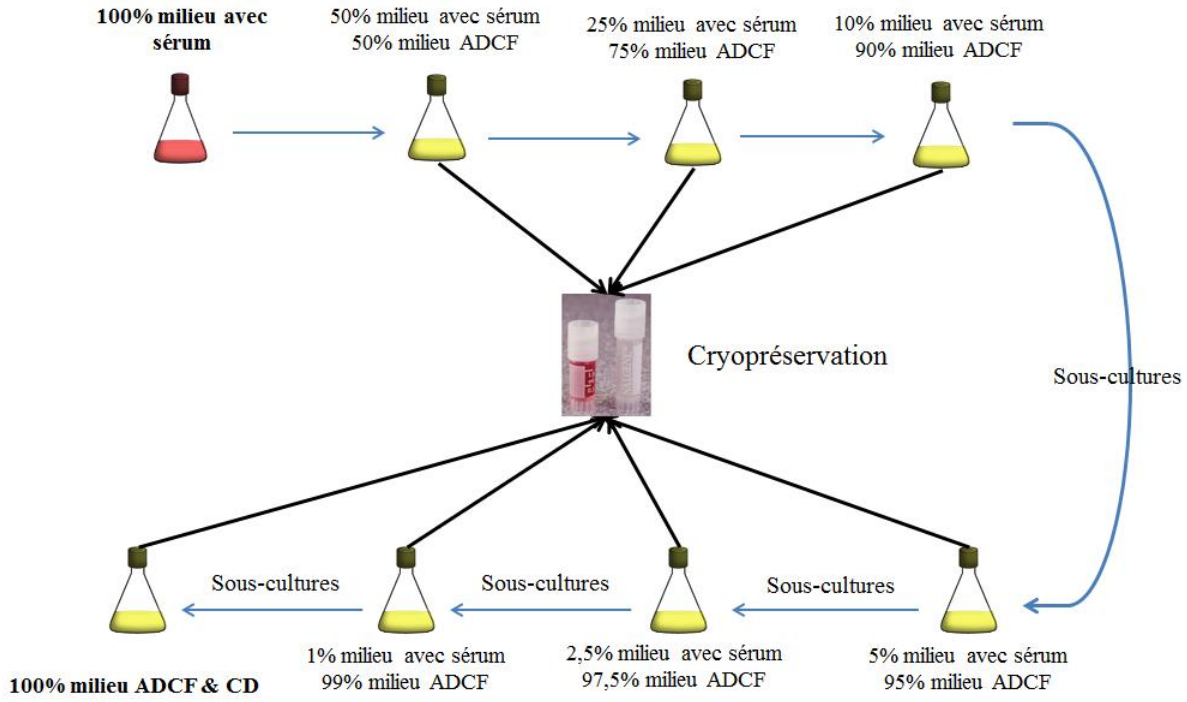



**Figure 5 : Schéma du processus d'adaptation de la culture des cellules dans un milieu ADCF et CD.**

## 2. La transfection

De nombreuses méthodes de transfection existent, le choix dépend essentiellement de la cellule hôte sélectionnée. La pertinence de la technique retenue est également conditionnée par le coût du processus, certaines étant très coûteuses. Enfin, le protocole de transfection doit permettre d'intégrer un maximum de vecteurs avec un impact minimal sur la viabilité cellulaire.

### a. Transfection stable versus transfection transitoire

La génération de lignées cellulaires stables est un pré-requis à la production d'anticorps thérapeutiques pour assurer une synthèse constante à long terme [28].

Une transfection stable signifie l'intégration du vecteur d'expression dans le génome de la cellule hôte. Ainsi, lors de leurs divisions successives, les cellules filles conservent le vecteur intégré dans leur génome, pérennisant ainsi la lignée clonale. C'est une méthode privilégiée pour produire des quantités élevées d'anticorps sur le long terme.

En contrepartie, une transfection transitoire a lieu dès lors que le plasmide a pénétré dans la cellule hôte, sans s'intégrer dans son génome. Lors des divisions cellulaires, le plasmide ne

sera pas transmis aux cellules filles, aboutissant à terme, à la perte du plasmide. Il en découle une diminution importante de la synthèse de l'anticorps après plusieurs générations.

Cette méthode n'est pas viable dans la production durable de l'anticorps, toutefois elle est utile pour obtenir une synthèse rapide des anticorps à des concentrations élevées. Ce procédé, qui ne requiert pas l'utilisation de systèmes de sélection sert fréquemment à fournir la recherche, les services qualité ou encore pour des essais cliniques.

**b. Les méthodes de transfection**

On appelle transfection le processus de transfert d'ADN exogène dans des cellules eucaryotes, non-médié par un virus, par opposition à la transduction. La transfection se réalise par la perforation transitoire des cellules pour faciliter l'entrée de molécules extracellulaires, tels que le plasmide ou un petit ARN interférent.

❖ ***Transfection par phosphate de calcium***

La transfection par phosphate de calcium est une des techniques les moins coûteuses, mais aussi l'une des moins fiables. Découverte par S. Bacchetti et F. L. Graham en 1973 [29], elle est basée sur l'utilisation d'une solution saline doublement concentrée contenant des ions phosphate, tamponnée par un composé organique zwitterionique l'HEPES. Cette dernière est combinée à une solution de chlorure de calcium contenant l'ADN à transfecter. La combinaison de deux solutions entraine la formation d'un précipité de phosphate de calcium, liant l'ADN à sa surface.

La suspension est ajoutée aux cellules à transfecter qui incorporent le précipité contenant l'ADN (les ions $Ca^{2+}$ masquent la polarité négative de l'ADN lui permettant d'entrer dans la cellule) par un mécanisme qui n'est pas encore entièrement élucidé.

❖ ***Transfection par liposome***

Une méthode de transfection très efficace est l'inclusion de l'ADN dans des liposomes, aussi appelée « lipofection » [29]. Ces micelles présentent des propriétés structurelles analogues à celles des membranes cellulaires, leur permettant de fusionner avec elles, puis de libérer l'ADN dans la cellule.

❖ ***Transfection par agents polycationiques***

D'autres méthodes utilisent des agents polycationiques, appelés dendrimères, comme le polyéthylènimine, pour lier l'ADN et le transporter dans la cellule. Le polycation se fixe aux phosphates négatifs de l'ADN et l'englobe entièrement. Le complexe formé chargé

positivement se fixe aux polysaccharides de la membrane plasmique, qui sont eux chargés négativement.

Une fois fixé à la membrane, le complexe est endocyté et adressé à l'endosome. Le polyéthylènimine capte les protons du lysosome lors de sa fusion avec l'endosome, et inactive ainsi les hydrolases.

Par un processus encore mal connu, le complexe ADN-polycation quitte l'endosome, pour être transloqué dans le noyau, où il est exprimé.

- ***L'électroporation***

Lors de l'électroporation, les cellules sont soumises à un champ électrique. Les impulsions électriques produisent un potentiel transmembranaire qui entraine une rupture réversible de la membrane cellulaire. Les pores qui se forment permettent au plasmide de pénétrer dans la cellule [29].

Certains paramètres, tels la tension ou la capacitance, doivent d'être optimisés pour améliorer les performances de la méthode. L'électroporation est fréquemment utilisée car peu coûteuse et facile à mettre en œuvre. Cependant, la viabilité post transfectionnelle est faible.

- ***La biolistique***

L'ADN est couplé à une nanoparticule issue d'un solide inerte, généralement de l'or, qui est ensuite « tiré » directement dans le noyau des cellules cibles [29].

## D. Sélection de la lignée cellulaire

La sélection de la cellule clonale est une étape capitale puisqu'elle garantit la stabilité de la cellule sélectionnée et assure une production d'anticorps conformément aux normes exigées. Cette cellule doit produire massivement des lots homogènes de l'anticorps, plus connus sous le terme d'anticorps monoclonaux.

### 1. Méthode de criblage et de sélection clonale

La technique de dilution limite (voir Figure 6) est généralement utilisée pour isoler de façon sélective des lignées monoclonales [30]. Ces dernières sont ensuite évaluées pour identifier les clones à haut potentiel de production.

Suite à la transfection, les cellules sont diluées, en présence d'agents de sélection, MSX ou MTX par exemple, puis réparties sur des plaques de 96 puits de 1 mL. La dilution facilite le dépôt d'une cellule ou moins par puit.

Les cellules qui ont intégré le vecteur en faible nombre de copie, sous l'effet d'une augmentation de la concentration des agents de sélection, ne peuvent croître et sont donc éliminées. Un nombre élevé de copies du vecteur est généralement associé à une forte productivité.

Suite à cette première élimination, environ 300 à 500 clones sont retenus. Un simple test immuno-enzymatique « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » (ELISA), permet de différencier les cellules non productrices des cellules productrices. A ce stade, 100 à 200 lignées sont sélectionnées et transférées dans des plaques de 24 à 6 puits pour être progressivement cultivées à une plus grande échelle. Différents tests sont alors effectués pour obtenir des résultats plus fiables et représentatifs.

Le surnageant est évalué par un test de protéine A « High Performance Liquid Chromatography » (HPLC) dont l'objectif est similaire au test ELISA pour un résultat plus précis et plus fiable.

Douze à vingt-quatre candidats sont choisis et mis en culture dans des erlenmeyers pour poursuivre les analyses. Cette fois-ci, le nombre restreint de lignées permet d'évaluer un nombre plus grand de paramètres en plus de la productivité ; notamment la croissance cellulaire au cours de batch, fed-batch, le pourcentage d'agrégats par « Steric Exclusion Chromatography »-HPLC (SEC HPLC), les MPT par spectrométrie de masse.

A la suite de cette sélection, 4 à 6 lignées productrices sont retenues pour être cultivées et évaluées dans des bioréacteurs de 3L, modèle réduit des procédés de production à grande échelle.

Cette analyse est importante car certaines lignées cellulaires peuvent avoir un comportement différent selon qu'elles sont cultivées en bioréacteurs ou en erlenmeyer. Des études de stabilité sur le long terme sont également effectuées pour déterminer si leurs caractéristiques de croissance, de productivité ou encore si l'intégrité de l'anticorps sont conservées. Des tests, en triplicats, lors de cultures en batch et fed batch sont menés sur 60 à 70 générations cellulaires. Si leurs caractéristiques sont maintenues alors les lignées sont considérées comme stables ; dans le cas contraire, elles sont éliminées.

Au terme de la sélection, seule une lignée cellulaire clonale est retenue. C'est le candidat final pour produire l'anticorps monoclonal et des banques cellulaires de cette lignée sont réalisées. Deux autres lignées cellulaires considérées comme les plus prometteuses après celle sélectionnée sont également conservées en tant que « back up ».

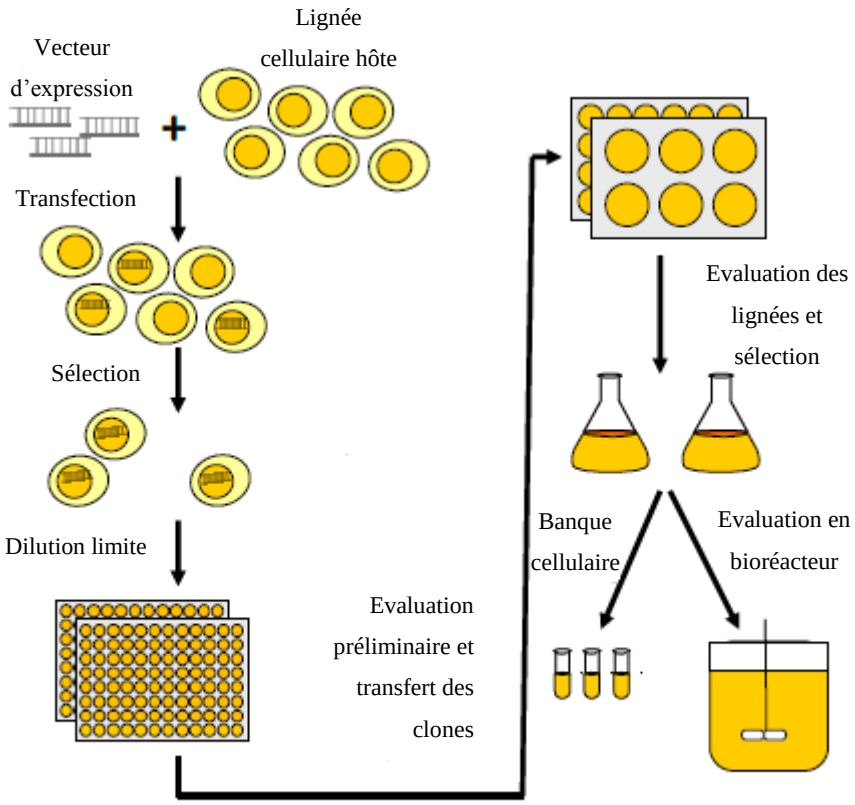



**Figure 6 : Illustration d'un processus typique de génération et sélection d'une lignée cellulaire de mammifère productrice d'une protéine recombinante [30].**

L'étape de criblage et de sélection clonale est un passage obligé pour le développement de la plateforme, dans le cas contraire, elle conduirait à la synthèse de clones hétérogènes non conformes aux exigences réglementaires.

Cette méthode est fastidieuse (entre 6 et 12 mois) et exige un investissement matériel, humain et financier important. Certaines technologies permettent d'en optimiser la durée et le coût.

## 2. Les technologies alternatives pour le criblage et la sélection clonale

Des procédés ont été développés pour sélectionner les clones les plus performants. Ces technologies sont généralement utilisées tôt dans le processus de sélection clonale afin de détecter précocement des clones à haut rendement. Parmi celles-ci, trois procédés basés sur la fluorescence seront présentées.

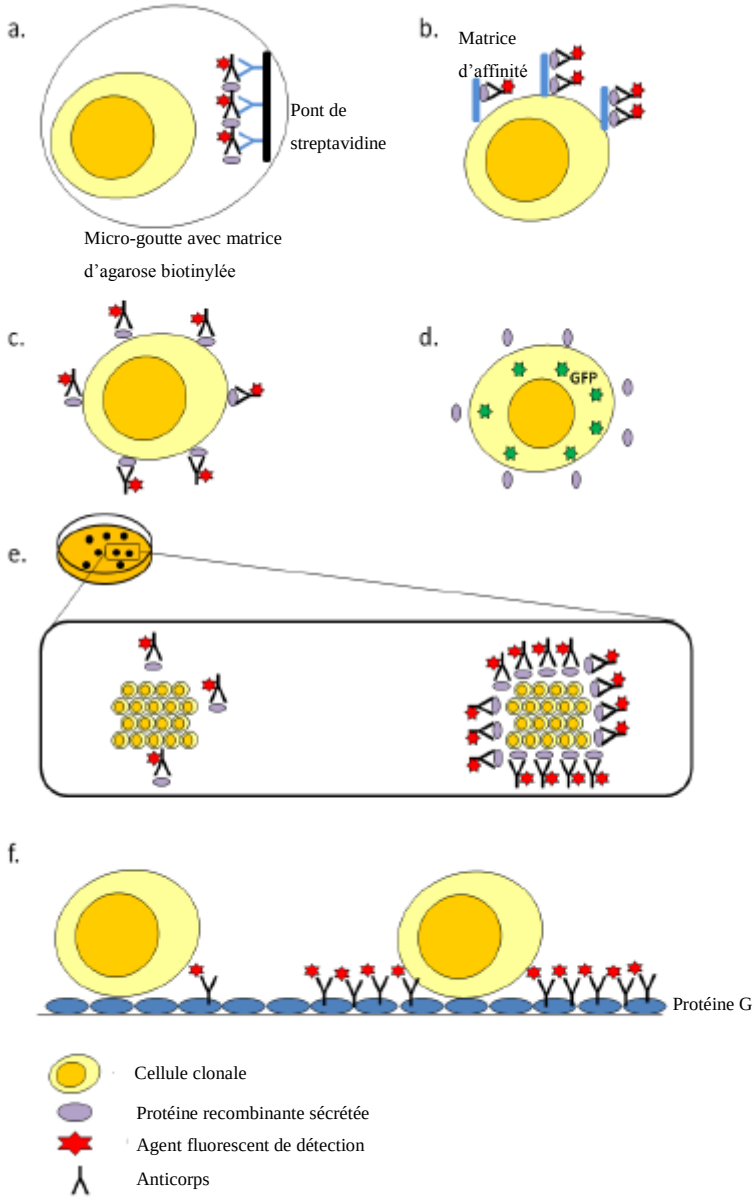



**Figure 7 : Illustration des technologies de criblage des cellules clonales, basées sur l'immobilisation des protéines recombinantes et la fluorescence. La couleur des clones, des anticorps primaires, des agents fluorescents et des protéines est respectivement jaune, noir, rouge et violet [30].**

### a. Cytométrie en flux ou FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)

La cytométrie en flux est l'étude fine de particules isolées ou des cellules (vivantes ou mortes) entraînées par un flux liquide ou gazeux. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative (voir Figure 8). La lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) permet de classer les populations suivant plusieurs critères [31].

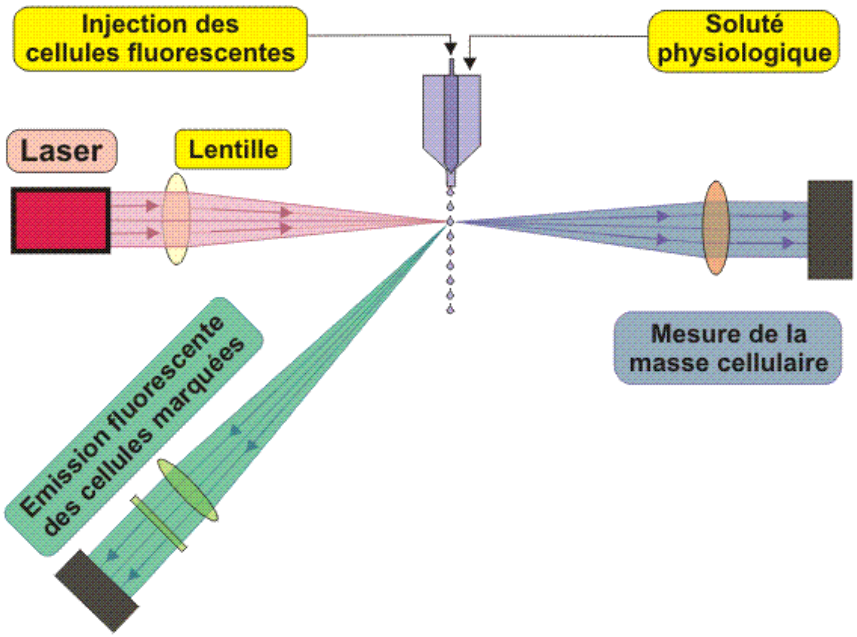



**Schéma 8 : Illustration des principes de fonctionnement de la cytométrie en flux [32].**

Cette technologie est également utilisée pour détecter les clones hautement productifs. Plusieurs stratégies ont été proposées.

Deux méthodes s'appuient sur des techniques d'immobilisation des anticorps sécrétés :

- la première consiste à encapsuler la cellule dans une micro-goutte contenant une matrice d'agarose biotinylée de 35 µm de diamètre (voir Figure 7a). Après quoi, sont injectés successivement dans la micro-goutte, des anticorps primaires, puis des anticorps secondaires fluorescents pour lier les protéines recombinantes indirectement à un pont de streptavidine. La cellule et les protéines immobilisées dans la micro-goutte sont ensuite analysées par FACS.
- la seconde stratégie s'appuie sur une matrice d'affinité qui, fixée sur la membrane de la cellule, se lie aux protéines sécrétées (voir Figure 7b). Ces dernières sont détectées par fluorescence grâce à l'ajout d'anticorps primaires fluorescents et traitées par FACS.

Bien que ces deux techniques aient amélioré la détection par FACS de clones hautement productifs, les protocoles d'immobilisation des protéines restent complexes et longs à mettre en œuvre.

Une stratégie alternative propose d'utiliser la capture par le froid des protéines fixées sur la membrane (voir Figure 7c). Celle-ci se base sur l'hypothèse selon laquelle la quantité de protéines sécrétées par la cellule est corrélée à celle des protéines fixées sur la membrane cellulaire. Ces dernières sont la cible d'anticorps fluorescents à basse température, de 0 à 4°C [30]. Cette méthode est ensuite analysée par FACS.

Il existe d'autres procédés qui reposent sur l'analyse de l'activité intracellulaire du système de sélection. Dans une étude, la GFP (pour « Green Fluorescent Protein ») a été utilisée en tant que second système de sélection et une corrélation entre la fluorescence de la GFP et la productivité de la cellule a été établie (voir Figure 7d) [33].

Le FACS est un outil alternatif utile pour la détection et la sélection de clones d'intérêts.

**b. ClonePix**

Cette technologie crible, sur des délais très brefs, un grand nombre de clones et identifie les plus productifs. Les cellules sont cultivées dans un milieu semi-solide favorable à la formation de colonies monoclonales (voir Figure 7e). Les protéines recombinantes sont piégées dans le milieu et fixées par des anticorps conjugués à l'isothiocyanate fluorescent, incorporé au préalable dans le milieu. Un immunoprécipité fluorescent se forme et les clones sont classés selon l'intensité de fluorescence. Cette intensité traduit leur capacité à produire les protéines d'intérêt [34]. C'est une technique rapide et très sensible, fréquemment utilisée pour sélectionner des clones hautement productifs.

**c. Cell Xpress™**

Cell Xpress™ est une technologie permettant l'analyse efficace de clones producteurs de protéines recombinantes, tels que les anticorps. Dans ce cas, les cellules sont cultivées dans des puits contenant de la protéine G, capable de capturer les anticorps (voir Figure 7f). Les clones sont identifiés grâce à des agents fluorescents, puis classés par la technologie Cell Xpress™. Les clones sont non seulement classés selon la quantité de protéines qu'ils sécrètent mais également selon leur taux de croissance [35]. Seuls les clones les plus performants sont conservés pour être ensuite transférés dans de plus grands contenants. De plus, CellXpress ™ est un procédé fermé, donc peu propice aux contaminations.

## E. Ingénierie génétique

La sélection du meilleur candidat clonal pour la production de l'anticorps thérapeutique dépend essentiellement de trois critères : la productivité, la croissance et la qualité du produit. Ces critères peuvent être améliorés par l'ingénierie génétique, via le « façonnage » génétique du vecteur d'expression et de la cellule hôte.

### 1. Ingénierie du vecteur d'expression

La transcription peut être optimisée grâce à l'ingénierie du vecteur d'expression. Cette technologie majore l'activité des lignées clonales, en jouant notamment sur la co-expression des gènes, les éléments régulateurs du vecteur d'expression et en ciblant les sites d'intégration de la cellule hôte. Plusieurs technologies facilitent aujourd'hui le développement de lignées cellulaires stables hautement productrices.

#### a. Site d'entrée interne des ribosomes ou IRES (Internal Ribosome Entry Site)

Les gènes d'intérêt et ceux du système de sélection peuvent être exprimés conjointement grâce à la co-transfection de la cellule hôte avec deux vecteurs différents. Cette stratégie est limitée par l'inefficacité de la co-transfection. L'association des deux gènes sur un même vecteur améliore partiellement l'expression du gène d'intérêt.

Ces difficultés peuvent être résolues par l'utilisation des éléments IRES (voir Figure 9). Les IRES sont des séquences qui permettent d'initier la traduction d'un ARN messager (ARNm) de manière interne. Les deux gènes sont ainsi dépendants d'un même promoteur, offrant la capacité à la cellule hôte de traduire deux protéines différentes.

**Figure 9 : Illustration d'un vecteur d'expression pour la production de protéines recombinantes. L'IRES permet de lier l'expression de plusieurs gènes [30].**

Il existe plusieurs avantages à lier des gènes grâce aux IRES :

- l'utilisation d'un même promoteur pour mener à bien la transcription et assurer un ratio cohérent de l'expression des différents gènes, notamment dans le cas des hétérodimères tels que les anticorps. Une étude a prouvé l'intérêt des IRES pour assurer une expression cohérente du ratio des chaînes lourdes et légères des anticorps [30].

- le positionnement du gène du système de sélection en 3' par rapport au gène d'intérêt permet de garantir la bonne expression des deux gènes. Cette stratégie limite certains incidents tels que l'expression seule du gène de sélection. Cet évènement peut survenir lorsque deux promoteurs sont utilisés dans un vecteur dicistronique.

Ce procédé a été appliqué afin d'augmenter les chances de sélectionner des clones hautement productifs lorsque la méthode d'amplification des gènes est utilisée.

**b. Elément ubiquitaire d'ouverture de la chromatine ou UCOE (Ubiquitous Chromatin Opening Element)**

UCOE (voir Figure 10) est un élément qui agit contre l'expansion de l'hétérochromatine. En réduisant la méthylation des régions CpG (région de l'ADN où la cytosine et la guanine se suivent), les UCOE maintiennent ainsi la chromatine dans une configuration ouverte ce qui facilite l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN. L'incorporation des UCOE dans les vecteurs d'expression de cellules CHO augmente significativement la production en anticorps.

**Figure 10 : Illustration d'un vecteur d'expression pour la production de protéines recombinantes. L'UCOE assure la configuration « ouverte » de la chromatine [30].**

**c. Atténuation du système de sélection**

Cultivés dans des conditions fortement stringentes, les clones sélectionnés acquièrent un niveau de transcription élevé suite à l'intégration des vecteurs d'expressions dans une zone active du génome.

La stratégie la plus communément utilisée consiste à ajouter des concentrations élevées en agents de sélection pour augmenter les stringences du milieu de culture. Cependant, cette technique a pour inconvénient de diminuer les taux de survie des clones. Une méthode alternative consiste à atténuer le système de sélection par mutation [30]. Théoriquement, cela permet d'utiliser des conditions stringentes à plus faibles concentrations pour un résultat comparable.

Une autre stratégie agit sur la régulation des gènes du système de sélection. Le niveau de transcription du gène de sélection peut être atténué par l'utilisation d'un promoteur faible Herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tf). L'utilisation d'éléments AU-rich (ARE),

perturbateurs de l'ARNm, permet également d'atténuer le système de sélection (voir Figure 11) [30].

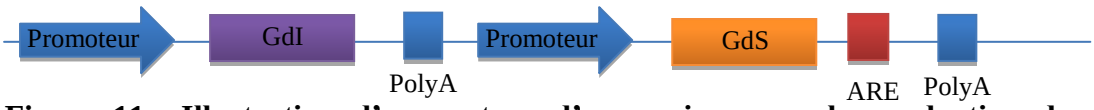



**Figure 11 : Illustration d'un vecteur d'expression pour la production de protéines recombinantes. L'expression du gène du système de sélection est atténuée par l'insertion dans le vecteur de l'élément ARE [30].**

### d. Autres stratégies

Il existe également d'autres méthodes pour augmenter la productivité :

- recombinaison site-spécifique : le vecteur est inséré dans des zones actives du génome par recombinaison génétique. C'est une stratégie alternative pour développer des clones stables et hautement productifs.
- MARs ou « Matrix Attachment Regions » : ce sont des séquences d'ADN associées à la matrice nucléaire pendant l'interphase. Ces éléments interviennent dans la structure de la chromatine, par ré-organisation du génome des cellules eucaryotes. L'ADN est décompacté donc plus accessible à la machinerie de transcription.

## 2. Ingénierie des lignées cellulaire

Ces dernières années, les progrès sont portés sur l'utilisation de l'ingénierie génétique afin de booster les performances des cellules hôtes. Ces techniques visent la modification de certaines fonctions métaboliques des cellules hôtes pour améliorer la productivité et la qualité des protéines. Ces techniques s'appuient sur : la croissance cellulaire, la prévention contre l'apoptose, l'amélioration des conditions de repliement et de sécrétion des protéines ou encore les capacités de croissance dans des milieux chimiquement définis [25].

### a. Stratégies anti-apoptotiques

L'ingénierie anti-apoptotique a été l'un des principaux domaines de recherches dans le développement des lignées cellulaires. Certaines cellules, notamment les cellules de mammifères, sont très sensibles à leur environnement. Ces cellules cultivées en conditions de stress, notamment lors de restriction en nutriments, en oxygène, en facteurs de croissance, ou lors d'accumulation de toxiques, risquent l'apoptose.

Une augmentation de la concentration en cellules viables par allongement de la durée de vie des cultures ou en prévenant l'apoptose, apporterait un avantage considérable pour améliorer la production en protéines thérapeutiques.

L'apoptose est la mort programmée de la cellule. Ce mécanisme met en œuvre une cascade de réactions métaboliques impliquant plusieurs protéines. Une stratégie consisterait à réprimer les gènes codant pour ces protéines, ce qui aurait pour effet de diminuer l'expression des facteurs apoptotiques présents dans la cellule. Une autre approche consiste à sur-exprimer les gènes anti-apoptotiques. L'augmentation de l'activité d'une ou plusieurs de ces protéines valorise les capacités de survie des cellules et accroit la durée de vie de la culture. Plusieurs gènes anti-apoptotiques testés ont donné des résultats positifs en termes de concentrations cellulaires et de titre en protéines d'intérêts : Bcl-2, Bcl-xL, 30Kc6, Aven, XIAP, CrmA et E1B-19K [36].

**b. Ingénierie métabolique**

En culture cellulaire, l'un des principaux facteurs limitant la pousse des cellules est l'accumulation de molécules toxiques dans le milieu de culture, telles que le lactate et l'ammonium. L'accumulation de ces composés conduit à une inhibition de la croissance des cellules et à la réduction du temps de culture.

Il a été démontré qu'une inhibition partielle du gène codant pour l'enzyme lactate déshydrogénase A ou que la sur-expression des enzymes du cycle de l'urée (carbamoyl phosphate synthetase I et l'ornithine transcarbamoylase) conduit à une diminution de l'accumulation de l'ammonium dans le milieu de culture [36].

Une autre stratégie repose sur une utilisation « orientée » du glucose, notamment en poussant les cellules à emprunter le cycle de Krebs comme voie métabolique unique, pour produire l'ATP. Le cycle de Krebs correspond à la voie métabolique fournissant le plus d'énergie pour la cellule. Ainsi la sur-expression de l'enzyme pyruvate carboxylase stimule l'entrée du glucose dans cette voie métabolique.

Ce procédé qui vise à optimiser la distribution des ressources nutritionnelles a pour effet d'augmenter la production en anticorps.

**c. Ingénierie post-traductionnelle : glycosylation**

L'ingénierie n'est pas seulement utilisée pour augmenter la production du produit thérapeutique mais également pour améliorer sa qualité.

La variation des profils de glycosylation a un impact sur l'activité et la stabilité de l'anticorps. Des études récentes se sont concentrées sur les structures oligosaccharidiques des anticorps. Par exemple, la sur-expression de l'enzyme N-actetylglucosaminyltransferase III a permis de synthétiser des anticorps non fucosylés avec une activité thérapeutique augmentée [36].

## F. Elaboration de banques cellulaires

Créer une banque cellulaire consiste à déposer une certaine quantité de cellules (par exemple $1x10^7$ cellules) dans des tubes de 1 mL qui sont cryopréservés dans de l'azote liquide à -196°C ou dans des congélateurs à -70°C.

La banque cellulaire primaire (MCB pour «Master Cell Bank ») correspond au stock d'ensemencement, utilisée uniquement pour reconstituer le stock de distribution.

La banque cellulaire de travail (WCB pour « Working Cell Bank ») sert de stock de distribution pour les usages courants, voire pour être acheminée vers des utilisateurs extérieurs.

Il est nécessaire, d'élaborer des banques cellulaires pour en disposer à long terme. Ces banques constituent des moyens de prévention en cas de :

- contaminations par des micro-organismes.
- contaminations croisées.
- panne d'incubateurs (coupure courant, rupture alimentation $CO_2$, etc).
- dérive génotypique due à une instabilité génétique.
- transformation ou instabilité phénotypique due à la sélection et à la dédifférenciation.

Ces banques permettent également de réaliser une économie financière et de gagner du temps dans le maintien des lignées cellulaires peu utilisées.

Il est nécessaire de réaliser les prochaines étapes de développement de la plateforme, à savoir la mise en place des procédés de production, à partir de lignées cellulaires identiques issues des banques cellulaires. L'utilisation régulière de tubes issus de la WCB réduit le risque de dérive génétique durant les nombreuses expérimentations, garantissant ainsi l'acquisition de données expérimentales fiables.

# Partie 2. Procédés de production

Cette étape a pour objectif d'augmenter la productivité en anticorps, tout en maintenant l'intégrité et la qualité du produit d'intérêt. Les étapes de sélection de la lignée clonale et d'ingénierie génétique permettent de développer une lignée productrice de haut rendement. Cependant, la productivité de la lignée peut être encore améliorée en développant un procédé de production adéquate. Les procédés de production et en particulier les milieux de cultures doivent être développés spécifiquement pour chaque lignée clonale afin d'obtenir une production optimale.

## A. Procédés de culture cellulaire

Il existe différentes techniques de cultures cellulaires, certaines plus adaptées à la production à grande échelle de protéines recombinantes (voir Figure 11).

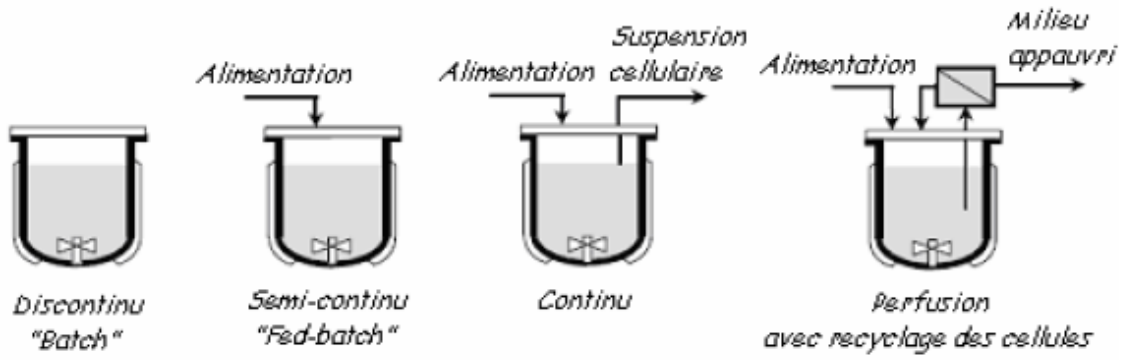



**Figure 11 : Les différents modes de cultures en bioréacteurs [36].**

### 1. Batch

La culture en batch correspond au procédé de culture le plus commun, notamment du fait de sa simplicité et de son faible coût. Cette culture est réalisée à volume constant : aucun milieu n'est ajouté, ni soutiré lors de la culture. Au cours de la croissance, il se produit, d'une part, un enrichissement en produits issus du métabolisme, éventuellement toxiques et d'autre part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments, entrainant la mort des cellules [37]. Suivant les lignées cellulaires et les milieux utilisés, les cellules survivent entre 3 et 7 jours avec ce mode de culture. La croissance d'une culture de cellules passe par différentes phases (voir Figure 12).

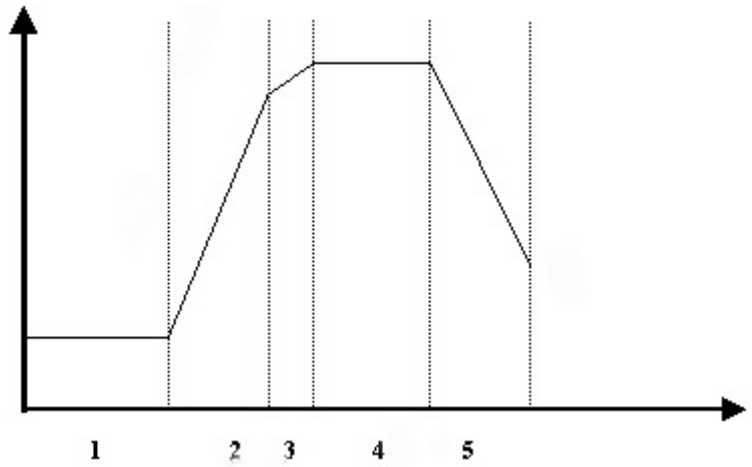



**Figure 12 : Profile de croissance des cellules en mode batch.**

**1. Phase de latence : le taux de croissance est proche de 0 (μ ≈ 0). La durée de cette phase dépend des cellules et de la composition du milieu. C'est le temps nécessaire aux cellules pour s'adapter à son nouvel environnement et pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat. Si le repiquage est effectué dans un milieu identique, il n'y alors pas de phase de latence mais une phase d'accélération.**
**2. Phase de croissance exponentielle : le taux de croissance atteint un maximum (μ=max) tandis que le taux de mortalité est nul.**
**3. Phase de ralentissement : la vitesse de croissance régresse. Il y a un épuisement du milieu de culture et une accumulation des déchets.**
**4. Phase stationnaire : le taux de croissance devient nul (μ = 0). Les cellules qui se multiplient compensent celles qui meurent.**
**5. Phase de déclin : le taux de croissance est négatif (μ < 0). Toutes les ressources nutritives sont épuisées et il y a accumulation de métabolites toxiques**.

La concentration cellulaire peut atteindre $10^7$ cellules/mL pour les cellules de mammifères. La productivité étant relativement faible, cette méthode est généralement exploitée pour tester les cellules clonales en amont du développement de la plateforme.

## 2. Fed-batch

La culture en fed-batch est un mode d'alimentation discontinue qui s'appuie sur l'ajout de nutriments tels que le glucose, les acides aminés, les lipides, les acides nucléiques en cours de culture. Ce mode de culture est caractérisé par l'augmentation du volume. Les ajouts améliorent la croissance cellulaire et la production en anticorps tout en limitant le coût du procédé (voir Figure 13 et Figure 14) [38]. En limitant la déplétion en nutriments durant la culture, cela permet d'augmenter la durée de culture, environ 15 jours, et la VCC, $10^7$ cellules/mL environ, maximale est augmentée. Certaines cultures de cellules de mammifères peuvent même atteindre $3.10^7$ cellules/mL. Ce mode de culture est généralement associé à une

augmentation de la concentration finale en protéines recombinantes, pouvant atteindre 10 g/L dans certaines cultures, soit une augmentation d'un facteur 5 (voir 10) par rapport au mode batch.

Le challenge de cette méthode est de développer les protocoles et les milieux de supplémentations adéquates. Cependant, l'apport des nutriments doit être maitrisé pour éviter les effets toxiques liés à des concentrations trop élevées.

La culture en fed-batch est la technique la plus couramment utilisée pour la production de protéines recombinantes. Elle possède l'avantage de produire de grandes quantités d'anticorps pour un coût relativement faible. Par contre, le risque de contamination est augmenté par les différents ajouts de nutriments en cours de culture.

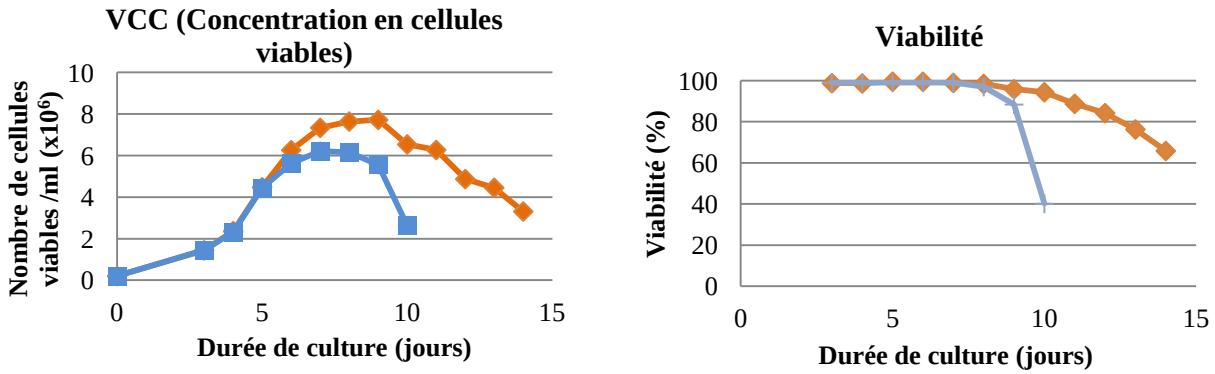
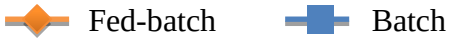



**Figure 13: Exemple de profil de VCC et de viabilité obtenue en mode batch et fed batch avec une même lignée cellulaire.**



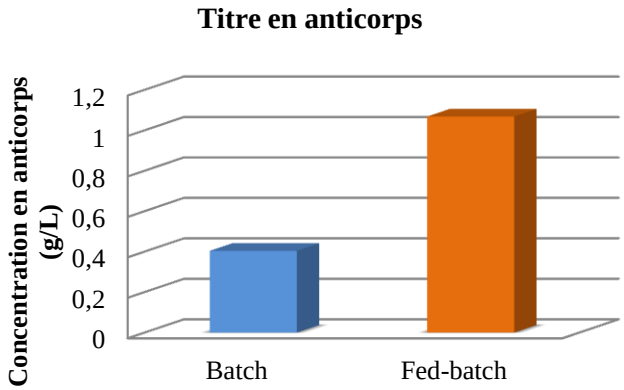




**Figure 14: Exemple de concentrations finales en anticorps obtenues en mode batch et fed batch avec une même lignée cellulaire.**

### 3. Chémostat

Le chémostat est un procédé dit « continu », où l'ajout de milieu stérile et le soutirage commencent lorsqu'une concentration cellulaire définie est atteinte dans la cuve. L'alimentation et le soutirage sont effectués au même débit, le volume de la culture reste donc constant. Il n'est pas nécessaire en théorie de vider la cuve. Cependant, des mutations et des contaminations obligent leur vidange. Malgré une productivité plus importante qu'en mode discontinu, ce procédé n'est généralement pas retenu par les industriels à cause du coût de production élevé.

### 4. Procédé en perfusion

Le procédé en perfusion est également un procédé en « continu », avec ajout et soutirage constant du milieu. A la différence du chémostat, les cellules sont retenues, il y a un recyclage des cellules. Ce système est également appelé perfusion avec recyclage des cellules. Ce procédé permet d'obtenir une importante biomasse, et donc d'obtenir une production élevée en protéines recombinantes. De plus, la perfusion du milieu de culture permet l'élimination des produits sécrétés, éventuellement toxiques, ce qui réduit les risques de dégradation des protéines produites. Ainsi, les systèmes en perfusion permettent une productivité 10 à 50 fois plus élevée que les autres modes de culture sans nécessiter d'équipements à grande échelle. Cependant, ce mode de culture, mis à part les problèmes de colmatage, présente un risque élevé de contamination du fait de la complexité des dispositifs mis en œuvres.

## B. Milieux de cultures

Le procédé fed-batch correspond au procédé le plus utilisé par les industriels. Ce procédé est plus simple à mettre en place et plus économique que les procédés dits « continus ». De nombreuses sociétés ont développés des plateformes de production s'appuyant sur ce procédé.

De façon général, le développement d'un procédé fed-batch implique la mise au point de milieux répondant au mieux aux besoins des cellules. Plusieurs milieux, de formulations différentes, sont généralement nécessaires, chacun dédié à une phase spécifique de la culture. Certains milieux sont développés pour stimuler la croissance cellulaire, en particulier durant les premiers jours de cultures tandis que d'autres sont élaborés pour stimuler la production en protéine d'intérêt, généralement en fin de phase exponentielle. Enfin, des milieux sont élaborés pour maintenir la culture en vie le plus longtemps possible.

Les milieux doivent être en accord avec les standards de qualité et des exigences réglementaires [39]. Les milieux ainsi que les suppléments utilisés sont donc généralement ADCF, CD.

## 1. Composition des milieux de culture

Les milieux de cultures doivent reproduire aussi fidèlement que possible les conditions *in vivo* dans lesquelles les cellules évoluaient. Ils ont le rôle de :

- vecteur d'éléments nutritifs.
- maintien des conditions physico-chimiques telles que le pH et l'osmolarité.
- favoriser la prolifération des cellules.

### a. Milieu synthétique de base

Un milieu de culture de base comprend les constituants indispensables à toutes cultures cellulaires (à titre d'exemple, se référé à l'Annexe 1 pour des compositions de milieux) :

- source d'énergie : le glucose est la principale source d'énergie permettant la synthèse d'adénosine Triphosphate (ATP) via la glycolyse et le cycle de Krebs. C'est également une importante source de carbone qui est entre autre nécessaire à la synthèse des acides nucléiques [40].
- acides aminés : ils sont indispensables pour la synthèse des protéines et ils peuvent également stimuler la croissance cellulaire. La glutamine est un acide aminé indispensable pour la culture de la plupart des cellules de mammifères. C'est un précurseur des purines, des pyrimidines et de quelques acides aminés [40, 26].
- vitamines : ce sont des facteurs de croissances, des cofacteurs d'enzymes ou des précurseurs de certaines molécules. Le besoin en vitamines est variable suivant les types cellulaires, certaines étant plus indispensables que d'autres : choline, acide folique, thiamine, pyridoxal, riboflavine, acide nicotinique, inositol, acide panthoténique.
- acides gras : ce sont les principaux constituants membranaires et le cholestérol joue le rôle de précurseur des hormones. Les acides gras tels que l'acide oléique, l'acide linoléique et le cholestérol sont également des facteurs de croissance.
- système tampon : utilisation du couple bicarbonate de sodium / dioxyde de carbone ou de l'HEPES [40]. Les systèmes tampon permettent de réguler le pH et de limiter les fortes variations de pH qui peuvent être délétères pour les cellules.

- rouge de phénol : indicateur coloré dont la zone de virage est située aux pH de 7,2 – 7,6. Cela permet de visualiser les variations de pH.

Le pH du milieu dépend essentiellement de la lignée cellulaire employée. Généralement, le pH du milieu varie de 7 à 7,4 pour les cellules de mammifères, ce qui correspond aux conditions *in vivo* de ces cellules.

### b. Le sérum

Le sérum est un mélange de composition extrêmement complexe qui contient, entre autres, des facteurs de croissances, des hormones et des oligoéléments ; le plus utilisé étant le sérum de vœu fœtal. Les sérums augmentent significativement la croissance cellulaire et leur viabilité dans le temps. Le pourcentage de sérum additionné au milieu de base varie selon le type cellulaire, il est souvent de l'ordre de 5 à 10%. Cependant, ils ne sont généralement plus utilisés par les industriels pour produire des protéines à usage thérapeutiques car ils présentent de nombreux inconvénients :

- composition non définie.
- variabilité de lot à lot.
- problème d'innocuité : risque de contaminations par des prions, virus, toxines.
- teneur élevée en protéine : risque d'intéraction lors de la purification.
- approvisionnement variable : le prix est donc lui aussi variable.

## 2. Milieux commerciaux

De nombreuses entreprises se sont spécialisées dans le développement de milieux de culture afin de répondre au mieux aux besoins complexes et spécifiques de chaque cellule hôte.

Ces milieux commerciaux présentent des avantages non négligeables pour les entreprises pharmaceutiques. L'investissement pour le développement de ces milieux est important en termes de personnels, d'infrastructures et de temps. Il est généralement plus simple de se fournir en milieux préalablement élaborés. D'autre part, le nombre de milieux commerciaux sur le marché est élevé, ce qui offre l'opportunité à l'entreprise d'évaluer différents milieux afin de déterminer celui qui convient le mieux à la cellule hôte. Ces milieux se rapprochent des besoins de la cellule (ajouts de suppléments) tout en évitant à l'entreprise de le développer entièrement, permettant ainsi de réaliser des économies.

Cependant, quelques inconvénients persistent à l'utilisation des milieux commerciaux. D'une part, ces milieux sont développés pour subvenir aux besoins d'une lignée cellulaire mais ils n'ont pas été élaborés spécifiquement pour une cellule clonale ; chaque cellule clonale

possède des besoins spécifiques. Ces milieux ne sont donc pas entièrement optimisés pour être utilisés pour une cellule clonale en particulier. D'autre part, l'utilisation de milieux commerciaux rend l'entreprise dépendante d'une société extérieure. En effet, l'entreprise court le risque de voir la production de la molécule thérapeutique s'arrêter si la société extérieure stoppe la fabrication des milieux. La compagnie n'aurait alors pas d'autres choix que d'évaluer de nouveaux milieux.

## 3. Optimisation des milieux

Elaborer les milieux les plus performants pour une lignée clonale et développer le procédé adéquat représente un vrai challenge. La complexité du métabolisme cellulaire ainsi que le nombre élevé de composés nécessaires aux cultures sont les principales difficultés de l'élaboration des milieux. Non seulement, une lignée cellulaire requiert entre 50 et 75 constituants différents pour optimiser ses performances mais les concentrations optimales de chacun des constituants sont inter-dépendantes ; modifier la concentration d'un des composant peut impacter celle des autres composés [39].

### a. Méthodes à appliquer

Différentes méthodes ont été développées par les industriels afin d'optimiser les milieux de cultures [39] :

- Titration des composants : c'est une méthode classique, régulièrement utilisée pour la mise au point de milieux. Elle implique la réalisation d'une série de tests afin de déterminer la « dose réponse » d'une lignée cellulaire à plusieurs composés. Ces derniers sont ajoutés à différentes concentrations et leurs effets sur la croissance et la productivité sont évalués. Elle est également laborieuse puisque l'analyse de 50 éléments à trois concentrations différentes nécessite pas moins de 150 expériences.
- Mélange de milieux : le mélange de plusieurs milieux déjà existant permet de générer de nouveaux milieux et de sélectionner le plus performant en un minimum de temps. Par contre, cette méthode fournit peu de renseignements sur les composants bénéfiques ou néfastes pour la lignée cellulaire. Il est impossible de les identifier et d'ajuster leur concentration.

- Analyse du milieu de culture : à la différence de la méthode précédente, celle-ci permet de fournir d'importantes informations sur la déplétion en nutriments et l'accumulation des métabolites. Elle consiste à analyser la composition du milieu au cours du procédé de culture. Une fois par jour, ou plus, un échantillon du milieu est prélevé puis analysé. Cet examen est généralement effectué par spectrométrie de masse. Cette technologie évalue de façon extrêmement précise la concentration en nutriments et en métabolites. Ainsi, il est possible d'optimiser le milieu de culture et les milieux de supplémentations par l'ajout de nutriments nécessaires à la bonne croissance des cellules. Néanmoins, cette méthode n'offre pas un tableau complet des besoins de la lignée cellulaire. Elle fournit des renseignements sur un nombre limité de molécules comme les acides aminés, le glucose, le lactate, et l'ammoniaque, alors que la culture d'une lignée cellulaire repose sur une biologie bien plus complexe.

- Criblage automatisé : la technique de criblage consiste à évaluer un maximum de candidats en un minimum de temps ; son principal avantage est donc son rendement. Afin d'y parvenir, les expériences sont effectuées à échelle réduite, dans des micro-puits (plaques de 96 puits par exemple). Ainsi, cette méthode génère une importante quantité de données par la réalisation en parallèle des différents tests. Par contre, la miniaturisation de cette technique implique une perte de précision lors de la modélisation du procédé à grande échelle. Les conditions de cultures diffèrent considérablement avec le « process » utilisé pour la production de la protéine recombinante.

Chacune des méthodes décrites ci-dessus présentent des avantages et des inconvénients. Il n'est pas recommandé d'exploiter une unique méthode mais plutôt de combiner les quatre. Il est essentiel de mettre en place une stratégie mûrement réfléchie afin de développer et d'optimiser les milieux en un minimum de temps.

Certains outils informatiques sont exploités par les industriels afin de réduire la durée des expérimentations ainsi que leur coût ; c'est le cas des « Design of Experiment ». Ces logiciels génèrent des plans d'expériences robustes facilitant ainsi l'interprétation des résultats expérimentaux par des programmes de statistique. Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais. Ainsi, un maximum d'informations est obtenu avec un

minimum d'expériences. Il existe 2 principaux types de plans d'expériences : les plans factoriels complets et les plans factoriels fractionnaires. Le premier consiste à réaliser toutes les expériences sans en omettre une seule. Cette démarche est la plus robuste, il n'y a pas de pertes de données. Par contre, il y a une perte de temps puisque toutes les expériences sont réalisées. Les plans d'expériences factoriels ont été conçus pour réduire le nombre d'expériences à réaliser. Cette démarche est moins robuste que la précédente puisque la diminution du nombre d'expériences entraine inévitablement une perte de données. Ces plans nécessitent également une phase de conception plus longue puisqu'il est nécessaire d'évaluer les risques inhérents aux tests statistiques. Néanmoins, cet outil offre un gain de temps significatif, souvent nécessaire pour respecter les délais de mise en place de la plateforme.

**b. Nutriments à investiguer**

L'absence de certains nutriments peut provoquer une hétérogénéité des glycosylations en plus d'une diminution de la viabilité. Cependant, l'ajout de doses élevées dans les milieux n'est pas recommandé. Des concentrations trop élevées peuvent mener à une accumulation d'acide lactique et d'ammoniaque entrainant une acidification du milieu. Il est alors généralement conseillé de débuter avec de faibles concentrations en nutriments dans le milieu puis de supplémenter régulièrement durant la culture suivant les besoins des cellules.

De nombreux éléments nutritifs ont été investigués au cours des dernières décennies et relatés dans la littérature scientifique. L'efficacité des différents agents décrits sont principalement dépendant de la lignée cellulaire utilisée. Une liste non exhaustive est présentée ci-dessous :

- acide aminés : l'ajout élevé en acide aminé, en particulier la glutamine, est néfaste pour la productivité car sa consommation conduit à la formation d'ammoniaque, composé toxique pour les cellules [41]. Apporter les quantités nécessaires d'acides aminés au cours de la culture permet de limiter l'accumulation d'ammoniaque et d'augmenter la production en produit d'intérêt. La cystéine et la tyrosine sont généralement deux acides aminés indispensables à la culture des cellules CHO [40]. D'autre part, ces deux molécules doivent être préparées au dernier moment du fait de leur mauvaise conservation en milieu liquide, même à une température de 4°C.
- glucose : il est recommandé de maintenir la concentration de glucose entre 2 et 4 g/L pour une croissance optimale des cellules CHO. S'il y a une déplétion en glucose, la viabilité de la culture risque de diminuer drastiquement. Par contre, une concentration élevée en glucose stimule sa métabolisation en acide lactique, via la fermentation anaérobique du pyruvate. L'accumulation de l'acide lactique acidifie le milieu de

culture impactant la croissance et la productivité. Pour diminuer ce risque, le glucose peut être substitué par d'autres sucres tels que le fructose, le mannose ou le galactose.

- hydrolysats : ils sont fréquemment ajoutés aux milieux afin de remplacer le sérum désormais absent des milieux. Ce sont des mélanges de peptones, issus d'hydrolysats de levures, du soja, du riz ou du blé. Plusieurs études ont démontrées l'efficacité des hydrolysats pour accroître la production et la viabilité. Son utilisation est autorisée par les autorités réglementaires car, n'étant pas issue d'animaux, il n'y a pas de risque de transmission de prions comme le TSE (transmissible spongiforme encephalopathie). Cependant, les lots d'hydrolysats ne sont pas définis et une variabilité de lot à lot subsiste ; c'est pourquoi de nombreuses sociétés préfèrent ne pas utiliser ces suppléments.
- vitamines: l'ajout régulier de vitamines est nécessaire afin « booster » la croissance des cellules tels que la riboflavine, l'acide folique, la vitamine B12.
- hormones: l'ajout d'insuline, en particulier, assure une meilleure assimilation des sources d'énergie.
- lipides : le cholestérol joue un rôle central dans de nombreux processus biochimiques et il est un composant essentiel des membranes cellulaires [40].
- oligo-éléments : zinc, fer, cuivre, acides tricarboxyliques. Ce sont des co-facteurs enzymatiques, qui doivent être ajoutés à faibles concentrations pour limiter leur toxicité. Le sélénium est un détoxifiant, il aide à éliminer les radicaux libres. Les ions métalliques (Fer, Magnésium, Cuivre, Zinc..) sont apportés à l'état de traces par les milieux de culture car ils sont essentiels à la croissance cellulaire en intervenant dans les réactions de la chaîne respiratoire.
- sels minéraux : l'ajout de ces derniers est nécessaire pour l'exécution de certains processus cellulaires, et également pour maintenir l'osmolarité du milieu [40]. Les principaux sels minéraux sont le calcium, le magnésium, le phosphate, le potassium et le sodium.
- protéines : certaines protéines sont essentielles pour assurer une bonne prolifération des cellules. C'est le cas notamment de la transferrine.
- inducteur de synthèse : diverses molécules peuvent interférer avec certaines voies métaboliques ou encore agir au niveau de l'ADN. Le butyrate et le propionate sont deux molécules capables d'augmenter la productivité des cellules. Le butyrate augmente l'activité transcriptionnelle de la cellule en régulant l'acétylation des

histones. Néanmoins, cette molécule est hautement toxique. Certaines études ont démontré que l'acide valproïque peut également être une alternative au butyrate.

- agents anti-apoptotiques : la suramine est un agent anti-apoptotique maintenant la viabilité des cellules principalement durant la phase exponentielle. D'autre part, cette molécule réduit l'agrégation cellulaire pendant la culture [42]. Il existe également des molécules comme l'Ac-DEVD-cho (N-acetyl-Asp-Glu-ValAsp-aldehyde) et le z-VAD-fmk (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone) qui inhibent les caspases [36]. Les caspases, activées par protéolyse, participent au déclenchement de l'apoptose. L'utilisation combinée des inhibiteurs de caspases prolonge la viabilité des cellules.

## C. Systèmes de production à petite échelle

Les systèmes de production à petite échelle permettent de réaliser de nombreuses cultures en parallèle et donc de diminuer le temps de développement des procédés. Ils ont généralement un « design » relativement simple avec un niveau bas d'instrumentation et de contrôle, à la différence des bioréacteurs [43]. La sélection du système le plus adapté dépend de plusieurs paramètres :

- cellules adhérentes ou en suspension.
- rendements recherchés.
- personnels disponibles et niveau d'expertise.
- investissements nécessaires.
- équipements et espace disponible.

Les premiers supports de cultures étaient en verre mais ils ont été rapidement remplacés par des supports en polystyrène à usage unique, plus résistant et ne nécessitant pas de stérilisation. La mise en place de bouchons ventilés a également permis l'augmentation des échanges gazeux sans pour autant accroître le risque de contaminations [44]. Les systèmes de culture sont maintenus dans des incubateurs qui assurent un environnement humide et chargé en dioxyde de carbone nécessaire pour la culture des cellules.

### a. Cellules adhérentes

Les procédés utilisant les cellules en adhérence sont aujourd'hui moins employés que ceux développés pour la culture en suspension. Cependant, certaines lignées cellulaires nécessitent la culture en adhérence afin d'atteindre de hautes productivités et de maintenir les caractéristiques du produit d'intérêt [44]. C'est pourquoi il existe toujours des plateformes de production se basant sur la culture de cellules en adhérences (voir Tableau 5).

La concentration cellulaire maximale de ces supports est proportionnelle de la surface de culture ; une augmentation d'échelle implique donc un accroissement de la surface.

**Tableau 5 : Description et illustration des différents systèmes de culture de cellules en adhérence.**

| Systèmes de culture | Avantages | Inconvénients |
|---|---|---|
| **Figure 15 : Plaques de micropuits.** | -Utilisation et récolte simplifiée<br>-Evaluation de la croissance cellulaire au microscope<br>-Pas de matériel supplémentaire requis | -Très faible surface de culture.<br>➥non utilisé pour la production de produits en grande quantité |
| **Figure 16 : T-flaks.** | -Utilisation et récolte simplifiée<br>-Evaluation de la croissance cellulaire au microscope<br>-Pas de matériel supplémentaire requis | -Faible surface de culture : 44 flacons de T225 (255 $cm^2$) sont nécessaire pour contenir $1x10^9$ cellules<br>➥charge de travail et encombrement |
| **Figure 17 : Boîte de Petri.** | -Accès directe à la surface des cellules<br>-Moins encombrante<br>-Evaluation de la croissance cellulaire au microscope<br>-Pas de matériel supplémentaire requis | -Faible surface de culture : une surface de 20500 $cm^2$ en boîte est nécessaire pour obtenir $1x10^9$ cellules |

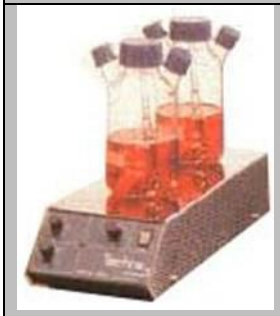
| | | |
|---|---|---|
| <br>**Figure 18 : Flacons roller.** | -Echanges gazeux améliorés<br>-Evite la formation de gradients au sein du milieu<br>-Economique: culture de grandes quantités de cellules adhérentes<br>-Evaluation de la croissance cellulaire au microscope inversé | -Exige plus de place dans l'incubateur, investissement nécessaire en équipements<br>-Surface de cultures améliorée (en comparaison des flacons et des boîtes) mais toujours insuffisante<br>-Risque de décrochements des cellules à cause de la rotation constante des rollers |
| <br>**Figure 19 : Chambres de cultures, X4 Cell Factory.** | -Grande surface de cultures<br>-Scale-up facilité en ajoutant simplement plusieurs couches ou plusieurs chambres<br>-Gain de place en incubateur<br>-Aucun matériel supplémentaire | -Plus de difficulté à manipuler : chambres lourdes, volumes important de milieu<br>-Pas d'évaluation de la croissance par microscopie |

### b. Cellules en suspension

Les procédés de culture cellulaire en suspension (voir Tableau 6) présentent de nombreux avantages en comparaison de ceux en adhérence [44] :

- plus économique: la culture de cellules en suspension n'est plus dépendante de la surface disponible sur les supports comme pour les cellules adhérentes ; c'est pourquoi ces procédés facilitent l'augmentation de la densité cellulaire et par conséquent, améliorent la production.
- moins de manipulation.
- optimisation des échanges gazeux : agitation et augmentation de la surface air/liquide.

**Tableau 6 : Description et illustration des différents systèmes de cultures de cellules en suspension.**

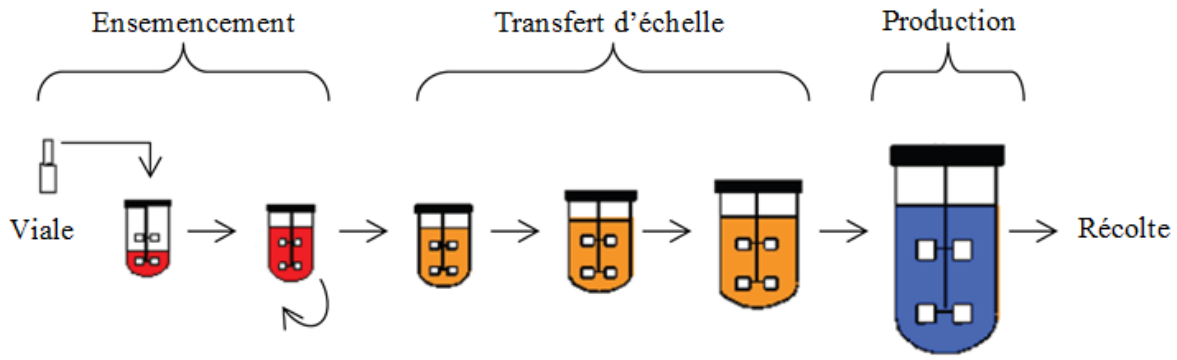
| Systèmes de culture | Avantages | Inconvénients |
|---|---|---|
| **Figure 20 : Plaques de micropuits.** | -Utilisation et récolte simplifiée<br>-Evaluation de la croissance cellulaire au microscope<br>-Pas de matériel supplémentaire requis | -Très faible surface de culture<br>-Nécessite des agitateurs<br>➥non utilisé pour la production de produits en grande quantité |
| **Figure 21 : Erlenmeyer.** | -Economique et compact<br>-Echantillonnage et récolte facilitée<br>-Echanges gazeux efficaces<br>-Peu de manipulations<br>-Scale-up : flacons de 30 mL à 6 L | -Nécessite des agitateurs<br>-Pas assez représentatifs des conditions de cultures en bioréacteurs |
|  **Figure 22 : Spinners.** | -Economique et compact<br>-Récoltes faciles des cellules<br>-Scale-up possible | -Difficile de nourrir les cellules<br>-Nécessite un agitateur magnétique occupant de l'espace dans l'incubateur |

# Partie 3. Mise en place de la plateforme de production à grande échelle

L'augmentation de la demande en anticorps a nécessité la mise au point de bioréacteurs et de procédés de culture cellulaire de grande échelle. Ces systèmes de production évoluent constamment afin de réduire les problèmes liés aux productions de grandes échelles, tels que les échanges gazeux ou encore l'accumulation de déchets toxiques. Ces procédés ont pour objectif d'optimiser la production des produits d'intérêts tout en maintenant la qualité de l'anticorps obtenus durant les premières phases de développement.

La priorité des industriels est la production d'importante quantités de produits pour diminuer au maximum le coût de production et répondre à la demande mondiale. La stratégie la plus communément employée par les groupes pharmaceutiques est la production en masse dans des bioréacteurs de très grande taille. Ainsi, une grande quantité de protéines est produite à un coût réduit. Une stratégie alternative est l'utilisation simultanée de bioréacteurs de moindre capacité en parallèle. Cela présente l'avantage de diminuer les pertes en cas de contamination mais demande plus de main d'œuvre puisque les étapes doivent être répétées pour l'ensemble des bioréacteurs.

La production dans des volumes de cultures de plusieurs $m^3$ nécessite de passer par une série d'étapes : ensemencement, transfert d'échelle et production (voir Figure 22). Chaque étape doit respecter certains paramètres clés : croissance cellulaire, viabilité, titre, qualité du produit. Le succès du processus d'augmentation d'échelle est déterminé par ces paramètres.




| Echelle de production | 20 L | 80 L | 400 L | 2000 L | 12000 L |
|---|---|---|---|---|---|
| Modèle à échelle réduite | 2 L | 2 L | 2 L | 2 L | 2 L |
| Paramètres clés | Croissance cellulaire, viabilité finale | | | | Titre, qualité du produit |

**Figure 22 : Représentation des différentes étapes du processus de production d'une protéine thérapeutique à grande échelle [11].**

## A. Bioréacteurs

Les bioréacteurs sont les systèmes de production privilégiés par les industriels pour la production de protéines thérapeutiques [43]. Les bioréacteurs possèdent un niveau d'instrumentation élevé qui facilite la mise en œuvre et le contrôle des procédés de culture cellulaire. Ils sont également élaborés de manière à pouvoir être utilisé pour les phases de développement (échelle 2-20 L) et la production à grande échelle (échelle > 10 000L).

Les bioréacteurs sont généralement conçus pour la culture en suspension et la production à grande échelle. Cependant, certains ont été spécialement élaborés pour la culture de cellules en adhérence.

### 1. Culture en suspension

A grande échelle, la culture en suspension est habituellement le procédé privilégié par les industriels, elle offre:

- une bonne maîtrise du processus d'augmentation d'échelle.
- une large gamme de contrôles et une grande maniabilité.
- un ratio surface / volume important.

### a. Bioréacteur à agitation mécanique STR (pour « Stirred Tank Reactor »)

Le STR (voir Figure 23) est le bioréacteur le plus utilisé pour la production d'anticorps. Initialement employé pour la culture microbienne, les industriels ont maintenant une bonne compréhension des processus d'augmentation d'échelle, de stérilisation et de nettoyage.

Ces fermenteurs sont en verre renforcé (ex : borosilicate) ou en acier inoxydable [43]. Ce dernier est très résistant et limite l'adhésion des micro-organismes à la surface des parois. Ce bioréacteur se caractérise par la présence d'une pâle d'agitation qui peut avoir différentes formes.

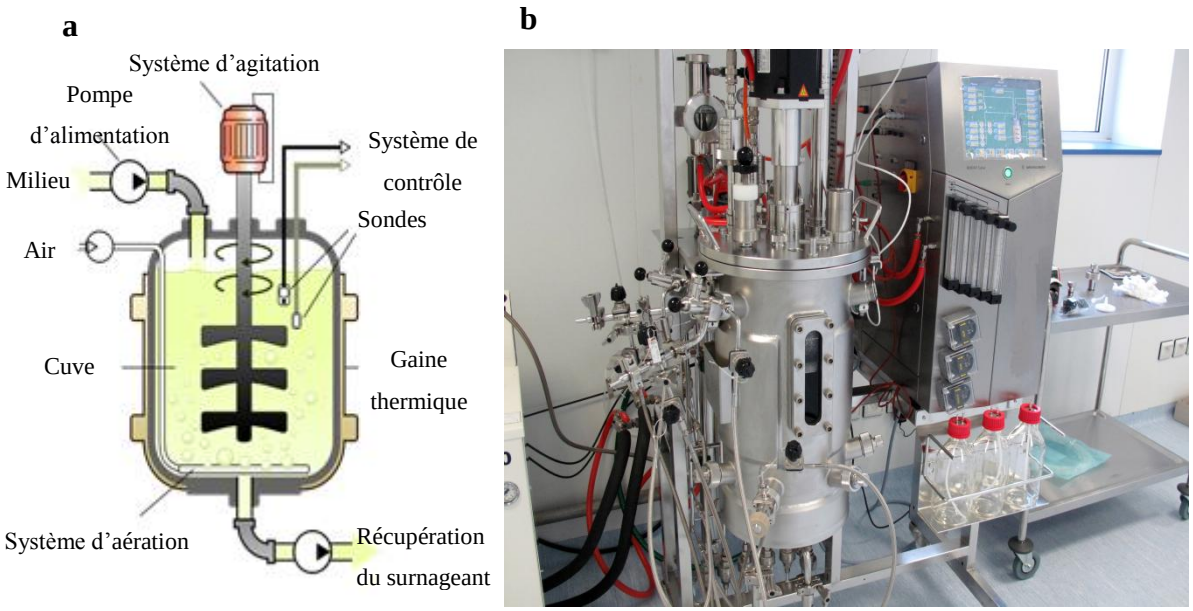



**Figure 23: a : Principe d'un STR. b : Bioréacteur Inox 30 L Biostat Sartorius.**

Ces fermenteurs offrent une bonne diffusion de l'oxygène, une grande flexibilité en termes de volume de travail (jusqu'à 15 000 L) ou encore la possibilité d'utiliser divers modes d'alimentation. De plus, les STR permettent d'optimiser les conditions de culture en contrôlant certains paramètres tels que la température, le pH, le taux d'oxygène dissous DO (pour « Dissolved Oxygen »), l'agitation et l'aération. Ce contrôle des conditions de cultures assure une production sûre et fiable en anticorps monoclonal.

Enfin, les plateformes de production utilisant ces procédés de production peuvent être plus rapidement agréés par les autorités réglementaires étant familiarisées avec cette technologie.

### b. Bioréacteur de type « air lift »

Ce type de bioréacteur (voir Figure 24) est fréquemment employé pour la culture de cellules animales. Contrairement aux STR qui utilisent une agitation mécanique à l'aide de pâles, les bioréacteurs de type « air-lift » exploitent un courant gazeux ascendant combinant ainsi l'agitation et l'aération. Ils sont généralement préférés lorsque les lignées cellulaires sont particulièrement sensibles aux effets de cisaillement dus à l'agitation mécanique. D'autre part, en comparaison avec les STR, le transfert d'échelle ainsi que le processus de stérilisation est plus simple, suite à l'absence de pièces mobiles et de joints mécaniques [43].

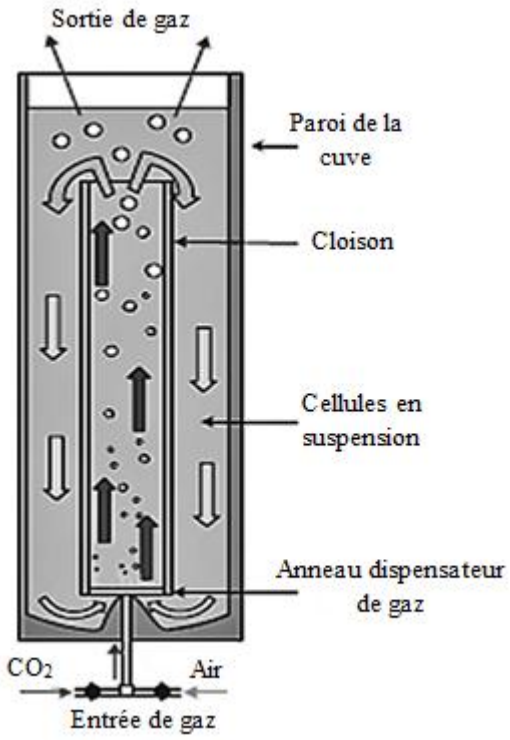



**Figure 24 : Bioréacteur « air lift ».**

Néanmoins, ils sont généralement moins utilisés que les STR en raison notamment de la faible capacité maximale du volume de travail (jusqu'à 2000 L).

### c. Bioréacteur jetable

Un bioréacteur jetable est une chambre de culture stérile en matériel polymérique, pré-stérilisée par des rayonnements gamma, à usage unique. L'intérêt des industriels pour le jetable s'est fortement accru ces dernières années. Leurs utilisations permettent de diminuer le temps entre deux productions en diminuant la durée ou en éliminant certaines étapes telles que le nettoyage et la stérilisation. De plus, cela diminue le risque de cross-contamination entre deux productions et réduit l'investissement des équipements et des installations associés aux bioréacteurs classiques [45]. La validation des procédés de production est également facilitée en raison de l'élimination des étapes de stérilisation et de nettoyage, ce qui réduit le nombre d'outils à suivre et à tracer.

Par contre, le volume de travail est le principal inconvénient des bioréacteurs jetables ; c'est pourquoi ils sont généralement utilisés à petite échelle lors de l'expansion des cultures et de l'ensemencement des bioréacteurs de grande échelle. Néanmoins, des bioréacteurs avec une

capacité de 2000 L sont actuellement sur le marché, combinant les avantages des STR et des bioréacteurs jetables.

Parmi les bioréacteurs jetables, le bioréacteur « wave-bag » (voir Figure 25) est fréquemment utilisé. Il exploite un système d'agitation par vagues qui assure une bonne distribution des nutriments et un meilleur transfert de l'oxygène dû au renouvellement constant de la surface d'échange [45]. De plus, contrairement aux bioréacteurs à agitation mécanique, l'effet de cisaillement est absent. Ce système assure également l'apport en oxygène et le contrôle de la température et de la teneur en $CO_2$ de la culture.

**Figure 25 : Bioréacteur « wave bag ».**

La combinaison de ces avantages fait du bioréacteur « wave bag » un système de production très apprécié chez les industriels. Cependant, le volume de travail est limité, avec actuellement un maximum de 650 L. Ces bioréacteurs sont donc généralement exploités lors des phases d'études cliniques.

### d. Culture en perfusion

L'intérêt des cultures en perfusion porte essentiellement sur le maintien d'une haute concentration (20 $x10^6$ cellules /mL) de biomasses sur une longue période (deux semaines). Un équipement spécifique est nécessaire pour réaliser ce type de culture puisque la rétention des cellules est indispensable. Plusieurs technologies sont disponibles telles que la micro ou ultrafiltration, la centrifugation continue à l'aide d'un filtre rotatif « spin-filter » (voir Figure 26) ou encore la sédimentation gravitationnelle [46].

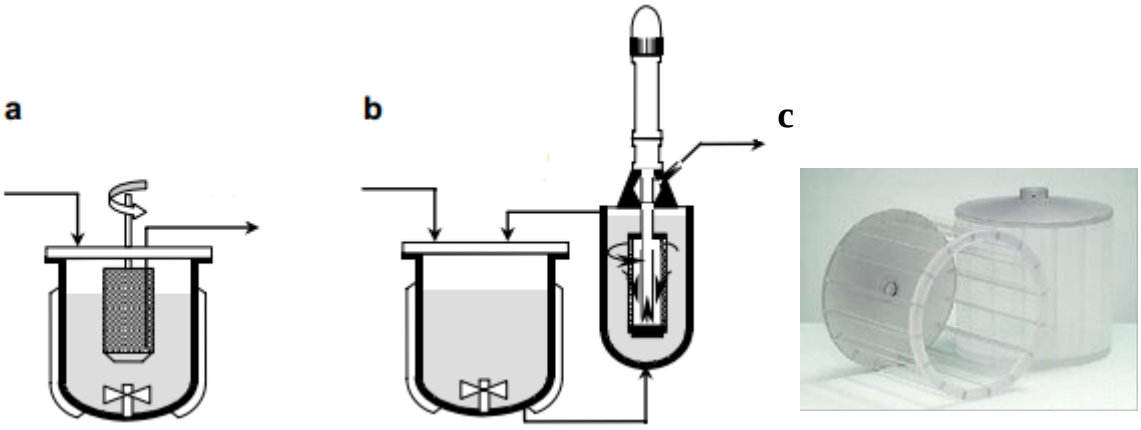



**Figure 26 : Représentation schématique d'un procédé de culture par perfusion à l'aide d'un filtre rotatif. a : « spin-filter » interne ; b: « spin-filter » externe ; c : « spin-filter ».**

## 2. Culture en adhérence

La culture de cellules adhérentes est moins répandue que celle de cellules en suspension dans le monde pharmaceutique. Cependant, par des efforts continus de la part des industriels, des procédés à haute concentration cellulaire ont vu le jour. L'exploitation de cellules adhérentes a l'avantage d'éliminer l'étape d'adaptation en suspension et l'effet de cisaillement dû à l'agitation mécanique et de faciliter l'extraction (les cellules étant immobilisées). L'inconvénient majeur de ce procédé concerne le faible ratio volume / surface ; il limite les capacités d'augmentation d'échelle et nécessite généralement une optimisation. La culture de cellules en adhérence est particulièrement bien adaptée au mode perfusion puisque l'immobilisation des cellules facilite leur rétention. Ce procédé permet d'atteindre des VCC élevées sur de longues durées.

### a. Bioréacteurs à fibres creuses

Les bioréacteurs à fibres creuses (voir Figure 27) sont principalement exploités pour la production d'Acm, en mode perfusion de préférence. Ce procédé tente de reproduire les conditions environnementales *in vivo* des cellules [43]. Les cellules cultivées à haute densité sont immobilisées à l'intérieur de milliers de fibres organiques creuses contenues dans des cartouches. L'alimentation s'effectue au travers des membranes semi-perméables des fibres. Le milieu de culture est conservé dans un réservoir puis propulsé à l'aide de pompes dans la cartouche. Il assure l'apport en oxygène, en nutriments, et l'élimination des déchets.

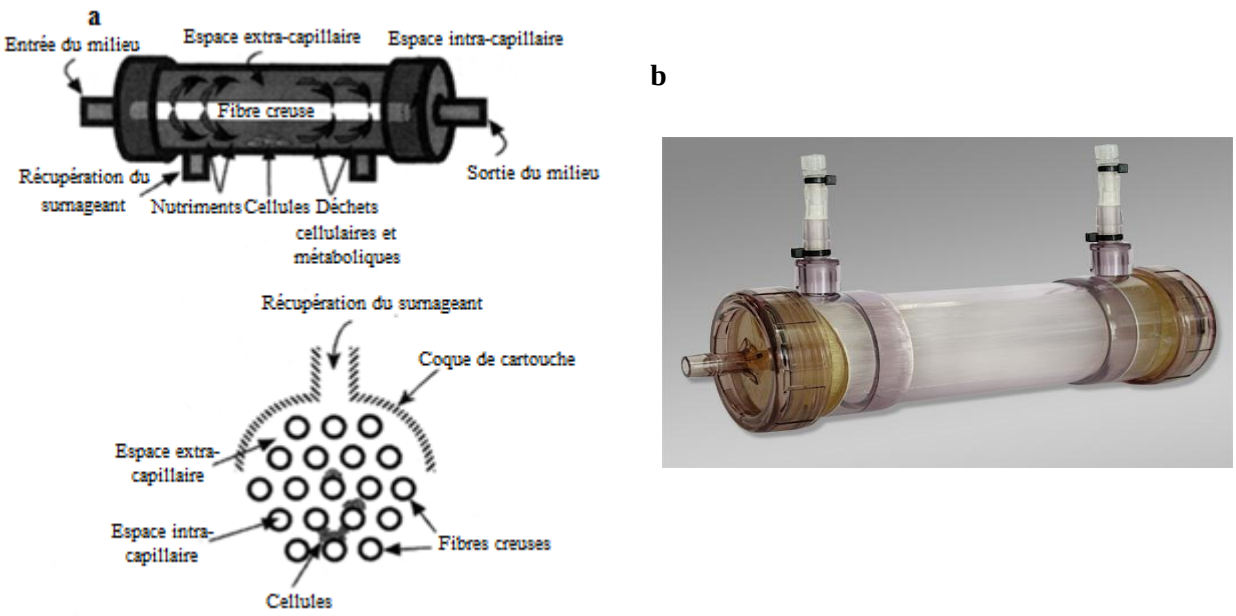



**Figure 27 : a : Schéma détaillé d'un bioréacteur à fibres creuses. b : illustration d'un bioréacteur à fibres creuses Zymax® [48].**

Ce système est idéal pour atteindre des concentrations cellulaires élevées (0.5–5 g/L) et donc des quantités importantes en produits d'intérêt [47]. Outre l'intérêt d'éliminer les effets de cisaillements, l'utilisation de membrane semi-perméable a pour avantage de conserver les produits sécrétés par les cellules dans le milieu environnant, les isolant ainsi des contaminations issues du milieu de culture. Cependant, les déchets cellulaires issus d'apoptose ou de nécrose sont également retenus impactant négativement sur la croissance de la culture et sur le processus de purification. De plus, l'augmentation d'échelle des bioréacteurs à fibres creuses est laborieuse, coûteuse et elle rencontre généralement des problèmes techniques comme un contrôle inadéquate de la supplémentation.

### b. Bioréacteur à lit fixe

Le bioréacteur à lit fixe (voir Figure 28) est un bioréacteur formé d'un empilement de porteurs compris entre deux grilles. Les cellules sont immobilisées à l'intérieur de porteurs entre lesquels s'écoule le milieu de culture. Ce dernier apporte les nutriments nécessaires aux cellules et élimine les métabolites toxiques produits aux cours des cultures, maintenant ainsi un milieu propice à la production d'anticorps thérapeutiques. La circulation du milieu à travers l'ensemble du bioréacteur est assurée à l'aide d'une pompe.

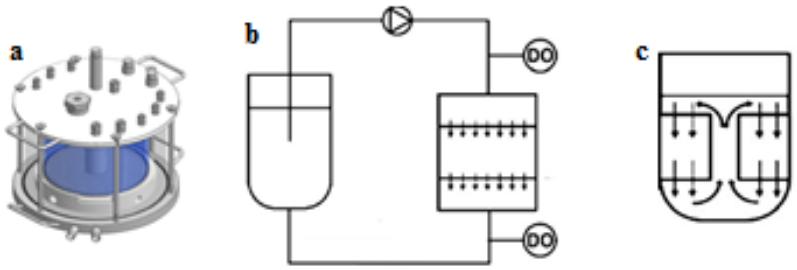



**Figure 28 : a : Illustration d'un bioréacteur à lit fixe. Représentation schématique d'un bioréacteur à lit fixe : b : externe et c : interne.**

Différentes supports d'immobilisation des cellules ont été testés. Certains, comme les billes poreuses en verre, ne permettent pas d'atteindre de hautes VCC (principalement dû à une limitation de transfert de l'oxygène) [43]. Une nouvelle génération de matrice a donc vu le jour avec une porosité plus élevée : fibres en verre, matrice en céramique, matrice de fibres en polyester non tissés.

Tous ces systèmes ont montré un potentiel certain pour la production de protéines recombinantes car ils disposent de nombreux atouts :

- une porosité élevée.
- un ratio volume/surface optimisé.
- peu d'effets de cisaillement, favorisant l'emploi de milieux dépourvus de sérum.
- facilité d'utilisation.
- peu onéreux.
- diminution du risque de contamination par le milieu suite à la rétention des cellules, facilitant l'étape de purification.

Cependant, des problèmes de colmatages, d'hétérogénéité dans la culture (apparition de gradients de concentrations cellulaires) et de transfert d'oxygène limité sont régulièrement observés pendant les cultures. Ces deux derniers, en particulier, posent des difficultés lors de l'augmentation d'échelle du bioréacteur. Le diamètre du lit et sa profondeur sont limités (2 m et 30 cm respectivement) afin de maintenir une distribution uniforme des nutriments. Par conséquent, le volume maximal atteint à ce jour est de 30 L [43].

### c. Bioréacteur à microporteurs

Le développement des microporteurs est une découverte décisive pour la culture de cellules immobilisées. Ce sont des particules microscopiques pouvant être maintenues en suspension dans un milieu de culture. Ainsi, ce procédé augmente la surface d'adhérence et de croissance, impactant significativement sur la VCC et la productivité [49].

Les caractéristiques de ces particules, comme la taille, la densité, la charge à la surface sont primordiales pour leur application dans les procédés industriels. La surface de croissance est inversement proportionnelle à la taille des particules. Donc il est recommandé d'employer des particules de petites tailles, non toxiques, autoclavables, avec de bonnes propriétés d'adhésion, et garantissant des résultats fiables et répétables.

Des matériaux de toutes sortes ont été testés (dextrane, plastique, gélatine, verre, collagène, silicone et cellulose). Par conséquent, une grande variété de microporteurs est maintenant disponible sur le marché. Le choix doit être effectué suivant la lignée cellulaire sélectionnée et l'objectif de la culture.

Aujourd'hui, la préférence est donnée aux porteurs macroporeux, contrairement aux porteurs microporeux, ils ont une porosité très élevée, favorisant ainsi la colonisation interne des particules par les cellules. La surface de croissance en est considérablement accrue, améliorant alors la VCC et la productivité. D'autre part, les macropores fournissent une protection vis-à-vis des effets de cisaillements.

Les microporteurs sont principalement maintenus dans des erlenmeyers agités puis transférés dans des bioréacteurs à plus grande échelle. Le transfert d'échelle se réalise par ajout de particules dans une culture en cours. La colonisation des nouveaux microporteurs par les cellules s'effectue par simple contact des particules ou par détachement des cellules. Cette dernière méthode nécessite un milieu pauvre en calcium, ou un changement du pH pour certaines lignées cellulaires ou encore l'utilisation de trypsine et d'EDTA [43].

Des enzymes protéolytiques peuvent être utilisées pour détacher les cellules dans le cas où les produits d'intérêts ne sont pas sécrétés. Elles ne sont généralement pas nécessaires pour la production de protéines sécrétées tels que les Acm.

Le STR (voir Figure 29) correspond au bioréacteur le plus exploité pour la culture par microporteurs. La quantité de ces derniers diffère suivant le mode de culture. La culture en fed-batch et en perfusion favorise l'utilisation de grande quantité de microporteurs. La culture en perfusion est le mode le plus fréquemment employé puisque les particules peuvent être facilement retenues, par l'utilisation de « spin-filter » par exemple. L'agitation reste le principal problème. Elle est nécessaire pour assurer une bonne diffusion de l'oxygène mais une trop forte agitation peut induire un détachement des cellules et leur causer des dommages.

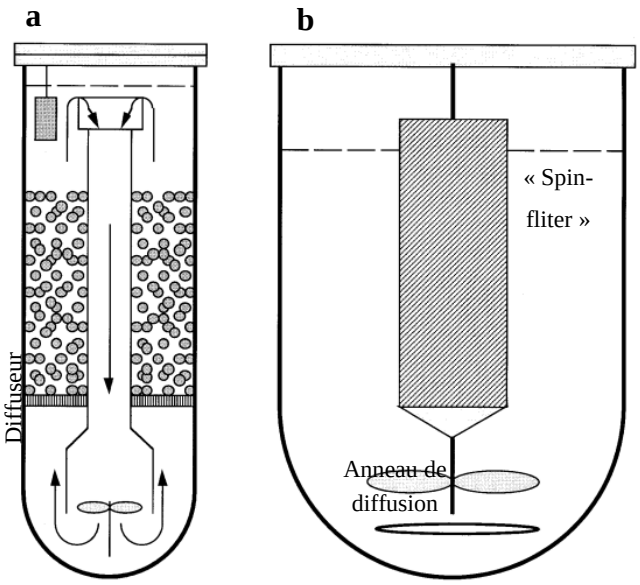



**Figure 29 : Illustration schématique : a : Bioréacteur à lit fluidisé. b : STR [49].**

Le bioréacteur à lit fluidisé (voir Figure 29) est également un système très utilisé. Certaines études ont démontré que ce dernier a un plus grand potentiel pour la production de produits thérapeutiques que le STR [49]. En effet, il permettrait de charger une plus grande quantité de microporteurs dans le bioréacteur. De plus, avoir le diffuseur d'oxygène et l'agitation isolé de de la biomasse cause un stress moins important aux cellules. Par contre, à une plus grande échelle, l'agitation et l'aération du milieu peuvent devenir problématiques.

## 3. Paramètres physico-chimiques des bioréacteurs

La régulation des paramètres physico-chimiques fait partie intégrante du bioréacteur. Les cellules ont des besoins spécifiques en terme de nutrition mais elles sont également exigeantes vis-à-vis des conditions physico-chimiques de leur environnement. Il est donc nécessaire d'améliorer ces différents paramètres afin de garantir des conditions de cultures optimales.

### a. pH

Le pH est un paramètre essentiel pour assurer une bonne croissance cellulaire et une bonne production. Les cellules sont généralement cultivées dans un pH proche de celui dans lequel elles évoluaient *in vivo*. Le pH idéal est différent si la cellule est une bactérie, une levure ou une cellule de mammifère. Les cellules CHO sont fréquemment cultivées à un pH compris

entre 7 et 7,2. Néanmoins, il est nécessaire de réaliser une évaluation approfondie pour déterminer quel pH est le plus favorable.

Au cours de la culture, l'activité métabolique des cellules modifie le pH du milieu. L'activité des cellules CHO, par exemple, a tendance à alcaliniser le milieu de culture. Des systèmes de tampon ont donc été ajoutés aux milieux afin de limiter ces variations de pH (cf III.B.1.a). Cependant, ils ne sont généralement pas suffisants pour éviter d'importantes modifications du pH. Ce dernier peut alors être régulé par l'apport de solutions basiques ou acides à l'aide de pompes. L'apport du $CO_2$ est également un excellent moyen pour acidifier le milieu :

$$CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow HCO_3^- + H^+ \rightarrow CO_3^{2-} + 2H^+$$

Il est plus difficile de maintenir le pH constant lors de cultures de grands volumes car le temps d'équilibrage du pH est plus long.

**b. Oxygène dissous**

L'oxygène est un élément indispensable pour la survie et la bonne croissance des cellules de mammifères. Le rôle de l'oxygène est assez complexe, il est notamment nécessaire à la production de l'énergie lors de la phosphorylation oxydative. Cependant, il a l'inconvénient d'être responsable de la formation de radicaux libres [54].

L'oxygène est un gaz peu soluble. Son transfert est généralement un facteur limitant les performances des procédés de production, en particulier lors des cultures de haute densité.

La DO est généralement maintenue à une valeur bien spécifique, entre 20 et 50 % [11]. Une valeur de consigne plus faible mène à une synthèse excessive de lactate, toxique pour les cellules tandis qu'une valeur trop élevée peut être cytotoxique ou peut impacter directement sur la qualité du produit en diminuant le pourcentage de glycosylations.

La concentration en oxygène dissous résulte de la combinaison de phénomènes biologiques (consommation d'oxygène par la biomasse) et des dynamiques de transfert (matière, quantité de mouvement). Il existe plusieurs méthodes pour augmenter le transfert de l'oxygène :

- en augmentant le débit d'aération.
- en augmentant le pourcentage d'oxygène pendant l'aération.
- en changeant le dispositif d'aération
- en augmentant la vitesse d'agitation des pales.

Le transfert d'oxygène kla (exprimé en $h^{-1}$) peut être quantifié et analysé. Voici deux relations pour sa prédiction [55] :

- pour l'eau (milieu coalescent) :

$$k_l a = 2{,}6.10^{-2}\left(\frac{P_g}{V_l}\right)^{0,4} {u_g}^{0,5}$$

- pour des solutions salines (milieux non coalescents) :

$$k_l a = 2.10^{-3}\left(\frac{P_g}{V_l}\right)^{0,7} {u_g}^{0,2}$$

où $P_g$ est la puissance mécanique consommée en présence d'une aération (w), $V_l$ est le volume de liquide ($m^3$), $u_g$ la vitesse superficielle du gaz ($m.s^{-1}$).

Une méthode expérimentale peut également être utilisée. Pour cela, une série d'étapes est nécessaire :

- parvenir à une DO de 0% à l'aide de l'azote.
- mise en route de la régulation de la DO avec une valeur de consigne de 100%.
- collecte des valeurs de DO au cours du temps.
- réaliser un graphique avec y en ordonnée et le temps en abscisses.

$$y = \frac{Ln\ (DO_{saturation}\ - DO)}{Ln\ (Do_{saturation})}$$

- la pente de la courbe correspond au négatif du kla (-kla).

### c. Dioxyde de carbone dissous

Lorsque le $CO_2$ dissous atteint des concentrations supérieures à 120 mmHg, le risque d'une inhibition de la croissance et une altération du produit augmente [11]. Bien qu'il existe des sondes « on line » disponibles sur le commerce, le $CO_2$ dissous est généralement mesuré « off line ».

L'ajout de $CO_2$ est employé pour réguler le pH du milieu (cf IV.A.4.a).

### d. Osmolalité

L'osmolalité représente le nombre de particules osmotiquement actives par kg d'eau. Sa valeur tient compte essentiellement du capital sodé, ainsi que des molécules comme le glucose et l'urée, qui sont des substances osmotiquement actives, capables d'attirer et de piéger l'eau. La plus part des milieux de culture sont élaborés pour avoir une osmolalité compris entre 270 –

330 mOsm/kg [11]. L'osmolalité est régulièrement analysée « off line » en utilisant un osmomètre (mesure du point de congélation de l'échantillon par exemple : plus le point de congélation est bas, plus l'osmolalité est élevée). L'osmolalité augmente au cours de la culture avec la production de métabolites tels que le lactate et l'ammonium. L'impact de l'osmolalité sur la culture est lignée cellulaire-dépendant. Une augmentation importante entraîne une inhibition de la croissance. Ces effets délétères peuvent être amplifiés par une concentration trop élevée du $CO_2$ dissous, notamment lors de cultures à haute densité.

**e. Température**

La température est également un paramètre à prendre en compte pour assurer des conditions de culture optimales. La température choisie dépend essentiellement de l'origine de la lignée cellulaire sélectionnée. Les cellules CHO par exemple, sont généralement cultivées à une température de 37 °C. Une variation de quelques degrés peut avoir un impact significatif sur la culture. Généralement, une température basse réduit la vitesse de croissance sans pour autant diminuer la viabilité tandis qu'une température élevée réduit rapidement la viabilité des cellules. Les milieux de culture doivent être pré-chauffés avant le début de la culture afin de ne pas inhiber la croissance des cellules.

Certains procédés industriels diminuent la température en cours de culture afin de maintenir la viabilité. La température peut par exemple, être abaissée post-inoculation à 30-35 °C pour retenir les cellules en phase G et retarder l'apoptose [11]. Elle peut également être abaissée en fin de culture pour maintenir la viabilité des cellules et pour stimuler la productivité.

**f. Stress hydrodynamique**

Les cellules subissent un stress hydrodynamique constant pendant une culture, qui s'il devient trop important, peut être délétère vis-à-vis des cellules : diminution de la vitesse de croissance et morts cellulaires [55].

Aux vitesses de rotation généralement utilisées en culture cellulaire, l'écoulement de la phase liquide est dit turbulent. Un écoulement turbulent désigne l'état d'un fluide, liquide ou gaz, qui présente en tout point un caractère tourbillonnaire : tourbillons de dimension $\lambda$. Le régime turbulent se caractérise par des mouvements dans toutes les directions et donc par un bon mélange du milieu. On sait que l'écoulement est dit turbulent lorsque le nombre de Reynolds (Re) atteint un certain seuil :

- Re > 10 000 pour les mobiles à débit radial.
- Re > 100 000 pour les mobiles à débit axial.

$$Re = \frac{D^2 N}{\mu}$$

où D est le diamètre du mobile d'agitation (m), tournant à une vitesse N ($s^{-1}$) et μ la viscosité cinématique du fluide ($m^2/s$).

La plus petite dimension λ des tourbillons, correspondant à l'échelle de Kolmogorov notée $I_k$, varie en fonction de la vitesse d'agitation et du mode d'agitation [55]. Cette variation de la dimension $I_k$ est directement corrélée au stress hydrodynamique que subissent les cellules ; deux évènements peuvent se produire :

- les cellules sont de tailles inférieures à $I_k$ : elles sont alors entraînées par le mouvement turbulent sans subir de contraintes.
- les cellules sont de tailles supérieures à $I_k$ : il y a alors dissipation de l'énergie au niveau de leur membrane, provoquant la mort cellulaire.

$$I_k = \frac{\rho v}{\mu}$$

où ρ est la densité du fluide, v est la vitesse caractéristique du fluide (m/s) et μ la viscosité cinématique du fluide ($m^2/s$).

Les principaux facteurs impliqués sont le mode d'agitation (débit radial ou axial) et la vitesse d'agitation. Ce dernier paramètre doit être soigneusement déterminé afin d'assurer une homogénéisation optimale du milieu (biomasse, gaz, température, pH) tout en évitant la formation de mousse et les dommages aux cellules.

**g. Mousse**

Un problème majeur des processus aérobies est la formation de mousse. Cette dernière peut entraîner le débordement du réacteur, ce qui induit des problèmes de pertes de produits et de stérilité. Les principaux facteurs de formation de mousse sont l'aération et l'agitation.

Des agents anti-mousses sont alors employés mais ces derniers tendent à réduire le transfert d'oxygène, même à de faibles concentrations. C'est le cas du propylène glycol, de silicone ou d'huile de soja.

## 4. Caractérisation des bioréacteurs

Les bioréacteurs sont constitués d'un ensemble d'éléments plus indispensables les uns que les autres. Ces derniers sont soigneusement sélectionnés par l'industriel dans le but d'élaborer un bioréacteur performant et compatible avec la lignée productrice. Ces supports de production nécessitent d'être caractérisés afin d'améliorer l'efficacité et la fiabilité du procédé et pour comprendre dans quelle mesure le process affecte le produit.

### a. Agitation

L'agitation est une opération dont l'objectif est l'homogénéisation du milieu en éliminant les gradients de concentrations ou de température. Elle est également nécessaire au transfert d'oxygène par l'aération du milieu. Il est recommandé que le temps d'homogénéisation soit inférieur à 1 min pour des cellules de mammifères afin d'éviter un changement du métabolisme. Différents modes d'agitation ont été développés pour répondre aux besoins des industriels.

Le procédé le plus courant correspond à un agitateur fixé à l'extrémité d'un axe, positionné au centre du bioréacteur. Selon l'agitateur, le mouvement peut être radial ou axial [36]. Le choix de l'agitation dépend de plusieurs paramètres (voir Tableau 7).

**Tableau 7 : Paramètres à prendre en compte suivant le mode d'agitation.**

| | Flux radial | Flux axial |
|---|---|---|
| **Efficacité mélange gaz-liquide** | +++ | + |
| **Efficacité mélange solide-liquide** | + | +++ |
| **Cisaillement** | +++ | + |
| **Application** | Levures, Bactéries | Cellules de mammifères |

La turbine Ruhston fournit un flux radial (voir Figure 30), responsable d'une grande turbulence et d'une forte consommation d'énergie. Assurant un flux axial, l'hélice de type marine (voir Figure 31) garantit une turbulence moins violente, donc plus favorable pour les cellules sensibles comme les cellules de mammifères. De plus, pour un débit identique, la consommation en énergie est moins élevée. D'autre part, il est recommandé d'utiliser des pales de diamètre correspondant au tiers du diamètre de la cuve.

a b

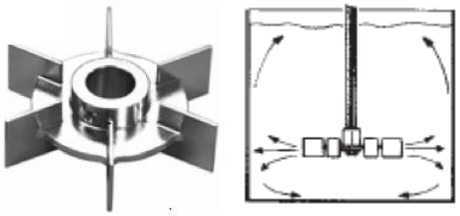


**Figure 30 : a : Turbine Ruhston. b : Flux radial.**

a b

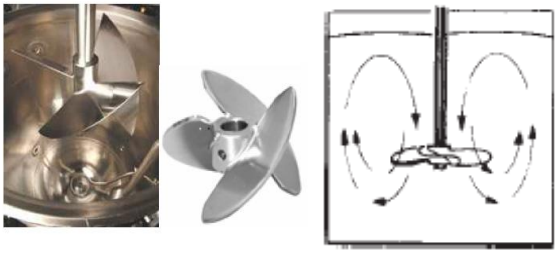


**Figure 31 : a : Hélice marine. b : Flux axial.**

Il existe également d'autres modes d'agitation :

- par un courant gazeux ascendant, responsable de l'agitation et de l'aération (cas du bioréacteur air lift).
- par un mouvement de type vague (cas du bioréacteur « wave bag »).

Ces deux modes d'agitation sont particulièrement adaptés pour les cellules de mammifères.

**b. Aération**

Plusieurs technologies sont actuellement disponibles. Les plus répandues sont constituées d'un dispositif d'aération placé à l'intérieur du bioréacteur émettant des bulles (voir Figure 32) : « ring sparger », « sparger poreux » (frittés) [36]. Les bulles émises par les dispositifs poreux sont plus petites, améliorant ainsi le transfert de l'oxygène. Par contre, elles peuvent être délétères pour les cellules en induisant la lyse lors de leur éclatement (cf IV. A.4.f. Stress hydrodynamique).

De nouveaux systèmes s'appuyant sur l'utilisant de membranes poreuses sont également présents sur le marché [36]. Ce dispositif diffuse de l'oxygène à travers une membrane hydrophobe (téflon, polypropylène, silicone), sans aucune émission de bulle.

a b

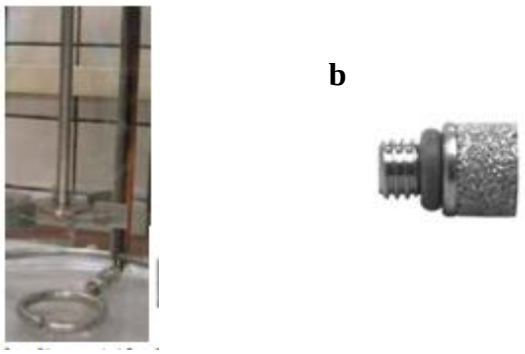


**Figure 32 : a : « Ring sparger ». b : « Sparger poreux ».**

### c. Sondes

Les mesures sont réalisées de préférence en temps réel ; cela permet d'analyser en continu et de rétroagir rapidement sur le procédé.

Les sondes doivent généralement faire face à plusieurs difficultés :

- soutenir les cycles de stérilisations et les chocs thermiques.
- maintenir la stabilité sur le long terme. La recalibration est très délicate voire impossible pendant les cultures.
- éviter les contaminations.
- mesurer sur une grande échelle.

#### ❖ *pH*

La mesure du pH est une mesure potentiométrique. Son fonctionnement est basé sur le rapport qui existe entre la concentration en ions $H_3O^+$ et la différence de potentiel électrochimique qui s'établit dans le pH-mètre une fois plongé dans la solution étudiée.

La calibration doit être effectuée avant chaque utilisation. Il existe différentes sondes à pH selon la nature de l'électrolyte : liquide pressurisée ou gel pressurisé.

#### ❖ *Température*

Deux systèmes de mesure de température peuvent être utilisés par les industriels : le thermocouple et la sonde de température à résistance (RTD, pour « resistance temperature detectors). Ce dernier est généralement préféré pour la mesure de température lors de culture cellulaire en bioréacteur :

- la fourchette de mesure est suffisante : -200 à 500 °C.
- ils ont une précision et une stabilité supérieure aux thermocouples dont la mesure peut dévier après quelques heures d'utilisation. C'est principalement la raison pour laquelle les RTD sont choisis au détriment des thermocouples.

Par contre, le diamètre du capteur du RTD est plus élevé et l'intervalle réponse-temps est également supérieur (2,5 à 10 s contre une fraction de seconde pour les thermocouples).

#### ❖ *Oxygène dissous*

Une sonde de mesure de DO est régie par un principe physico-chimique : réduction de l'$O_2$ à la surface d'un métal noble. Elle est constituée:

- d'un couple d'électrodes polarisables séparés du milieu par une membrane de polymère perméable au gaz.

- d'une anode et d'une cathode qui sont immergées dans un électrolyte formant un film de faible épaisseur entre la membrane et la cathode. L'$O_2$ diffusant à travers la membrane est réduit au contact de la cathode sous l'effet du potentiel de polarisation. Cette réaction électrochimique induit un courant proportionnel à la quantité d'$O_2$.

Il existe deux types de sondes électrochimiques [50] :

- polarographique : réaction à l'anode : $4\ Ag + 4\ Cl^- \rightarrow 4\ AgCl + 4\ e^-$.
- galvanique : réaction à l'anode : $2\ Pb + 4\ OH^- \rightarrow 2\ PbO + 2\ H_2O + 4\ e^-$.

Voici la réaction à la cathode : $O_2 + 2\ H_2O + 4e^- \rightarrow 4\ OH^-$.

La calibration doit être réalisée dans des conditions identiques de température et de pression que celles du procédé. Elle doit également être réalisée après stérilisation, dans un milieu saturé en air et avant l'inoculation. Le 0% est réalisé à l'aide d'un milieu dépourvu d'$O_2$ ou d'un gaz ($N_2$).

❖ ***Mousse***

Une sonde mesurant le niveau de formation de mousse dans le bioréacteur est indispensable pour chaque procédé de culture cellulaire à haute densité cellulaire.

❖ ***Sondes de mesures de densité cellulaire***

- NIR pour « Near Infra Red »

Cette sonde permet de mesurer la concentration en cellules totales ainsi que la concentration de certains composés chimiques. L'analyse s'effectue à l'aide d'une lampe LED fonctionnant à une longueur d'onde de 850 nm, mesurant l'absorbance et la diffusion.

- Capacitance

Une corrélation a été démontrée entre le volume de la biomasse vivante et la variation de la permittivité diélectrique du milieu [51].

Sous l'influence d'un champ électrique induit par une paire d'électrodes, les cellules se comportent comme des condensateurs : les cellules aux membranes plasmiques intactes sont polarisées. La capacitance est mesurée à l'aide d'une deuxième paire d'électrodes qui est corrélée avec précision à la concentration de biomasse vivante.

Cette technologie est insensible aux débris cellulaires, aux bulles d'air et autres particules en suspension.

### d. Cuve

La cuve est un facteur à prendre en compte lors du choix du bioréacteur. Plusieurs caractéristiques doivent être considérées :

- le matériau utilisé : acier inoxydable, verre, polymère.
- hauteur de la cuve / diamètre de la cuve.
- volume de travail / volume total.
- surface d'échange gazeuse / volume de travail.

### e. PID (« pour Proportionnel Intégral Dérivé »)

Un bioréacteur est constamment associé à un contrôleur qui est une unité électronique nécessaire au réglage et à la régulation des différents paramètres physico-chimiques. Il analyse les données enregistrées par les différents capteurs et réagit en conséquent pour ajuster les déviations.

Afin d'obtenir un réajustement optimale des valeurs cibles, les contrôleurs sont équipés de correcteurs PID. C'est un système d'auto régulation qui cherche à réduire l'erreur entre la consigne et la mesure [52]. Il permet d'atteindre la valeur de consigne (pH, DO, température) le plus rapidement possible avec le minimum de perturbations. Exemple :

$$\overbrace{u(t) = Kp \times e(t)}^{P} + \overbrace{Ki \times \int_0^t e(\tau) d_\tau}^{I} + \overbrace{Kd \times \frac{\vartheta e(t)}{\vartheta t}}^{D}$$

$$u(p) = e(p) \times (Kp + \frac{Ki}{p} + Kd \times p)$$

où u correspond à la commande et e = consigne ─ mesure.

Le réglage d'un PID consiste à trouver les meilleurs coefficients Kp, Ki et Kd dans le but d'obtenir une réponse optimale du procédé et de la régulation [53]. L'objectif est d'être robuste, rapide et précis. Il existe plusieurs méthodes pour régler les correcteurs mais la méthode de Ziegler-Nichols est la plus répandue. Elle a l'avantage de ne pas nécessiter de modélisation précise du système, mais se contente d'essais expérimentaux, ce qui rend cette méthode très simple.

## B. Transfert d'échelle

Que ce soit pour les essais cliniques ou pour la commercialisation, une quantité élevée d'Acm est requise. La production en parallèle de plusieurs systèmes à petite échelle est coûteuse et nécessite beaucoup de main d'œuvre. L'augmentation de la taille des systèmes de production est le procédé le plus simple et le moins coûteux à réaliser. Cependant, il est impossible de dupliquer un modèle de petite échelle en un modèle identique de plusieurs milliers de $m^3$. Il est donc nécessaire de modifier et d'adapter le bioréacteur pour atteindre des performances optimales à plus grande échelle.

### 1. Principes généraux

Le transfert d'échelle de procédés de culture cellulaire consiste à transposer un procédé établi d'un réacteur vers un réacteur de capacité supérieur. L'unique contrainte est de produire à une plus grande échelle une quantité et une qualité de la molécule identique.

Les STR sont les bioréacteurs les plus couramment employés à grande échelle, du fait des nombreuses informations et connaissances accumulées durant les dernières décennies. L'utilisation de ce type de bioréacteur facilite généralement l'obtention des AMM pour la commercialisation de produits issus de cultures cellulaires.

### 2. Problèmes rencontrés lors du transfert d'échelle

Les cellules de mammifère sont généralement considérées comme des cellules difficiles à transférer. Cela est dû à leur fragilité vis-à-vis aux changements des conditions de culture.

A la différence des cultures microbiennes qui utilisent des « power inputs » élevés (puissance nécessaire au fonctionnement du moteur), la culture de cellules animales exploite des « power inputs » relativement bas. La principale raison est l'absence de paroi cellulaire qui protège la cellule des forces de cisaillements présentes lors de vitesses d'agitation élevées. Le stress hydrodynamique a longtemps été considéré comme la principale difficulté rencontrée lors du transfert d'échelle des cellules de mammifères. Cependant, l'utilisation de surfactants comme le Pluronique-F68, a fortement diminué l'impact du stress hydrodynamique [56].

Deux autres difficultés apparaissent lors du transfert d'échelle : l'homogénéité de la culture et le transfert d'oxygène [57]. Ces deux paramètres sont particulièrement difficiles à maintenir lors de cultures de plusieurs milliers de litres, notamment si la vitesse d'agitation est limitée. Il en résulte généralement la formation de gradients de concentration de pH et de nutriments

dans les bioréacteurs de grande échelle. Ces gradients ont tendance à limiter la croissance cellulaire et la productivité.

L'accumulation de $CO_2$ dissous est une autre conséquence de l'augmentation d'échelle. Cette accumulation a un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire, sur la productivité et sur la qualité du produit, notamment au niveau des glycosylations. Son élimination dépend d'un certain nombre de facteurs tels que la concentration en bicarbonate, le débit d'air, la vitesse d'agitation, la taille des bulles et le type de rotor [11]. Il est aisé, à petite échelle, d'éliminer le $CO_2$ car une faible vitesse d'agitation est généralement suffisante lorsqu'elle est associée à un ratio surface du liquide / volume élevé ; ce qui est le cas avec des bioréacteurs de 3 à 20 L. Cependant, à une plus grande échelle, le « power input » et le ratio surface du liquide / volume sont plus faible et donc insuffisant.

## 3. Stratégies

Certains paramètres tels que la DO, le pH et la température sont volume indépendant et la valeur de consigne fixée sur les modèles de petites échelles reste similaire. Par contre, des paramètres comme le débit d'air, la vitesse d'agitation, le volume de milieu à ajouter en cours de culture nécessitent un ajustement. Cela peut alors entraîner des problèmes d'homogénéisation, de transfert d'oxygène et une augmentation du stress hydrodynamique [58]. L'objectif est de conserver, d'une échelle à l'autre, une quantité et une qualité des anticorps produits identiques.

Une stratégie communément employée par les industriels est d'augmenter proportionnellement les paramètres volume dépendant tel que le volume de « feed ». Par contre, certains paramètres ne peuvent pas être augmentés de façon proportionnelle sans dépasser les limites du bioréacteur ou provoquer des dommages irréversibles à la culture (vitesse d'agitation par exemple) [11].

De nombreux paramètres sont inter-dépendants, la modification d'un paramètre a un impact sur les autres facteurs, augmentant ainsi la complexité du transfert d'échelle.

L'agitation et l'aération sont les deux principaux éléments à maîtriser pour atteindre des performances comparables à différentes échelles.

L'agitation est un paramètre particulièrement délicat à modifier puisque l'augmentation de sa vitesse entraîne rapidement un accroissement des forces de cisaillements. Cependant, son optimisation est nécessaire et plusieurs éléments peuvent faciliter la démarche [56] :

- le temps d'homogénéisation : il correspond au temps nécessaire pour obtenir un environnement homogène.
- le « power input » : il correspond à la quantité de puissance fournie au milieu de culture cellulaire par l'agitation.

$$\varepsilon = \frac{P_g}{V_l} = \frac{N_p n \rho N^3 D^5}{V}$$

où $\varepsilon$ est le « power input » ($W.m^{-3}$), $N_p$ le nombre correspondant à la puissance du rotor (donné par le fabricant), n le nombre de rotors, ρ la densité ($kg.m^{-3}$), N la vitesse d'agitation ($s^{-1}$), D le diamètre du rotor (m) et V le volume de la culture ($m^3$).

Une modification du débit d'air est également indispensable pour maintenir un transfert en oxygène suffisant. Une augmentation importante du débit est généralement nécessaire pour contrebalancer l'augmentation d'échelle et la vitesse d'agitation généralement insuffisante. Cependant, il devient alors essentiel de porter une vigilance accrue sur le niveau de mousse afin de limiter sa formation dans le bioréacteur.

## C. Extraction et purification des anticorps

L'extraction des anticorps est la première étape de purification. L'objectif est de séparer le produit d'intérêt des cellules et des débris cellulaire avant d'entamer le processus de purification. Les techniques les plus courantes sont la centrifugation et la filtration bien que d'autres approches existent, dont l'application dépend de l'échelle et des équipements.

La majorité des procédés de purification implique l'utilisation de chromatographies. La chromatographie protéine A est la plus employée pour purifier des solutions d'anticorps. Par la suite, une ou deux étapes de polissage sont généralement nécessaires pour éliminer les impuretés restantes à l'aide de la chromatographie échangeuse d'ions, la chromatographie d'interaction hydrophobe ou la chromatographie « mixed mode ». Ces étapes permettent une élimination des protéines, de l'ADN, des agrégats, etc. Pour éliminer complètement toutes traces de virus, des étapes de chromatographie à pH acide et de filtration virale sont

également effectuées. Pour finir, le produit purifié est concentré et diafiltré dans la solution tampon finale [59].

Ces nombreuses étapes sont indispensables pour éliminer les impuretés qui se sont accumulées au cours des différentes cultures et qui peuvent être potentiellement toxiques pour les futurs patients.

## D. Caractérisation et validation

Les autorités réglementaires ont défini la validation d'un procédé comme « la preuve documentée que le procédé mis en œuvre peut fonctionner de manière efficace et reproductible pour produire un intermédiaire ou une substance active conforme à ses spécifications et à ses caractéristiques de qualité préétablies » [60]. Ces exigences réglementaires soulignent le fait que la qualité d'un produit peut être affectée par les différents procédés industriels. Chaque étape de la plateforme de production peut potentiellement altérer le produit d'intérêt, d'où l'importance d'employer des procédés parfaitement caractérisés et validés.

## E. Transfert des techniques sur site de production

Afin de commercialiser l'anticorps thérapeutique, ce dernier doit être produit dans une installation accréditée BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication). Tous les équipements, technologies, documents, outils… doivent être transférés dans cette nouvelle zone. La mise en place et la qualification de tous les équipements sont indispensables avant toute production de la molécule thérapeutique. Des tests sont réalisés pour démontrer que le produit final a conservé tout son potentiel : efficacité, innocuité, identité, pureté et qualité.

# Partie 4. Production en système acellulaire

La production de protéines recombinantes par synthèse acellulaire, appelé « cell free » est une technique développée pour la première fois en 1961. C'est une technique utilisant la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle de la cellule afin de produire une protéine à partir de matériel génétique [61]. A l'origine, la technologie des systèmes acellulaires était utilisée uniquement dans le but de traduire l'ARNm en protéine. Avec l'évolution de la technologie, des chercheurs ont développé des techniques pour utiliser l'ADN comme point de départ pour la production de molécules.

La production en système acellulaire demande au préalable une étude complète de la structure de la protéine thérapeutique, des conditions de synthèse (transcription, traduction) et des étapes de traitement post-synthèse (repliement et MPT).

Cette méthode présente des avantages comme des inconvénients (voir Tableau 8).

**Tableau 8 : Avantages et inconvénients de la production en système acellulaire.**

| Avantages | Inconvénients |
|---|---|

| | |
|---|---|
| **Production rapide** | **Coût élevé** |
| **Purification simplifiée** | **Rendement faible** |
| **Production de protéines complexes** | **Repliement des protéines encore mal maitrisé** |
| **Condition de réaction facilement manipulable** | **Transfert d'échelle complexe** |

Plusieurs innovations ont vu le jour afin d'améliorer la technique et en particulier la productivité. Parmi ces innovations, on peut citer l'utilisation d'une ARN polymérase exogène afin d'augmenter la vitesse de transcription de l'ADN, l'introduction d'un système métabolique de production d'énergie, ou encore l'introduction d'ARNt spécifiques de codons rares qui permet la synthèse de protéines particulières.

Le « Continuous Exchange Cell Free » est un système constitué d'un compartiment de réaction contenant la machinerie cellulaire et l'information génétique, et d'un compartiment d'alimentation contenant les cofacteurs, acides aminés, tampons et d'autres composants (voir Figure 32**)**. La membrane de dialyse séparant les deux compartiments favorise la sortie des molécules « déchets » et l'entrée de molécules nécessaires à la réaction, grâce au gradient de concentration résultant de l'activité de synthèse.

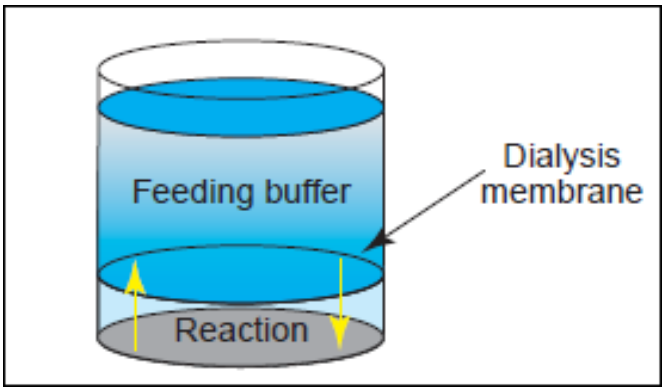



**Figure 32: Schéma de la technique de Continuous Exchange Cell Free. Les flèches Jaunes indiquent le mouvement des éléments du tampon de nutrition. D'après Katzen et al 2005.**

Une équipe de chercheurs de la société Sutro Biopharma Inc. a développé en 2011 un système acellulaire basé sur l'extrait d'*E .coli* permettant de produire le facteur de croissance des granulocytes et des macrophages (rhGMCSF) [61]. Ce système permet la production de cette protéine avec une concentration finale de l'ordre de 700 mg/L, et un volume de travail allant jusqu'à 200 L.

La synthèse acellulaire est utilisée et commercialisée principalement sous la forme de kit. Il n'a, à ce jour, encore jamais été utilisé pour produire et commercialiser des molécules thérapeutiques. Malgré l'évolution de la technique sur le plan du rendement et du coût de production, l'industrie pharmaceutique reste encore frileuse dans l'utilisation de ces techniques à grande échelle pour la production de protéines thérapeutiques. Mais les recherches effectuées ces quinze dernières années ont permis de développer cette technique et de l'amener à un niveau de maturité comparable à celui des systèmes cellulaires actuellement utilisés en industrie.

# Conclusion

Au cours des dernières décennies, les anticorps monoclonaux se sont imposés comme des molécules providentielles dans de nombreux domaines thérapeutiques. Grâce aux investissements réalisés par les industries pharmaceutiques, les anticorps monoclonaux font désormais partis des molécules les plus vendues, sauvant ainsi de nombreuses vies chaque année. Certaines maladies aujourd'hui incurables pourront demain être traitées, à partir d'un arsenal thérapeutique de plus en plus complet mis à disposition des médecins.

Les politiques de remboursement revues à la baisse, l'émergence des biosimilaires et les coûts élevés liés à la recherche et la production mettent l'industrie pharmaceutique face à de nouvelles difficultés. Une course est engagée entre les différentes sociétés pour la mise sur le marché de ces molécules. Cette compétition impose un rythme effréné pour concevoir des technologies toujours plus rapides, plus fiables et plus économiques.

Ces vingt dernières années, des efforts considérables ont été réalisés par les compagnies pharmaceutiques pour améliorer les techniques de production de culture cellulaires, l'élaboration des lignées, la mise au point de procédés de productions et la conception de

nouvelles technologies. Les procédés de cultures cellulaires sont aujourd'hui considérés comme des dispositifs robustes et fiables pour la synthèse d'anticorps monoclonaux. Les productivités cellulaires ont littéralement explosé ces dix dernières années, il n'est pas rare d'obtenir des productivités 10 fois supérieures à celle du clone initial, avec des pics de production pouvant atteindre les 10 g/L ou plus.

Certaines technologies occupent une place de plus en plus importante dans la production des molécules biologiques, c'est le cas du matériel à usage unique. On voit aujourd'hui émerger des chaînes entières de production à usage unique qui améliorent la vitesse de production et réduisent le risque de contamination. Il est possible de réaliser à l'aide de système à usage unique toutes les étapes de culture cellulaire depuis la décongélation du tube de cellules de la banque cellulaire jusqu'au bioréacteur de 1 000 ou 2 000 litres.

Il en résulte des plateformes de production fiables pour l'industriel et pour le patient, et des produits de qualité irréprochable. D'autre part, la mutualisation des plateformes permet de réduire le coût et la durée du développement des biomolécules et de débuter plus rapidement les essais cliniques.

Il existe des alternatives aux plateformes dites « classiques ». Les systèmes acellulaires sont la preuve que de nouvelles méthodes de production potentiellement plus économique restent à découvrir. Une meilleure utilisation de la génomique, de la protéomique ou encore une automatisation plus poussée des procédés de cultures cellulaires sont autant de pistes potentielles d'amélioration des plateformes de production.

Encouragé par les autorités réglementaires, un nouveau concept fait son apparition : le « quality by design ». Le « quality by design » se définit comme une approche systématique du développement d'un médicament, qui vise à mieux explorer les caractéristiques des molécules, à mieux connaître le procédé de fabrication en l'explorant aux limites et en identifiant les paramètres critiques. L'objectif final consiste à ce que la qualité ne soit plus assurée par l'atteinte d'une valeur cible, mais par une plage de valeur, dans laquelle les paramètres de production peuvent varier sans altérer la qualité du produit final. Cette plage de valeur, appelé « Design Space », vient alors donner plus de flexibilité simplifiant par la même occasion les processus de changement d'échelle et de site de fabrication.

Le domaine des biotechnologies a ainsi, via les anticorps monoclonaux, ouvert la voie aux traitements de nombreuses pathologies et laisse entrevoir un avenir prometteur pour la médecine moderne.

# *Annexe 1 :* Composition biochimique de milieux nutritifs de base

| Component | MEM | F–12 | DMEM | DMEM/F12 | RPMI 1640 | RDF | eRDF |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Inorganic salts** | | | | | | | |
| $CaCl_2$ (anhyd) | 200.00 | 33.22 | 200.00 | 116.60 | | | |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | | | | | | 77.90 | 108.77 |
| $Ca(NO_3)_3 \cdot 4H_2O$ | | | | | 100.00 | 49.58 | |
| $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | | 0.0024 | | 0.0013 | | 0.00062 | 0.00075 |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | | 0.83 | | 0.417 | | 0.208 | 0.222 |
| $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ | | 0.10 | | 0.05 | | 0.025 | |
| KCl | 400.00 | 223.60 | 400.00 | 311.80 | 400.00 | 358.00 | 373.00 |
| $MgSO_4$ (anhyd) | 97.67 | 57.22 | 97.67 | 48.84 | 48.84 | 49.35 | 66.20 |
| $MgCl_2$ (anhyd) | | | | 28.64 | | | |
| $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | | | | | | 30.48 | |
| NaCl | 6800.00 | 7599.00 | 6400.00 | 6995.50 | 6000.00 | 6505.00 | 6435.00 |
| $NaHCO_3$ | 2200.00 | 1176.00 | 3700.00 | 2438.00 | 2000.00 | 1050.00 | 1050.00 |
| $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ | 140.00 | | 125.00 | 62.50 | | 31.20 | |
| $Na_2HPO_4$ (anhyd) | | 142.00 | | 71.02 | 800.00 | | |
| $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ | | | | | | 1100.00 | 1220.00 |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | | 0.86 | | 0.43 | | 0.22 | 0.23 |
| **Sub-total** | 9837.67 | 9232.83 | 10922.67 | 10073.80 | 9348.84 | 9251.96 | 9253.42 |

| Component | MEM | F–12 | DMEM | DMEM/F12 | RPMI 1640 | RDF | eRDF |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Vitamins** | | | | | | | |
| p-Aminobenzoic acid | | | | | 1.00 | 0.51 | 0.51 |
| Biotin | | 0.0073 | | 0.0035 | 0.20 | 0.10 | 0.10 |
| D-Ca Pantothenate | 1.00 | 0.50 | 4.00 | 2.24 | 0.25 | 0.67 | 0.67 |
| Folic acid | 1.00 | 1.30 | 4.00 | 2.65 | 1.00 | 1.81 | 1.81 |
| Niacinamide | 1.00 | 0.036 | 4.00 | 2.02 | 1.00 | 1.50 | 1.50 |
| Pyridoxal HCl | 1.00 | | 4.00 | 2.00 | | 1.00 | 1.00 |
| Pyridoxine HCl | | 0.06 | | 0.03 | 1.00 | 0.50 | 0.50 |
| Riboflavin | 0.10 | 0.037 | 0.40 | 0.22 | 0.20 | 0.21 | 0.21 |
| Thiamine HCl | 1.00 | 0.30 | 4.00 | 2.17 | 1.00 | 1.60 | 1.60 |
| Vitamin B12 | | 1.40 | | 0.68 | 0.005 | 0.34 | 0.34 |
| **Sub-total** | 5.10 | 3.64 | 20.40 | 12.02 | 5.66 | 8.24 | 8.24 |

# *Annexe 1 :* Composition biochimique de milieux nutritifs de base

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Amino Acids** | | | | | | | |
| L-Alanine | | 8.90 | | 4.45 | | 2.23 | 6.68 |
| L-Arginine·HCl | 126.00 | 211.00 | 84.00 | 147.50 | 200.00 | 194.00 | 582.00 |
| L-Aspartic acid | | 13.30 | | 6.65 | 20.00 | 13.30 | 39.90 |
| L-Asparagine·$H_2O$ | | 15.01 | | 7.50 | 50.00 | 31.50 | 94.50 |
| L-Cysteine·HCl·$H_2O$ | | 35.12 | | 17.56 | | 8.80 | 105.40 |
| L-Cystine | | | | | | 36.00 | |
| L-Cystine·2HCl | 31.00 | | 63.00 | 31.29 | 65.00 | | |
| L-Glutamic acid | | 14.70 | | 7.35 | 20.00 | 13.20 | 39.70 |
| L-Glutamine | 292.00 | 146.00 | 584.00 | 365.00 | 300.00 | 333.00 | 1000.00 |
| Glycine | | 7.50 | 30.00 | 18.75 | 10.00 | 14.30 | 42.80 |
| L-Histidine·HCl·$H_2O$ | 42.00 | 21.00 | 42.00 | 31.48 | 15.00 | 25.00 | 75.00 |
| L-Hydroxyproline | | | | | 20.00 | 10.50 | 31.50 |
| L-Isoleucine | 52.00 | 4.00 | 105.00 | 54.47 | 50.00 | 52.50 | 157.50 |
| L-Leucine | 52.00 | 13.10 | 105.00 | 59.05 | 50.00 | 55.10 | 165.30 |
| L-Lysine·HCl | 73.00 | 36.50 | 146.00 | 91.25 | 40.00 | 65.80 | 197.30 |
| L-Methionine | 15.00 | 4.50 | 30.00 | 17.24 | 15.00 | 16.40 | 49.20 |
| L-Phenylalanine | 32.00 | 5.00 | 66.00 | 35.48 | 15.00 | 24.80 | 74.30 |
| L-Proline | | 34.50 | | 17.25 | 20.00 | 18.40 | 55.30 |
| L-Serine | | 10.50 | 42.00 | 26.25 | 30.00 | 28.40 | 85.10 |
| L-Threonine | 48.00 | 11.90 | 95.00 | 53.45 | 20.00 | 36.90 | 110.80 |
| L-Tryptophan | 10.00 | 2.00 | 16.00 | 9.02 | 5.00 | 6.10 | 18.40 |
| L-Tyrosine | | | | | | 29.00 | 87.00 |
| L-Tyrosine·2Na·$2H_2O$ | 52.00 | 7.81 | 104.00 | 55.79 | 29.00 | | |
| L-Valine | 46.00 | 11.70 | 94.00 | 52.85 | 20.00 | 36.30 | 108.90 |
| **Sub-total** | 871.00 | 614.04 | 1606.00 | 1110.02 | 994.00 | 1051.53 | 3126.58 |
| **Miscellaneous** | | | | | | | |
| Choline chloride | 1.00 | 14.00 | 4.00 | 8.98 | 3.00 | 6.14 | 12.29 |
| D-Glucose | 1000.00 | 1802.00 | 4500.00 | 3151.00 | 2000.00 | 1700.00 | 3423.00 |
| Glutathione (reduced) | | | | | 1.00 | 0.50 | 0.50 |
| HEPES | | | | | | 1190.00 | 1190.00 |
| Hypoxanthine (Na salt) | | 4.77 | | 2.39 | | 1.00 | 1.00 |
| i-Inositol | 2.00 | 18.00 | 7.20 | 12.60 | 35.00 | 23.40 | 46.80 |
| Linoleic acid | | 0.084 | | 0.042 | | 0.021 | 0.021 |
| Lipoic acid | | 0.21 | | 0.105 | | 0.052 | 0.052 |
| Phenol red | 10.00 | 1.20 | 15.00 | 8.10 | 5.00 | 6.56 | 5.00 |
| Putrescine·2HCl | | 0.161 | | 0.081 | | 0.04 | 0.04 |
| Pyruvate (Na salt) | | 110.00 | | 55.00 | | 55.00 | 110.00 |
| Thymidine | | 0.70 | | 0.365 | | 0.18 | 0.18 |
| **Sub-total** | 1013.00 | 1951.13 | 4526.20 | 3238.67 | 2044.00 | 2982.89 | 4788.88 |
| **Total Formulation** | 11726.77 | 11801.64 | 17075.27 | 14434.51 | 12392.50 | 13294.62 | 17177.12 |

Les quantités sont exprimées en mg/L.

Ref. [41]

# Bibliographie


1. Leem. Bioproduction 2008 : Etat des lieux et recommandations pour l''attractivité de la France [en ligne]. 2008. Disponible sur : http://www.leem.org/sites/default/files/1342.pdf

2. Latieule S. La 13e fusion [en ligne]. 2011. Disponible sur : http://www.industrie.com/pharma/la-13e-fusion,38665

3. Leem. Marché mondial : L'économie du Médicament [en ligne]. 2013. Disponible sur : http://www.leem.org/article/marche-mondial-0

4. Kelley B. Industrialization of mAb production technology The bioprocessing industry at a crossroad. MAbs. 2009 October, p. 443-452.

5. Takween. Production de protéines recombinantes [en ligne]. Disponible sur : http://www.takween.com/biotechnologies/proteines-recombinantes.html

6. Munro T, Mahler S, Huang E, et al. Bridging the gap Facilities and technologies for development of early stage therapeutic mAb candidates. mAbs, 2011 October, p. 440-452.

7 : Pinet M. Utilisation des anticorps monoclonaux dans la prévention et le traitement de maladies infectieuses [en ligne]. 2011. Disponible sur : http://etudes.univ-rennes1.fr/digitalAssets/38/38431_Pinet_anticorps_monoclonaux_maladies_infectieuses.pdf

8 : Janeway C, Murphy K, Walport M. Immunobiologie. 2009 October, Edition De Boeck, 3e edition, p. 113.

9 : DeFranco A, Robertson M, Locksley R. Immunité: la réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires. 2009 Mars ; Edition De Boeck; p. 162.

10 : Siberil S, Dutertre C, Boix C et al. Anticorps monoclonaux à usage thérapeutique, un peu d'histoire, beaucoup d'ingénierie. Transfusion Clinique et Biologique 12, 2005, p. 114-122.

11 : Li F, Vijayasankaran N, Shen et al. Cell culture processes for monoclonal antibody production. mAbs, 2010 October, p. 466-477.

12 : Pohlscheidt M, Kiss R. Recent Advances and Trends in the Biotechnology Industry - Development and manufacturing of Recombinant Proteins and Antibodies. American Pharmaceutical Review, 2013 October.

13 : Chames P, Baty D. Ingénierie des anticorps monoclonaux. Biofutur 288, 2008 Mai, p. 43-46.

14 : McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature, vol. 348, no 6301, 1990 Dcember, p. 552-554.

15 : Frenzel A, Hust M, SchirrmannT. Expression of recombinant antibodies. Frontiers in Immunology, 2013 July, Volume 4, Article 217.

16 : Faye L, Landry N, Lerouge P et al. La production de protéines à usage biopharmaceutique dans les plantes. Médecine/sciences, 2001, p. 867-877.

17: Houdebine L. Antibody manufacture in transgenic animals and comparisons with other systems. Current Opinion in Biotechnology, 2002 December, Volume 13, Issue 6, 1, p. 625–629.

18 : Wurm F. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nature Biotechnology, 2004, 22, p. 1393-1398.

19 : Chartrain M, Chu L. Development and Production of Commercial Therapeutic Monoclonal Antibodies in Mammalian Cell Expression Systems: An Overview of the Current Upstream Technologies. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2008, 9, p. 447-467.

20 : Kim J, Kim Y, Lee G. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012 February, Volume 93, Issue 3, p. 917-930.

21 : Xu X, Nagarajan H, Lewis N et al. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. Nature Biotechnology, 2011, 29, p. 735-741.

22 : Zhang J. Mammalian cell culture for biopharmaceutical production. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2010 April.

23 : Ryan J. Guide général de cryoconservation de cultures de cellules animales. 2013.

24 : Birch J, Racher A. Antibody production. Advanced Drug Delivery Reviews 58, 2006, p. 671- 685.

25 : Costa R,Rodrigues E, Henriques M. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2010 February, Volume 74, Issue 2, p. 127–138.

26 : Van der Valk J, Brunner D, De Smet K et al. Optimization of chemically defined cell culture media. Toxicology in Vitro, 2010 June, Volume 24, Issue 4, p. 1053-1063.

27 : Wurm F. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nature Biotechnology, 2004 November, 22(11), p. 1393-1398.

28 : Munro T, Mahler S, Huang E et al. Bridging the gap : Facilities and technologies for development of early stage therapeutic mAb candidates. mAbs, 2011 October, p. 440-452.

29 : Primos S. Principes de génie génétique. 2004 Octobre, Edition De Boeck.

30 : Lai T, Yang Y, Kong Ng S. Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production. Pharmaceuticals, 2013, 6(5), p. 579-603.

31 : Lamy V. Etude des propriétés anti-cancéreuses des Lupulones, micro constituants spécifiques du houblon: aspects cellulaires et physiopathologiques. Th. D : Sciences du Vivant : Université de Strasbourg : 2009, 194 p.

32 : Heron J. Cancérologie générale [en ligne]. 2009. Disponible sur : http://www.oncoprof.net/Generale2000/g04_Diagnostic/Histologie/Technique-image/dg_histo_tech_43.html

33 : Meng Y, Liang J, Wong W. Chisholm V. Green fluorescent protein as a second selectable marker for selection of high producing clones from transfected CHO cells. Gene, 2000, 242, p. 201-207.

34 : Dharshanan S, Chong H, Hung C et al. Rapid automated selection of mammalian cell line secreting high level of humanized monoclonal antibody using Clone Pix FL system and

the correlation between exterior median intensity and antibody productivity. Electronic Journal of Biotechnology, 2011, Vol14, Issue2.

35 : Richardson G, Lin N, Lacy K et al. Cell Xpress™ Technology Facilitates High-Producing Chinese Hamster Ovary Cell Line Generation Using Glutamine Synthetase Gene Expression System. In Cells and Culture, 2010; Vol 4, p. 45–48.

36. Carmaux S. Caractérisation de la mort des cellules animales cultivées en bioréacteur. Th. D : Pharmacie. Université de Nantes : 2008, 105 p.

37 : Kretzmer G. Industrial processes with animal cells, Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, Vol 59, p. 135-142.

38 : Dardenne M, Cherlet M, Engasser J et al. Kinetic studies of fed-batch hybridoma cult ures : effect of various feeding compositions and flow rates. Animal Cell Technology, Product s for today, prospects for tomorrow, 1994, p. 542-544.

39 : Fletcher T. Designing Culture Media for Recombinant Protein Production. BioProcess International, 2005.

40 : Reddys A. Small scale cell culture performance of recombinant Chinese Hamster Ovary cells.

41 : Jayme D, Watanabe T, Shimada T. Basal medium development for serum-free culture: a historical perspective. Cytotechnology, 1997 January, Vol 23, p. 95-101.

42: Zanghi J, Renner W, Bailey J, Fussenegger M. The growth factor inhibitor suramin reduces apoptosis and cell aggregation in protein-free CHO cell batch cultures. Biotechnology Progress, 2000 June, Vol 16, p. 319-25.

43: Rodrigues M, Costa A, Henriques M et al. Technological Progresses in Monoclonal Antibody Production Systems. Biotechnology Progress, 2010 April, Vol 26, p. 332-351.

44 : Ryan J. Produire de grandes quantités de cellules : guide de scale-up des cultures cellulaires en faible volume - 1ère partie.

45: Figuet D. Les bioréacteurs jetables. Université de Bretagne, 2010.

46: Vallez-Chetreanu F. Caracterization of the mechanism of action of spin-filters for animal cell perfusion cultures. Th. D : Chimie et génie chimique : Université de Lausanne : 2006, 188 p.

47: Cadwell J. New Developments in Hollow-Fiber Cell Culture. American Biotechnology Laboratory, 2004.

48: Jackson L, Trudel L, Lipman N. Small-Scale Monoclonal Antibody Production In Vitro: Methods and Resources. Johns Hopkins University, 1999.

49: Kong D, Cardak S, Chen M et al. High cell density and productivity culture of Chinese hamster ovary cells. Cytotechnology, 1999, Vol 29, Issue 3, p. 215-220.

50: AnHydre. Le HandBook de l'oxygène dissous Un guide pratique pour les mesures d'oxygène dissous. YSI Handbook Oxygène Dissous, 2009.

51: Celld. Equipements de production, d'analyse et de contrôle pour les Biotechnologies [en ligne]. Disponible sur : http://celld.com/flashmenu/fogale-biomasse-evo-200.html

52 : Camus M, Deguine E, Ross D. Régulation par PID [en ligne]. 2010. Disponible sur : http://rose.eu.org/2010/wp-content/uploads/2010/02/pid.pdf

53 : Le Lann C. Le PID utilisé en régulation de position et/ou de vitesse de moteurs électriques [en ligne]. 2007. Disponible sur : http://www.totofweb.net/projets/pid/rapport.pdf

54 : Heidemann R, Lütkemeyer D, Büntemeyer H et al. Effects of dissolved oxygen levels and the role of extra- and intracellular amino acid concentrations upon the metabolism of mammalian cell lines during batch and continuous cultures. Cytotechnology, 1998, Vol 26, Issue 3, p. 185-197

55 : Barbouche N. Réponse biologique de cellules animales a des contraintes hydrodynamiques : simulation numérique, expérimentation et modélisation en bioréacteurs de laboratoire. Th. D : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires : Institut polytechnique de Lorraine : 2008, 350 p.

56: Xing Z, Kenty B, Li Z et al. Scale-Up Analysis for a CHO Cell Culture Process in Large-Scale Bioreactors. Biotechnology and Bioengineering, 2009, Vol. 103, No. 4.

57 : Schmidt F. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, Vol 68, p. 425–435.

58 : Chua G. Process optimization and scale-up for the production of a diagnostic monoclonal antibody against congenital adrenal hyperplasia (CAH). Th. D : Bioprocess Engineering University Massey : 2010, 265 p.

59 : Liu H, Ma J, Winter C et al. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. MAbs. 2010 October, Vol 2, p. 480–499

60: ANSM. Partie II des Bonnes Pratiques de Fabrication, [en ligne]. p37, 2011. Disponible sur : http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/bbf377b519b5a07b63b8b2ba8f7c2b35.pdf

61 : Nawfel M. Production de protéines recombinantes en système acellulaire : Industrialisation et réglementation. Th. d'exercice : Faculté de pharmacie de Grenoble : 2012, 92 p.

# Development of a monoclonal antibody production platform


## ABSTRACT

With the decreasing number of traditional molecule sales, the biotechnology sector has become one of the major biopharmaceutical field. Among these molecules, monoclonal antibodies are promising for modern medicine due to their use within a variety of therapies, including those against several forms of cancer, multiple sclerosis and viral infections. Monoclonal antibodies are extremely efficient as they allow a highly specific, complex set of functions that cannot be mimicked by simple chemical compounds.

Nowadays, among the ten best-selling drugs in the world, five are produced by biological means, three of them being monoclonal antibodies. Significant capital investments are required for development but the return on investment is high: the sale price of monoclonal antibodies averaged 8,000 dollars per gram in 2009. Pharmaceuticals companies have so far succeeded in facing the multiple challenges regarding public health on one hand and financial aspect on the other hand.

Scientific breakthroughs have resulted in the design of more and more effective molecules at lower cost. A promising future awaits the monoclonal antibody market.

The commercial success of those drugs has led to a need for very large-scale production platforms. These platforms include all stages necessary for the production, allowing to maintain desired quality attributes and cost effectiveness while reducing the delivery time to market and providing manufacturing flexibility.

This work is dealing with the development of an efficient production platform which begins with the selection and generation of the host cell line. Mammalian and CHO cell lines are the host of choice for antibody production. They allow meeting regulatory requirements in order to safely administer treatments.

Optimization of media and bioreactor culture conditions is necessary to achieve the required productivity and reduce recombinant protein production cost. These processes are then transferred towards high scale platforms. Large scale production of the therapeutic molecule while maintaining productivity and product quality is challenging for pharmaceutical companies.

Modern cell culture processes can achieve high antibody concentrations. However it is generally observed that production capacities can be a limiting factor for the increasing demand of monoclonal antibodies. For the past ten years, biopharmaceutical companies have been exploring innovative solutions such as the optimization of current cell culture processes or the development of new technologies. These solutions are also presented in this work.

**RESUME**

Le déclin des ventes de molécules dites traditionnelles ces 15 dernières années a positionné le secteur des biotechnologies comme le domaine leader du marché de l'industrie pharmaceutique, via, notamment la production d'anticorps monoclonaux. Ces biomolécules très prometteuses sont déjà exploitées dans de nombreux domaines thérapeutiques, tels la cancérologie, les maladies auto-immunes ou encore les infections virales. Leur mécanisme d'action consiste, entre autre à cibler et neutraliser les agents pathogènes de manière spécifique et précise.

A ce jour, parmi les dix molécules les plus vendues au monde, cinq sont produites par voie biologique dont trois sont des anticorps monoclonaux. Les investissements requis pour produire de telles molécules sont extrêmement onéreux, mais le retour sur investissement est considérable : le prix de vente des anticorps monoclonaux s'élevait en moyenne à 8000 dollars le gramme en 2009. Ainsi les industriels ont su répondre aux grands enjeux de santé publique, tout en bénéficiant du fort intérêt économique de ce secteur.

Les avancées scientifiques ont vu la conception de molécules de plus en plus efficaces à des coûts avantageux. La perspective d'un marché prometteur est indéniable.

Le nombre croissant d'anticorps thérapeutiques développés par les grands groupes pharmaceutiques a fait émerger la nécessité de concevoir des plateformes de production. Ces dispositifs intègrent toutes les étapes aboutissant à la production de protéines recombinantes à grande échelle. Ainsi la globalisation de toutes ces étapes optimise le temps de mise sur le marché et réduit le coût de production, tout en maintenant le niveau de qualité exigé.

Le développement de plateformes de production d'anticorps monoclonaux est traité dans cette thèse. La génération et la sélection d'une lignée clonale productrice de protéines recombinantes en est généralement la première étape. Les cellules de mammifères, généralement des cellules CHO, sont les hôtes de prédilection pour la production d'anticorps. Ces cellules permettent d'obtenir des biomolécules satisfaisant les exigences réglementaires requises pour être administré à terme au patient.

L'optimisation des milieux et des conditions de cultures en bioréacteurs permet d'atteindre la productivité nécessaire et de réduire le coût de production des protéines recombinantes. Ces procédés sont ensuite transférés vers une plateforme de grande envergure pour la production. Le challenge est de produire massivement la molécule thérapeutique tout en maintenant la productivité et la qualité du produit.

Un certain nombre de plateforme de production témoignent déjà d'un rendement particulièrement élevé mais les capacités de production constituent généralement un frein à la demande accrue d'anticorps. Ces dix dernières années, les compagnies pharmaceutiques ont fait des efforts considérables afin d'optimiser les techniques de production de cultures cellulaires, que ce soit dans l'élaboration des lignées, comme la mise au point de procédés de production ou encore la conception de nouvelles technologies. La mise en œuvre de ces procédés est également abordée dans cet ouvrage.

**DISCIPLINE :** Biotechnologie

**MOTS-CLES :** Anticorps monoclonal, Protéine Recombinante, Cellules CHO, Qualité, Milieu de culture, Transfert d'échelle, Bioréacteur, Productivité

**ADRESSE DE L'AUTEUR :** francois.labord@gmail.com