



HAL
open science

Mise en place et développement d'une plateforme de culture pour la levure *pichia pastoris*

Laurianne Goyon

► **To cite this version:**

Laurianne Goyon. Mise en place et développement d'une plateforme de culture pour la levure *pichia pastoris*. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-01105379

HAL Id: dumas-01105379

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01105379>

Submitted on 20 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 de Bordeaux
U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2014

Thèse n°92

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
Par Laurianne GOYON
Née le 08 septembre 1989 à Evry (Essonne)

Le 02 octobre 2014

Mise en place et développement
d'une plateforme de culture
pour la levure *Pichia pastoris*

Directeur de thèse
Pr Jean-Michel MERILLON

Jury

Monsieur Jean-Michel MERILLON, Professeur

Président

Madame Virginie PERRIER, Superviseur USP (Merck Biodevelopment)

Juge

Monsieur Alain DECENDIT, Maître de Conférences

Juge

Serment de Galien

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles d'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

Remerciements

A mon président et directeur de thèse,

**Monsieur Jean-Michel Mérillon,
Professeur à la faculté de Pharmacie de Bordeaux,**

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de diriger ma thèse et d'en présider le jury. Je le remercie d'avoir lu avec attention mon travail et de s'être toujours rendu disponible pour m'accompagner tout au long de ce projet. Je vous suis sincèrement reconnaissante de toute l'aide que vous m'avez apportée, pas seulement au cours de cette thèse, mais tout au long de mon cursus en Pharmacie.

Aux membres du jury,

**Monsieur Alain Decendit,
Maître de conférences à la faculté de Pharmacie de Bordeaux,**

Pour avoir accepté de juger ce travail. Merci pour votre implication et pour la bonne humeur que vous mettez à partager vos connaissances.

**Madame Virginie Perrier,
Superviseur USP Unité Microbiologique, Merck Biodevelopment, Martillac**

Pour m'avoir encadrée tout au long de ces six mois de stage. Je lui suis reconnaissante de la confiance qu'elle m'a accordée et je tiens à lui exprimer ma gratitude pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail, pour sa disponibilité et pour ses conseils.

Mes remerciements s'adressent également,

A l'équipe du laboratoire de Développement MB,

Pour leur accueil spontané, leur disponibilité et leur aide dans mes expérimentations. Un merci particulier à l'équipe USP, Sandrine, Jérémie, Clément, Florence et Brigitte, vos conseils et votre bonne humeur ont sans aucun doute contribué au bon déroulement de mon stage. Grâce à vous, je ressors grandie de cette expérience, tant professionnellement qu'humainement.

A mes chers amis de la faculté,

Pour avoir donné de la couleur et de la chaleur à ses longues années d'études. Merci à Valérie, le binôme le plus gamer qui soit, à Jérémie, mon pharmapote multifonctions, qui je suis sûre, a enfin trouvé sa voie, à Alain, mon chinois favori, à Christophe, mon monsieur qualité guadeloupéen, et à tous ceux qui ont partagé les bancs de la fac. A nos délires, nos bonheurs partagés ensemble.

Merci également à mes camarades de l'école d'ingénieur, et je pense notamment à Carole et aux trois autres pharma qui m'ont accompagnée dans cette aventure, Marine, Sophie et Lise.

Remerciements

A l'ensemble du corps enseignant,

Pour votre encadrement et pour le partage de vos connaissances. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mes sincères remerciements. Merci particulier à Madame Hocquellet, Monsieur Noubhani, Madame Cabanne et Monsieur Dacheux pour leurs enseignements enrichissants.

A mes parents,

Pour m'avoir toujours soutenue durant toutes ces années, aussi bien financièrement que moralement. Merci pour votre patience, vos encouragements et pour l'implication que vous avez mis dans la relecture de mes divers travaux, traitant de sujets ô combien éloignés de vos centres d'intérêts. Merci pour tout.

A mon amour,

Pour m'avoir supportée tout au long de ces années d'études.

Table des matières

CHAPITRE I LES BIOTECHNOLOGIES DANS LE DOMAINE DE LA SANTE..... 11

1. Avant-propos.....	12
2. Les biomédicaments en 2014 : aspects généraux et notions économiques.....	12
2.1. Comparaison des médicaments chimiques aux médicaments biologiques.....	12
2.2. Différents types de biomédicaments.....	15
2.3. Systèmes de production	22
2.4. Aspect règlementaire	24
2.5. Marché des biomédicaments en France	24
2.6. Les biomédicaments de demain.....	26

CHAPITRE II GENERALITES SUR LA CULTURE MICROBIENNE APPLICATION AUX LEVURES 29

1. Introduction.....	30
2. Rappels de biologie cellulaire	31
2.1. Comparaison procaryotes et eucaryotes	31
2.2. Biologie cellulaire des levures.....	32
3. Besoins nutritifs et milieux de culture	37
4. Caractérisation de la croissance	39
5. Facteurs influençant la croissance.....	40
6. Mesures de la biomasse.....	42
6.1. Méthodes pondérales et gravimétriques	42
6.2. Méthodes optiques	43
6.3. Méthodes physiques.....	44
6.4. Méthodes électrochimiques	45
6.5. Méthodes biologiques	45
7. Conservation et banques	46
7.1. Différentes techniques de conservation	46
7.2. Banques de micro-organismes	47

CHAPITRE III UTILISATION INDUSTRIELLE DES MICRO-ORGANISMES 48

1.	Rappels de biologie moléculaire	49
2.	Expression de molécules recombinantes.....	51
3.	Etapas d'un procédé : de la fermentation au produit fini.....	52
3.1.	Discussion autour du terme de fermentation	52
3.2.	Préparations préalables à la culture	53
3.3.	Fermentation en bioréacteur : UpStream Process.....	54
3.4.	DownStream Process	62
4.	Contrôle qualité.....	65
4.1.	Contrôle des souches	65
4.2.	Contrôle de la protéine produite	65

CHAPITRE IV MISE EN PLACE ET DEVELOPPEMENT D'UNE PLATEFORME DE CULTURE POUR LA LEVURE *PICHA PASTORIS* 66

1.	Avant-propos.....	67
2.	Entreprise d'accueil de l'étude expérimentale	68
3.	Contexte de l'étude	70
3.1.	Système d'expression : <i>Pichia pastoris</i>	70
3.2.	Plateforme générique de culture	80
4.	Matériel et méthode	82
4.1.	Souche et plasmide	82
4.2.	Molécule d'intérêt.....	83
4.3.	Systèmes et milieux de culture	83
4.4.	Protocole expérimental	85
4.5.	Analyse de la croissance et de la productivité.....	91
5.	Résultats	94
5.1.	Mise en place du système de culture en microplaque.....	94
5.2.	Développement du milieu de culture en microplaque	104
5.3.	Evaluation de la productivité en système régulé	116
6.	Conclusion et perspectives.....	119

Bibliographie

Annexes

Résumés

Liste des abréviations

ADCC	Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity	HAHA	Human Anti-Humanized Antibodies
ADN	Acide Désoxyribonucléique	HAMA	Human Anti-Mouse Antibodies
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché	HCP	Host Cell Protein
ANOVA	Analyse de la variance (ANalysis Of Variance)	HPLC	High Performance Liquid Chromatography
AOX	Enzyme Alcool OXYdase	HRP	Horse Radish Peroxydase
AOX _i	Gène i de l'Alcool OXYdase	LFB	Laboratoire français de Fractionnement et des Biotechnologies
ARN	Acide RiboNucléique	MB	Merck Biodevelopment
ATP	Adénosine TriPhosphate	MF/MS	Masse fraîche/Masse sèche
BSM	Basal Salt Medium	MP	Microplaque
CAM	Complexe d'Attaque Membranaire	Mut	Methanol utilization
CDR	Complementary Determining Region	NK	Natural Killer
CHASM	Charge, Hydrophobicité, Affinité, Solubilité, Stabilité, Masse moléculaire	OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economique
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use	OTC	Over The Counter
CHO	Chinese Hamster Ovary	pAOX ₁	promoteur du gène AOX ₁
CMP	Complex Medium for Production	PDCB	Process Development Cell Bank
CMR	Cancérogène, Mutagène et toxique pour la Reproduction	pO ₂	Pression partielle en dioxygène dissout
CSP	Code de la Santé Publique	RCB	Research Cell Bank
dAb	single domain Antibody	REACH	Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals
DO _{600nm}	Densité optique lue à 600nm	scfv	single chain variable fragment
DSP	DownStream Process	SCP	Single Cell Protein
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay	SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
EMA	European Medecine Agency	TNF	Tumeur Necrosis Factor
ENSTBB	Ecole Nationale Supérieure de Technologie des Biomolécules de Bordeaux	UFC	Unité Formant Colonies
ePTFE	expanded PolyTetraFluoroEthylene	USP	UpStream Process
Fab	Fragment antigen binding	VHH	Variable domain of Heavy chain of Heavy chain antibody
Fc	Fragment cristallisé (Fragment constant)	YPD	Yeast Peptone Dextrose
FDA	Food and Drug Administration		
FEM	Flask ErlenMeyer		
GRAS	Generally Recognised As Safe		
HACA	Human Anti-Chimeric Antibodies		

Table des figures

Figure 1.	Part des biomédicaments parmi les nouvelles molécules approuvées par la FDA.	14
Figure 2.	Biomédicaments en développement.	15
Figure 3.	Evolution des ventes des produits biotechnologiques en 2012.	15
Figure 4.	Représentation schématique d'un anticorps.	17
Figure 5.	Ingénierie des anticorps et humanisation.	20
Figure 6.	Représentation schématique des anticorps et des Nanobody®.	22
Figure 7.	Classification des biomédicaments commercialisés en France par aires thérapeutiques.	25
Figure 8.	Classification des biomédicaments commercialisés en France par classes pharmacologiques.	25
Figure 9.	Comparaison des coûts de développement et de réduction des prix entre un générique classique et un biosimilaire.	28
Figure 10.	Morphologie de différentes levures visualisées au microscope.	32
Figure 11.	Représentation schématique de la structure d'une levure.	34
Figure 12.	Cycle cellulaire de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	35
Figure 13.	Représentation schématique des voies métaboliques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	36
Figure 14.	Courbe et différentes phases de croissance.	39
Figure 15.	Principe de mesure de la turbidité par différentes méthodes.	43
Figure 16.	Différents niveaux pour les banques de micro-organismes.	47
Figure 17.	Etapes de la synthèse des protéines à partir de l'ADN : comparaison des systèmes procaryotes et eucaryotes.	49
Figure 18.	Code génétique.	50
Figure 19.	Vue d'ensemble des étapes du procédé de fermentation industrielle.	52
Figure 20.	Représentation schématique d'un bioréacteur de 2 litres monté.	53
Figure 21.	Les étapes du transfert d'oxygène.	53
Figure 22.	Bioréacteurs à agitation mécanique.	58
Figure 23.	Schéma fonctionnel d'un système comprenant une boucle de régulation.	61
Figure 24.	Différentes voies pour l'extraction de la protéine d'intérêt à partir de la culture.	63
Figure 25.	Stratégie de purification en trois étapes.	63
Figure 26.	Evolution du nombre de publications où le système d'expression de <i>Pichia pastoris</i> a été utilisé, de 1990 à 2005.	67
Figure 27.	Métabolisme de la levure <i>Pichia pastoris</i> en présence de méthanol.	71
Figure 28.	Eléments constitutifs des vecteurs pour l'expression dans <i>Pichia pastoris</i> .	73
Figure 29.	Différentes voies d'intégration du vecteur dans le génome de <i>Pichia pastoris</i> .	75
Figure 30.	Intégration multicopies du vecteur d'expression.	76
Figure 31.	Etapes du procédé telles que implémentées au laboratoire.	79
Figure 32.	Différentes composantes du système Duetz® développé par EnzyScreen®.	81
Figure 33.	Carte des éléments du plasmide pPICZ α , A, B et C.	82

Table des figures (suite)

Figure 34.	Système Cellferm-Pro® développé par DasGip.	83
Figure 35.	Méthodologie de préparation du milieu BSM.	88
Figure 36.	Vérification de la validité et de la qualité du modèle statistique calculé par le logiciel MiniTab®.	89
Figure 37.	Principe de la technologie Biacore.	93
Figure 38.	Comparaison des profils de croissance de <i>Pichia pastoris</i> obtenus avec le milieu YPD.	95
Figure 39.	Comparaison des profils de croissance de <i>Pichia pastoris</i> obtenus avec le milieu BSM _{ref.}	97
Figure 40.	Profils de croissance obtenus en microplaque avec le milieu CMP.	98
Figure 41.	Evaluation du système de culture en microplaque.	101
Figure 42.	Evolution de la densité optique et du pH au cours de la simulation du procédé en microplaque.	103
Figure 43.	Boîte à moustaches présentant les valeurs statistiques descriptives de la viabilité au cours du premier criblage.	105
Figure 44.	Représentation graphique des effets principaux des huit facteurs du premier criblage.	106
Figure 45.	Evolution des profils de croissance en fonction de la composition du milieu BSM.	107
Figure 46.	Aspect des cultures en fin de phase batch suite au deuxième criblage en microplaque.	109
Figure 47.	Suivi de la croissance au cours du deuxième criblage.	109
Figure 48.	Représentation graphique des effets principaux du cuivre, du zinc et du molybdate.	110
Figure 49.	Valeurs de biomasse obtenues au cours de l'évaluation de la concentration en zinc.	111
Figure 50.	Suivi de la croissance au cours de l'évaluation des interactions potentielles.	113
Figure 51.	Diagrammes des interactions entre le zinc, le fer, le bore et le manganèse.	114
Figure 52.	Evaluation de l'influence de la méthode de préparation du milieu BSM sur les profils de croissance.	115
Figure 53.	Aspect des culots humides après centrifugation des milieux de culture.	115
Figure 54.	Profils de croissance au cours de la phase de batch en fermenteur de un litre.	117
Figure 55.	Evolution de la biomasse sur l'ensemble du procédé en fermenteur d'un litre.	118

Table des équations

Equation 1.	Modèle de croissance.	39
Equation 2.	Equation globale du transfert de l'oxygène	55
Equation 3.	Calcul du volume à inoculer pour les cultures en microplaque.	85
Equation 4.	Modélisation mathématique d'une régression linéaire simple.	89
Equation 5.	Calcul du temps de génération.	91
Equation 6.	Modélisation de la réponse en fonction des huit facteurs du premier criblage, selon le plan matriciel prédéfini.	105
Equation 7.	Modélisation de la réponse prenant en compte trois facteurs pour le second criblage.	109

Table des tableaux

Tableau 1.	Classification européenne des domaines d'utilisation des biotechnologies.	12
Tableau 2.	Comparaison des caractéristiques d'un médicament chimique et d'un médicament biologique.	13
Tableau 3.	Comparaison d'une molécule chimique avec une molécule issue des biotechnologies.	14
Tableau 4.	Top 8 des ventes de médicaments issus des biotechnologies en 2012.	16
Tableau 5.	Classification des immunoglobulines et principales caractéristiques.	18
Tableau 6.	Nomenclature des anticorps monoclonaux.	21
Tableau 7.	Avantages et inconvénients des anticorps à domaine unique.	22
Tableau 8.	Comparaison des différents systèmes de production de biomédicaments.	23
Tableau 9.	Produits biosimilaires autorisés en France (Juillet 2013).	27
Tableau 10.	Classification simplifiée des levures.	31
Tableau 11.	Principales caractéristiques des cellules procaryotes et eucaryotes.	32
Tableau 12.	Comparaison des caractéristiques de croissance selon les conditions.	37
Tableau 13.	Caractéristiques des mobiles d'agitation sur les bioréacteurs pour les systèmes en phase liquide.	57
Tableau 14.	Différents types de procédés de culture.	58
Tableau 15.	Exemple de capteurs couramment employés pour la régulation des procédés de fermentation.	61
Tableau 16.	Techniques chromatographiques utilisées pour la purification de la molécule d'intérêt.	64
Tableau 17.	Avantages et inconvénients liés à l'utilisation du promoteur pAOX ₁ .	72
Tableau 18.	Propriétés des différentes souches de <i>P. pastoris</i> selon le phénotype.	74
Tableau 19.	Résultats de croissance obtenus lors de la mise en place du système de culture en microplaque avec les trois milieux YPD, CMP, et BSM _{ref} .	99
Tableau 20.	Matrice d'Hadamard pour le premier criblage et résultats expérimentaux correspondants aux différents milieux de culture.	104
Tableau 21.	Résultats obtenus suite à des cultures en Flask ErlenMeyer 125mL. Comparaison des valeurs entre le milieu BSM _{CZM} et le milieu BSM _{ref} .	108
Tableau 22.	Matrice d'expériences pour le deuxième criblage et résultats expérimentaux selon les milieux de culture.	108
Tableau 23.	Comparaison des valeurs obtenues entre le milieu BSM _{pos} et le milieu BSM _{ref} .	111
Tableau 24.	Matrice d'expériences pour l'étude des interactions en microplaque.	112
Tableau 25.	Plan d'expériences pour l'évaluation de la productivité en DasGip® et valeurs relevées au cours du procédé.	116
Tableau 26.	Résultats de l'analyse Biacore évaluant le titre en protéine d'intérêt dans les surnageants de culture des fermenteurs de 1L après 96 heures d'induction.	118

CHAPITRE I

LES BIOTECHNOLOGIES DANS LE

DOMAINE DE LA SANTE

1. Avant-propos

Les biotechnologies, comme leurs noms l'indiquent, font appel aux sciences des êtres vivants - la biologie - associées aux sciences techniques de l'ingénieur. Elles regroupent un ensemble de compétences se basant sur des disciplines telles que la microbiologie, l'enzymologie, le génie des procédés, la biologie moléculaire ou encore l'informatique.

L'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) définit la biotechnologie comme « l'application des sciences et techniques à des organismes vivants, qu'il s'agisse d'éléments ou de produits pour transformer les matériaux vivants ou non, dans le but de produire des connaissances, des biens et des services ». Cette définition, proposée en 1982 et encore admise à ce jour, reste large pour tenir compte des très nombreuses applications des biotechnologies. Afin de simplifier les dénominations, les instances européennes ont classé les domaines d'utilisation des biotechnologies selon cinq grandes branches, identifiées par des noms de couleurs (Tableau 1). Les propos de cette étude se consacrent uniquement aux biotechnologies rouges.

Tableau 1. Classification européenne des domaines d'utilisation des biotechnologies.

Classification	Champ d'application	Exemples d'applications
Biotechnologies rouges	Santé	Thérapies, vaccins, diagnostiques
Biotechnologies vertes	Agro-alimentaire	Transformation de produits alimentaires, biomatériaux, énergie
Biotechnologies jaunes	Environnement	Traitement et élimination des pollutions (effluents industriels, assainissement des sols, traitement eaux usées)
Biotechnologies blanches	Industrie chimique	Systèmes biologiques alternatifs aux produits chimiques (carburants, textiles, polymères)
Biotechnologies bleues	Biologie marine	Cosmétique, aquaculture, santé

2. Les biomédicaments en 2014 : aspects généraux et notions économiques

2.1. Comparaison des médicaments chimiques aux médicaments biologiques

2.1.1. Définitions et propriétés

L'article L 5111-1 du Code de la Santé Publique (CSP) définit le médicament comme « toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou l'animal ou pouvant leur être administrée, en

vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique ».[1]

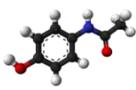
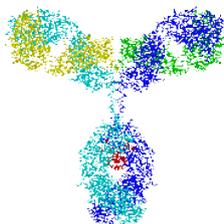
Le terme biomédicament regroupe plusieurs catégories de médicaments dont le point commun est l'utilisation de systèmes biologiques en vue de la production de la substance active. L'article L5121-1§14 du CSP définit un médicament biologique comme « tout médicament dont la substance active est produite à partir d'une source biologique ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physiques, chimiques et biologiques ainsi que de la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle »[2]. Cette définition rend compte des nombreuses contraintes liées aux biomédicaments pour assurer la qualité et la sécurité auprès des patients. Au-delà de la molécule elle-même, c'est la source biologique et l'ensemble des étapes du procédé qui doivent être rigoureusement contrôlés et documentés.

La fabrication d'un médicament traditionnel met en œuvre des réactions chimiques connues. Ainsi, des lots homogènes et reproductibles du même principe actif sont obtenus et le produit final est précisément défini et caractérisé dans son intégralité (Tableau 2). Un médicament biologique est plus complexe car il est issu d'organismes vivants, extrêmement sensibles aux variations du procédé. Contrairement aux médicaments chimiques, des différences de fabrication sont inévitables et une population hétérogène de la molécule active est obtenue en fin de procédé ; d'où la nécessité de multiplier les contrôles au niveau de la source biologique, des bioréacteurs de production et au cours des phases de purification. La complexité moléculaire (Tableau 3) implique un grand nombre d'analyses pour évaluer la qualité et la pureté de chaque lot de biomédicaments conformément aux normes préétablies. Malgré la combinaison de diverses techniques physico-chimiques et biologiques, il demeure impossible de caractériser l'intégralité de la molécule d'intérêt.

Tableau 2. Comparaison des caractéristiques d'un médicament chimique et d'un médicament biologique.

	Médicament classique	Biomédicament
Taille	Petite	Grande
Structure	Simple	Complexe
Production	Reproductibilité	Variabilité biologique
Nombre de tests contrôles	50	250
Caractérisation	Complète	Partielle
Stabilité	Généralement stable	Protéines sensibles à l'environnement
Immunogénicité	Peu immunogène	Fortement immunogène

Tableau 3. Comparaison d'une molécule chimique avec une molécule issue des biotechnologies.

Molécule	Paracétamol	Cetuximab (Anticorps monoclonal)
Formule brute	$C_8H_9NO_2$	$C_{6484}H_{10042}N_{1732}O_{2023}S_{36}$
Masse molaire	151 g/mol	145 780 g/mol
Nombre atomes	20	20 317
Représentation (non à l'échelle)		

2.1.2. Evolution du marché

Au début du XX^{ème} siècle, de nouvelles molécules sont découvertes et suscitent l'intérêt des industriels. C'est le cas de la pénicilline, découverte en 1928, et produite à l'échelle industrielle dans les années 1940. Ces recherches vont conduire les industries pharmaceutiques à changer de modèle et à s'orienter vers des procédés de fabrication faisant appel aux biotechnologies. En se basant sur l'ingénierie du vivant, les industriels ont mis au point de nouvelles générations de médicaments, apportant des progrès considérables dans le traitement de maladies graves. Dans les années 1980, l'évolution des connaissances dans les domaines de la génétique et du génie fermentaire ont permis de concevoir des bioprocédés innovants à l'échelle industrielle. Les produits développés sont de plus en plus sophistiqués, avec une grande spécificité d'action et une qualité optimisée, à l'image des anticorps monoclonaux.

Les médicaments issus des biotechnologies se sont progressivement imposés en tant que moteur de l'innovation thérapeutique. Le nombre d'enregistrements de biomédicaments par la FDA (Food and Drug Administration) (Figure 1) et le nombre de biomolécules en développement dans les industries pharmaceutiques américaines (907 comptabilisées en 2013) (Figure 2) rendent compte de la dynamique de ce domaine [3].

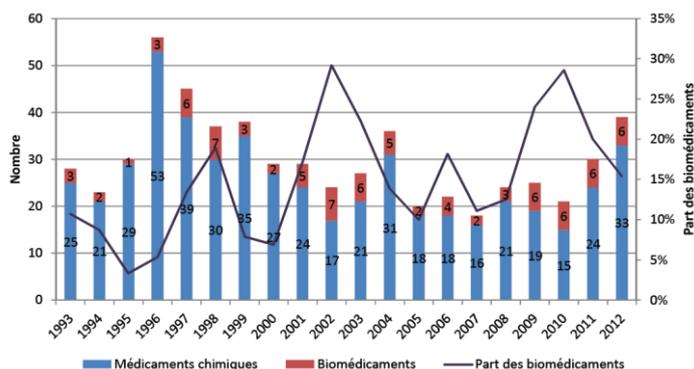


Figure 1. Part des biomédicaments parmi les nouvelles molécules approuvées par la FDA[3]

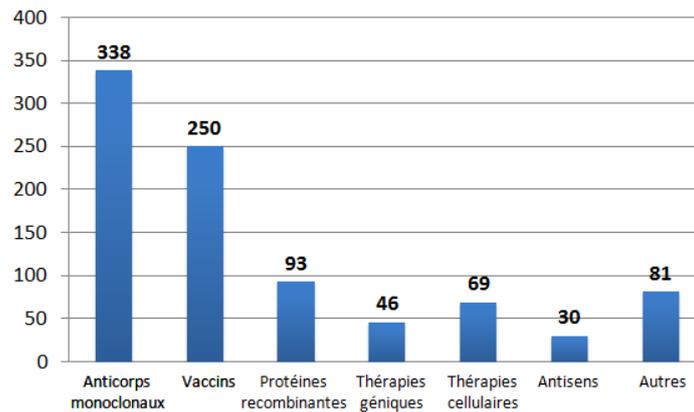


Figure 2. Biomédicaments en développement [3]¹.

2.2. Différents types de biomédicaments

2.2.1. Catégories thérapeutiques

Les biomédicaments sont retrouvés dans de nombreuses catégories thérapeutiques et sont pour l'essentiel des hormones (insuline, érythropoïétine, hormones de croissance), des cytokines (interférons, facteurs de croissance, facteur de nécrose tumorale – TNF), des anticorps monoclonaux, des facteurs de coagulation et des vaccins. Les anticorps représentent la classe thérapeutique la plus importante en termes de chiffre d'affaires. En 2012, leurs ventes s'élevaient à 64,6 milliards de dollars contre 60,1 milliards pour les autres protéines (Figure 3) [4]. Parmi les 8 molécules les plus vendues en 2012, 6 étaient des anticorps (Tableau 4). En 2014, 36 des 149 protéines recombinantes approuvées par la FDA sont des anticorps [5].

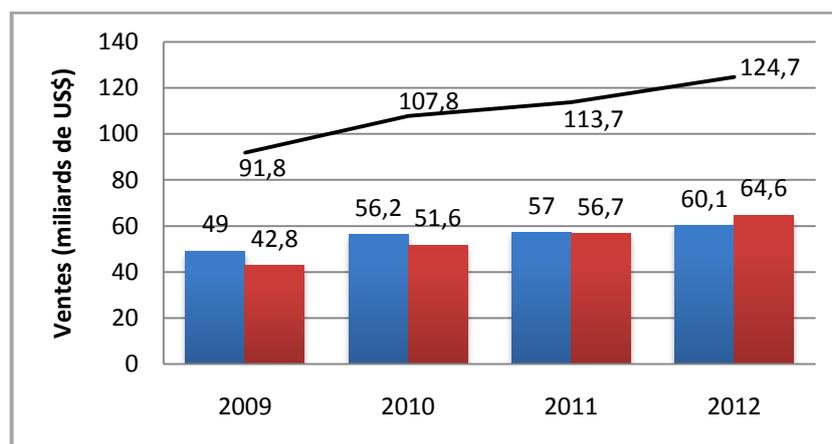


Figure 3. Evolution des ventes des produits biotechnologiques en 2012[4]. Comparaison des ventes des protéines hors anticorps (bleu) par rapport à celles des anticorps (rouges) et ventes totales (ligne continue noire).

¹ Données complétées avec le rapport « Biologic Medicines in Development », de 2013, par PhRMA, disponible à l'URL suivant : <http://www.phrma.org/sites/default/files/pdf/biologics2013.pdf> [Consulté le 28/08/2014]

Tableau 4. Top 8 des ventes de médicaments issus des biotechnologies en 2012.²

#	Nom de la molécule Nom de la spécialité	Société	Catégorie de produits	Indication	Cible/Mécanisme d'action	Ventes 2012 (en milliards US\$)	Evolution 2012/2009 (%)
1	Adalimumab Humira Pen	Abbott & Eisai	Anticorps	Polyarthrite rhumatoïde	Antagoniste TNF α	9,53	74
2	Etanercept Enbrel	Amgen & Pfizer & Takeda Pharmaceutical Co	Anticorps	Polyarthrite rhumatoïde	Antagoniste TNF et autres indications	8,41	28
3	Infliximab Remicade	Centocor (J&J) & Merck & Mitsubishi Tanabe Pharma	Anticorps	Polyarthrite rhumatoïde	Antagoniste TNF α	7,47	26
4	Rituximab Rituxan/ MabThera	Roche (Genentech/ Chugai) & Biogen-IDEC	Anticorps	Lymphome non-Hodgkinien	CD20	7,14	26
5	Insuline glargine Lantus	Sanofi	Protéine autre	Diabète types 1 et 2	Récepteurs à l'insuline	6,51	56
6	Trastuzumab Herceptin	Roche (Genentech/ Chugai)	Anticorps	Cancer du sein Her2 positif	HER2	6,27	28
7	Bevacizumab Avastin	Roche (Genentech/ Chugai)	Anticorps	Cancer colorectal métastatique	VEGF	6,14	6
8	Pegfilgrastim Neulasta	Amgen	Protéine autre	Neutropénies	Récepteur G-CSF	4,09	22

² Extrait du rapport « R&D pipeline news », du 07/05/2013, par Lamerie Business Intelligence - www.pipelinereview.com

2.2.2. Anticorps

Les anticorps, ou immunoglobulines, représentent l'une des composantes du système immunitaire. Synthétisés par des lymphocytes B appelés plasmocytes, ils reconnaissent spécifiquement un antigène à la surface d'une cellule étrangère à l'organisme, puis mettent en œuvre des mécanismes pour la neutraliser et l'éliminer.

2.2.2.1. Structure

Les anticorps sont des glycoprotéines hétérodimériques, bivalentes et bifonctionnelles. Une molécule d'anticorps est constituée de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes légères L (Light), et deux chaînes lourdes H (Heavy) (Figure 4A). La structure, en forme de Y, est maintenue grâce à des liaisons covalentes (ponts disulfures) et non covalentes (liaisons hydrogènes, liaisons ioniques, interactions hydrophobes et forces de Van der Waals).

Pour renforcer les interactions entre les chaînes, la structure des anticorps s'organise sous forme de domaines globulaires. Ces repliements immunoglobuliniques sont constitués de deux feuillets plissés antiparallèles, contenant chacun des brins β connectés par des boucles de longueurs variables (Figure 4B).

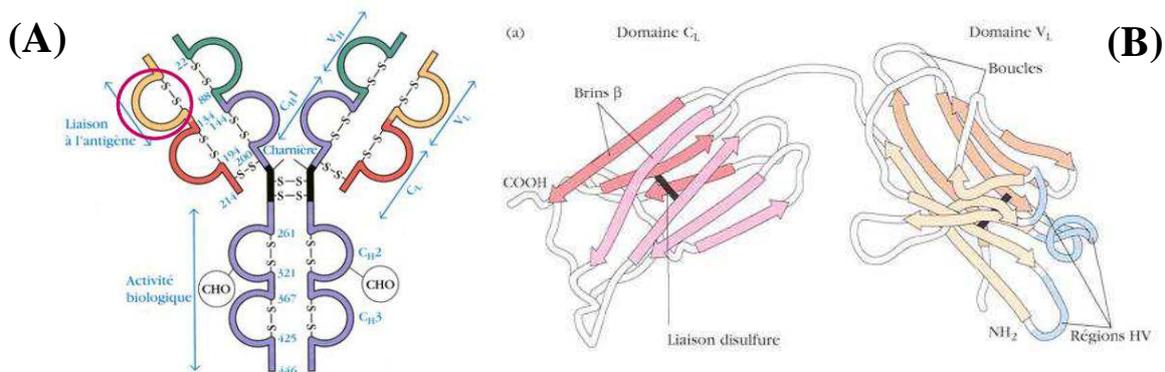


Figure 4. Représentation schématique d'un anticorps³. Vue d'ensemble (A), et représentation des feuillets β d'une chaîne légère avec les repliements immunoglobuliniques des domaines constants et variables (B). Les régions HV correspondent aux régions hypervariables (CDR).

Le séquençage des chaînes lourdes et légères a révélé deux types de domaines : les domaines variables, présentant une grande diversité de séquence d'acides aminés entre les différentes immunoglobulines ; et les domaines constants, comprenant de très faibles variations de séquence et une structure primaire fortement conservée. Une analyse plus approfondie des domaines variables a permis de mettre en évidence des régions hypervariables. Des cartes génétiques des domaines variables des chaînes lourdes et légères d'anticorps humains, montrent

³ Source : Ouvrage « Immunologie : le cours de Janis Kuby », de Janis Kuby, 2008, 6^{ème} édition

que le maximum de variations est retrouvé dans les portions de séquences correspondant aux boucles joignant les brins β .

Chaque domaine variable possède trois boucles hypervariables, également appelées CDR (Complementary Determining Regions), et l'association des six régions hypervariables constitue le site de reconnaissance et de fixation de l'antigène, le paratope.

La composition conservée des parties constantes des chaînes lourdes et légères définit les isotypes et les classes d'anticorps (Tableau 5). La chaîne légère présente deux isotypes, κ (60% des chaînes légères humaines) et λ , et la chaîne lourde cinq, μ , γ , ϵ , δ et α . Les isotypes diffèrent par la séquence, la structure, la masse moléculaire, le nombre et la position des ponts disulfures, et par les glycosylations.

Tableau 5. Classification des immunoglobulines et principales caractéristiques.

Classe	IgG	IgM	IgA	IgE	IgD
Isotype chaîne H	γ	μ	α	ϵ	δ
Domaines constants chaîne H	C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}	$C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, C_{H4}$	C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}	$C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, C_{H4}$	C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}
Masse moléculaire chaîne H	50 kDa	70 kDa	55 kDa	70 kDa	60 kDa
Masse totale	150 kDa	900 kDa	300 kDa	190 kDa	150 kDa
Valence	2	2 ou 10	2 ou 4	2	2
Sous-classes	IgG1, 2, 3 et 4	-	IgA1 et 2	-	-
Concentration sérique (g/L)	8 à 18	3,5 à 4,5	1 à 2	0 à 0,4	0,02 à 0,5
Demi-vie dans sérum	7 à 21 jours	5 jours	6 jours	3 jours	2 jours
Fonction(s)	Opsonisation Neutralisation ADCC CDC	Neutralisation CDC	Neutralisation	Allergie	Mal connu

2.2.2.2. Fonctions des anticorps

Les anticorps possèdent quatre fonctions majeures. En reconnaissant spécifiquement l'épitope d'un antigène, ils sont capables de neutraliser différents organismes étrangers au corps. Par exemple, ils induisent l'agrégation des bactéries entre elles ou inhibent leur adhésion aux récepteurs cellulaires.

En se fixant sur un antigène étranger, les anticorps stimulent les mécanismes effecteurs de la phagocytose pour détruire la particule pathogène détectée. Cette activation, appelée opsonisation, passe par l'intermédiaire de cellules possédant à leur surface des récepteurs aux fragments constants des anticorps (Fragment Fc). L'efficacité de l'activation de la phagocytose dépend de l'agrégation et de l'affinité des récepteurs Fc engagés.

Les anticorps activent le système du complément. Ce système est constitué d'un ensemble de facteurs protéiques sériques, s'activant en cascade pour aboutir à la destruction du pathogène. Il s'agit d'un élément majeur de l'immunité naturelle. La voie classique d'activation met en jeu un complexe immun anticorps-antigène, qui va engendrer l'association des différents facteurs du complément et leur réarrangement, pour former un pore dans le pathogène, le complexe CAM (Complexe d'Attaque Membranaire). En plus de la lyse cellulaire engendrée par le choc osmotique, de nombreux agents chimio-attractants sont libérés, favorisant la venue, au niveau du site d'infection, de phagocytes.

Le dernier rôle majeur des anticorps est une action cytotoxique. Ils activent des cellules tueuses (macrophages, neutrophiles, NK – Natural Killer) possédant des récepteurs au fragment Fc. Ici, le mécanisme effecteur fait intervenir le phénomène d'apoptose de la cellule infectée.

2.2.2.3. *Anticorps monoclonaux*

Un sérum polyclonal est constitué d'un mélange d'anticorps sériques dirigés contre des épitopes différents d'un antigène donné. Ces anticorps sont produits par un ensemble de clones différents de plasmocytes, chaque clone sécrétant un seul type d'anticorps. Un anticorps monoclonal est, comme son nom l'indique, dirigé contre un seul épitope car il est issu d'un seul clone.

Les lymphocytes B ne se multipliant pas en culture et leur durée de vie étant limitée à quelques jours, les clones sélectionnés pour synthétiser un anticorps particulier n'étaient pas fiables pour assurer une production significative. La technique des hybridomes, développée par Kohler et Milstein dans les années 1970, permet, grâce à l'utilisation de myélomes, de fournir une source illimitée d'anticorps de spécificité connue et unique.

La première étape de cette technique consiste à immuniser des animaux de laboratoire par l'injection d'un antigène. Le système immunitaire de l'animal synthétise alors des anticorps spécifiquement dirigés contre l'antigène. Après évaluation de la réponse par un test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) de titration, l'animal ayant le mieux répondu est sacrifié et les lymphocytes B sont prélevés. Pour assurer leur immortalité, ces cellules sont

fusionnées avec des myélomes TK⁻ (Thymidine Kinase déficiente) pour former des hybridomes. Lors de cette étape, des cellules non fusionnées ou des fusions non souhaitées (lymphocyte-lymphocyte ou myélome-myélome) sont présentes. La culture du mélange cellulaire sur un milieu HAT (Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine) permet de sélectionner les hybridomes : les lymphocytes, mortels, disparaissent par apoptose ; les myélomes, non fusionnés, meurent car la voie de synthèse *de novo* des nucléotides est inhibée par l'aminoptérine et la thymidine apportée par le milieu ne peut être utilisée par ces mutants TK⁻. Tous les hybridomes sélectionnés ne sécrètent pas l'anticorps d'intérêt, et un clonage cellulaire est nécessaire pour isoler par dilution limite chaque hybridome. Un criblage est ensuite réalisé par ELISA sur les surnageants de culture. Enfin, le clone sélectionné est utilisé pour la production à l'échelle industrielle de l'anticorps souhaité.

2.2.2.4. Ingénierie des anticorps

Les premiers anticorps monoclonaux ont été produits à l'aide de systèmes murins. Les inconvénients majeurs de ces anticorps étaient d'une part leur demi-vie courte (1 jour), obligeant des injections fréquentes ; mais surtout l'apparition de phénomènes allergiques sévères ainsi qu'une réponse immunitaire HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies) se traduisant par la synthèse d'anticorps humains anti-souris. Afin de diminuer les réponses HAMA et pour augmenter la stabilité des anticorps murins, des anticorps chimériques ont été développés : le site de reconnaissance de l'antigène, porté par les parties variables de l'anticorps murin, est conservé mais les régions constantes des chaînes lourdes et légères de ces anticorps sont remplacées par des régions constantes humaines (Figure 5).

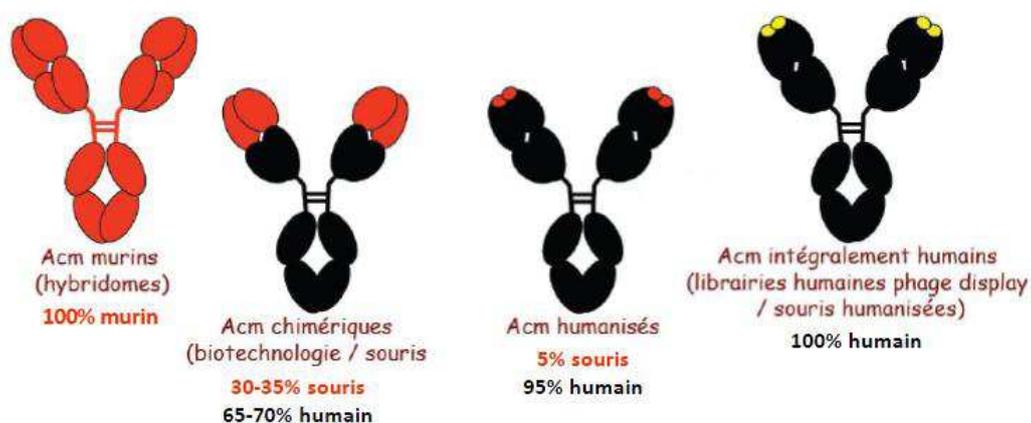


Figure 5. Ingénierie des anticorps et humanisation⁴.

⁴ Source : Médecine sciences : M/S 25, 12 (2009) 1149-54

Avec ces anticorps chimériques, l'immunogénicité des molécules est réduite mais toujours existante et des réponses HACA (Human Anti-Chimeric Antibody) limitent la demi-vie et l'efficacité clinique. Pour aller plus loin, des anticorps monoclonaux humanisés ont été mis au point. Les parties non humaines sont réduites à leur minimum : seules les régions CDR, responsable de la liaison avec l'antigène, sont intégrées dans le squelette d'un anticorps humain. Les réponses immunogènes ont été significativement réduites mais des réponses HAHA (Human Anti-Humanized Antibody) subsistent, et l'affinité est réduite comparée aux anticorps murins de départ. A ce jour, ces anticorps entièrement humains ont été développés, par exemple, grâce à la création d'une lignée de souris transgéniques ou par l'utilisation de la technique de phage-display.

Il existe une Dénomination Commune Internationale (DCI) pour la nomenclature des anticorps monoclonaux. Celle-ci est constituée d'un préfixe unique pour chaque molécule, suivi d'un infixé précisant la cible, puis d'un suffixe lié au degré d'humanisation de l'anticorps monoclonal (Tableau 6).

Tableau 6. Nomenclature des anticorps monoclonaux.

Infixe (Cible)		Suffixe (Source)		Exemple
-tu-	tumeur	- momab	murin	Ibritumomab (Zevalin®)
-ci(r)-	cardiovasculaire	- ximab	chimérique	Abciximab (Reopro®)
-vi(r)-	virus	- zumab	humanisé	Palivizumab (Synagis®)
-li(m)-	immune	- mumab	humains	Adalimumab (Humira®)

Quelque soit le degré d'humanisation, les anticorps monoclonaux présentent des limitations parmi lesquelles une masse moléculaire élevée et des coûts de production importants. Ces deux points expliquent que les industriels ont cherché à développer de nouveaux formats : les fragments d'anticorps. Les avantages de ces molécules de taille minimaliste et non glycosylées sont leur efficacité plus importante, la diminution du risque de réactions immunes, et les coûts de production moins élevés car les systèmes de production procaryotes sont envisageables (cf. Chapitre I, §2.3. Systèmes de production). Ainsi, des fragments monovalents Fab (fragments VL-CL liés par un pont disulfure à VH-CH1) et scfv (VL-VH lié par un peptide de 20 acides aminés environ) ont été mis au point. Plus récemment, des fragments à domaine unique (dAbs- single domain antibodies) ont été développés à partir des anticorps de camélidés (chameaux, lamas).

Ces anticorps sont dépourvus de chaîne légère et des domaines constants de la chaîne lourde (Figure 6) : ils ne sont constitués que du seul domaine variable de la chaîne lourde (VHH) fixant l'antigène. Ces fragments associent les avantages des anticorps conventionnels aux propriétés fondamentales des petites molécules thérapeutiques, telles qu'une affinité élevée, une plus grande pénétration dans les tissus, ainsi qu'une plus grande stabilité (Tableau 7).

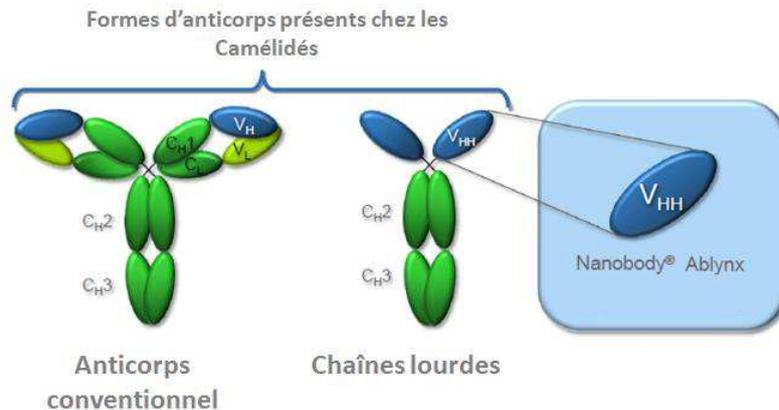


Figure 6. Représentation schématique des anticorps et des Nanobody®⁵.

Tableau 7. Avantages et inconvénients des anticorps à domaine unique.

Avantages	Inconvénients
Petite taille et compacts	Élimination rapide (petite taille)
Production chez bactéries et levures	Demi-vie réduite, nécessitant le recours à des protéines de fusion avec une autre protéine (ou polyéthylène glycol)
Bonnes solubilité et stabilité	
Affinité très forte	
Accès à la cible	

2.3. Systèmes de production

Les caractéristiques d'un système idéal de production sont les suivantes : un niveau de production élevé (hauts rendements), la production de protéines solubles et actives, un procédé simple à mettre en œuvre et peu coûteux, et une production facilement transposable à l'échelle industrielle. Dans la pratique, aucun système n'est susceptible de satisfaire toutes les exigences, d'où la nécessité d'optimiser les systèmes d'expression et de production des molécules recombinantes. Le choix d'un système de production plutôt qu'un autre va dépendre de plusieurs critères (Tableau 8).

⁵ Source : Site Internet de la société Ablynx, rubrique « Understanding Nanobodies », disponible à l'URL suivant : <http://www.ablynx.com/en/research-development/nanobody-technology/understanding-nanobodies/> [Consulté le 10/12/2013]

Tableau 8. Comparaison des différents systèmes de production de biomédicaments.

Caractéristiques	Bactéries	Levures	Cellules insectes	Cellules mammifères	Animaux transgéniques	Cellules végétales	Plantes transgéniques
Coût de production	+	+	++	+++	+++	++	+
Vitesse	+++	+++	++	+	+	++	+
Productivité	++	++	+	+	+	+	+
Durée développement procédé	+	+	+	++	+++	++	+++
Changement d'échelles	+++	+++		+	+	++	+++
Glycosylation	-	+/-	+	+	+	+	+
Elimination méthionine initiatrice	+/-	+	+	+	+	+	+
Folding	+/-	+	+	+	+	+	+
Risque de contamination	Endotoxines	Faible	Faible	Virus, prions	Virus, prions	Faible	Faible
Qualité du produit	+	++		++++	++++	+++	+++

Tout d'abord, il doit prendre en compte les paramètres liés à la protéine à produire, tant ses caractéristiques propres (structure, fonction, activité biologique, modifications post-traductionnelles) que l'objectif fixé pour la production (étude structurale, étude fonctionnelle, agent thérapeutique, usage industriel...). Il convient également de prendre en considération les aspects industriels et économiques des procédés à mettre en œuvre : coût des installations, investissements, facilité de transfert d'échelles, temps de développement, risques de contaminations ...

Les systèmes les plus simples emploient des bactéries, et notamment *Escherichia coli*. Ces systèmes sont peu coûteux et facilement transposables à l'échelle industrielle. La croissance rapide de ces micro-organismes, associée à une bonne productivité, en font un système de choix pour la synthèse de molécules simples ne nécessitant pas de modifications post-traductionnelles. En effet, ces organismes ne possèdent pas la machinerie cellulaire, ni les équipements enzymatiques, nécessaires à la réalisation de réactions telles que des glycosylations.

Les levures, en tant qu'organismes eucaryotes, peuvent réaliser ces glycosylations, mais celles-ci diffèrent des réactions observées chez les mammifères par l'utilisation, notamment, de grandes quantités de mannoses. Les levures présentent quatre critères importants d'un point de vue industriel : (1) ce sont des organismes unicellulaires, et en ce sens, font appel à des procédés

semblables à ceux utilisés avec les bactéries ; (2) ce sont des eucaryotes et possèdent donc des voies métaboliques et sécrétoires assimilables à celles des cellules mammifères ; (3) ce sont des souches GRAS (Generally Recognized As Safe), c'est-à-dire ne présentant pas de virus pathogène connu ; (4) et ce sont des organismes hétérotrophes, propriété qui permet de contrôler leur croissance par l'apport du substrat.

Pour des molécules plus complexes, le recours aux cellules mammifères, de type cellules CHO (Chinese Hamster Ovary), s'avère incontournable. Ces systèmes sont fragiles, très coûteux et longs à développer. Toutefois, la complexité des molécules envisageables et leur haut niveau de qualité expliquent que ce système reste à ce jour l'un des plus utilisés pour la production de protéines recombinantes.

D'autres systèmes existent mais sont peu exploités par les industriels à l'heure actuelle, notamment en raison de l'absence de systèmes commercialisés. Il s'agit des cellules d'insectes, des cellules végétales et des animaux et plantes transgéniques.

2.4. Aspect réglementaire

En Europe, la procédure d'autorisation sur le marché des biomédicaments suit obligatoirement une procédure centralisée, conformément à l'article 3 du Règlement 726/2004 [6]. Cette procédure se décline en deux phases. La première est la phase d'instruction au cours de laquelle un dossier unique est déposé auprès de l'Agence Européenne du Médicament (EMA) dont le Comité des produits médicaux à usage humain (CHMP) évalue le contenu de la demande. Puis la Commission Européenne prononce une décision unique concernant l'AMM. Par la voie centralisée, les biomédicaments possèdent l'autorisation à la commercialisation dans l'ensemble des états membres de l'Union Européenne pour une durée de 5 ans, renouvelable.

2.5. Marché des biomédicaments en France

Depuis l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en 1984 du premier biomédicament, une insuline recombinante produite chez *Escherichia coli*, le marché des biotechnologies dans le domaine de la santé n'a cessé de croître. Au mois de mai 2013, 168 médicaments issus du génie génétique étaient recensés sur le marché français [3]. Ces biomédicaments représentent 25% du marché pharmaceutique total avec une croissance de 3 à 4% par an. Les ventes de ces molécules à haute valeur ajoutée s'élèvent à 7 milliards d'euros.

Les 168 molécules commercialisées se répartissent autour de 16 aires thérapeutiques, reflétant l'étendue des solutions thérapeutiques innovantes apportées par ces molécules. Les aires thérapeutiques majeures sont l'infectiologie, la cancérologie, l'hématologie, la rhumatologie, le diabète et l'endocrinologie (Figure 7).

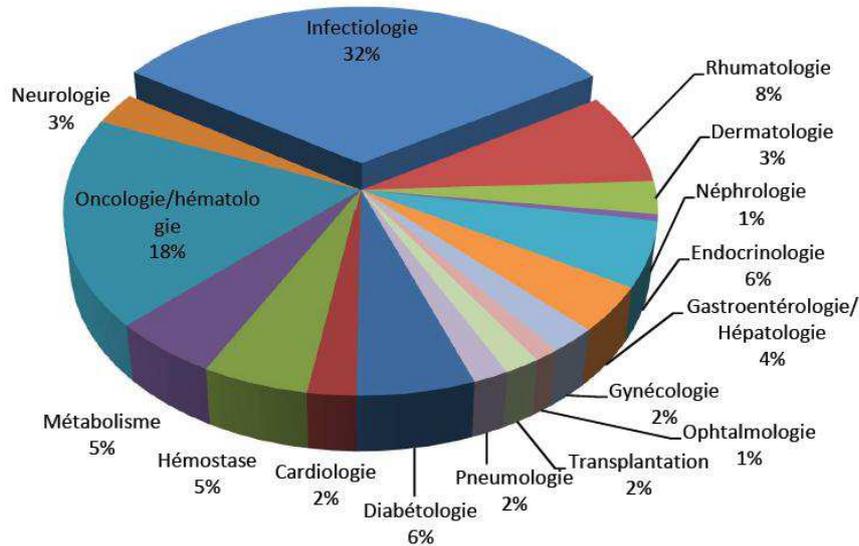


Figure 7. Classification des biomédicaments commercialisés en France (au 31/05/2013) par aires thérapeutiques [3].

Sur le plan pharmacologique, les 168 biomédicaments disponibles sur le marché français se partagent en 9 classes pharmacologiques majeures dont les principales sont : les vaccins, les anticorps monoclonaux, les facteurs de croissance, les hormones et les enzymes. A elles seules, ces 5 classes représentent 78% des biomédicaments sur le marché français (Figure 8).

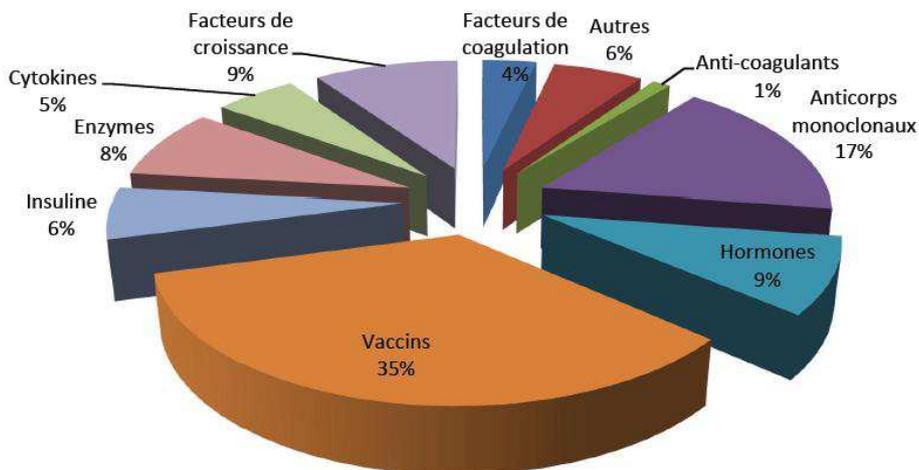


Figure 8. Classification des biomédicaments commercialisés en France (au 31/05/2013) par classes pharmacologiques [3].

Parmi les 168 biomédicaments, 58 sont des vaccins, ce qui s'inscrit logiquement dans la continuité du positionnement historique de la France dans ce domaine, avec comme acteur principal la société Sanofi. La France est également bien positionnée dans la production de l'insuline et dans celle des produits dérivés du sang, avec l'implication majeure du Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB) et de Sanofi Pasteur, en collaboration avec l'Institut Mérieux. En revanche, la France accuse un retard considérable dans la production des produits biotechnologiques de deuxième génération : les anticorps monoclonaux. Le faible nombre d'installations pour la production à l'échelle commerciale (25 sites recensés en 2010 [7]), explique qu'aucune autorisation de marché sur les 47 AMM déposées au niveau européen en 2012, ne soit enregistrée sur un site français [8]. Toutefois, les industries pharmaceutiques françaises investissent, regroupent leurs installations et leurs savoir-faire, pour développer les biomédicaments de troisième génération, à savoir, les thérapies géniques, les thérapies cellulaires et les biosimilaires.

2.6. Les biomédicaments de demain

2.6.1. Thérapies géniques et cellulaires

L'un des axes majeurs de développement des biomédicaments est celui des produits de thérapies géniques et de thérapies cellulaires, comme l'indiquent les nombreuses études et recherches en cours.

La thérapie génique se définit comme l'ensemble des procédés reposant sur l'utilisation de l'ADN comme molécule thérapeutique. Elle consiste à transférer un gène fonctionnel dans les cellules somatiques du patient afin de corriger, ou de restaurer, la production de la protéine codée par ce gène, et à l'origine de la maladie. Au-delà des maladies génétiques telles que la mucoviscidose (mutation du gène CFTR) ou la myopathie de Duchenne (mutation du gène DMD), la thérapie génique pourrait trouver des applications dans d'autres maladies graves et notamment dans la lutte contre le cancer. En France, l'acteur principal dans le développement et la fabrication de ces gènes médicaments est le centre de production Généthon Bioprod, devenu établissement pharmaceutique en 2013 [9].

La thérapie cellulaire consiste à greffer des cellules pour restaurer la fonction d'un organe ou d'un tissu endommagé. Ces cellules proviennent soit d'un donneur, soit du patient lui-même. Dans ce dernier cas, les cellules sont génétiquement modifiées pour corriger les anomalies. Trois types de cellules souches sont étudiés : les cellules souches dites adultes, celles dites embryonnaires et les cellules souches pluripotentes induites. Des études, soutenues par le

Téléthon, sont actuellement menées pour montrer l'efficacité de la greffe de cellules souches cardiaques chez les patients souffrant d'infarctus ou bien encore pour tenter de traiter les ulcères cutanés dans la drépanocytose [8].

2.6.2. Biosimilaires

Avec l'expiration des brevets de nombreux biomédicaments, un nouveau marché s'ouvre pour les industriels : celui des biosimilaires. En France, 7 biosimilaires étaient recensés en juillet 2013 (Tableau 9) [10]. Le prix d'un biosimilaire étant en moyenne 20 à 30% inférieur à celui du produit de référence, leur vente représenterait un gain économique de 0,5 à 1 milliard d'euros par an en France.

Tableau 9. Produits biosimilaires autorisés en France (Juillet 2013) [10].

Nom	Substance active	Comparateur	Laboratoire titulaire de l'AMM	Date d'autorisation
Omnitrope	Somatropine	Genotropin	Sandoz Gmbh	12/04/2006
Binocrit	Epoetine α	Eprex	Sandoz Gmbh	28/08/2007
Retacrit	Epoetine α	Eprex	Hospira	18/12/2007
Ratiograstim	Filgrastim	Neupogen	Ratiopharm	15/09/2008
Tevagrastim	Filgrastim	Neupogen	Teva	15/09/2008
Zarzio	Filgrastim	Neupogen	Sandoz Gmbh	06/02/2009
Nivestim	Filgrastim	Neupogen	Hospira	08/06/2010

Contrairement aux médicaments génériques soumis à des dossiers d'AMM allégés, de nombreuses contraintes s'appliquent aux biosimilaires. L'article L5121-1§15 du CSP définit un médicament biosimilaire comme « tout médicament biologique de même composition qualitative et quantitative en substance active et de même forme pharmaceutique qu'un médicament biologique de référence » mais qui ne peut être « regardé comme une spécialité générique en raison des différences liées notamment à la variabilité de la matière première et aux procédés de fabrication et nécessitant que soient produites des données précliniques et cliniques supplémentaires » [2]. Ainsi, contrairement à des idées reçues, les biosimilaires ne sont pas les génériques des biomédicaments. Ils représentent une catégorie de médicaments à part entière, qui sont semblables mais non strictement identiques aux produits de référence dont ils sont la copie légale. Devant ce statut particulier, la Directive Européenne 2004/27/CE précise les résultats attendus en vue de l'obtention de l'AMM [11]. Contrairement aux spécialités génériques, où la démonstration de la bioéquivalence par des études de biodisponibilité est suffisante, les dossiers d'AMM pour des biosimilaires doivent en plus inclure des données sur la qualité, la sécurité

mais aussi l'efficacité clinique. L'examen du dossier est réalisé par le CHMP de l'EMA selon une procédure centralisée, conformément à la Directive Européenne 2011/83 [12]. La mise en place d'essais cliniques et la complexité des processus de production expliquent que les différentiels de prix obtenus avec les biosimilaires sont inférieurs à ceux observés pour les génériques. Le développement d'un biosimilaire peut atteindre des coûts jusqu'à 100 fois supérieurs à celui des génériques classiques (Figure 9) [13].

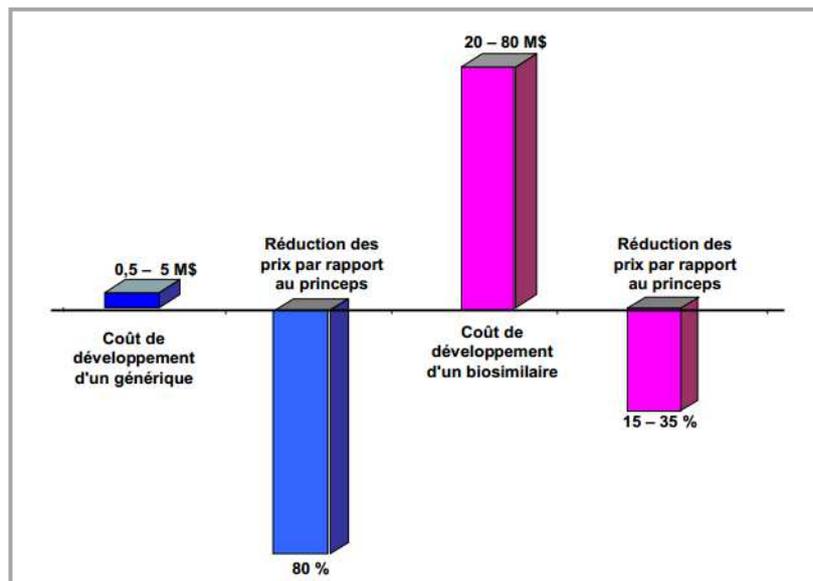


Figure 9. Comparaison des coûts de développement et de réduction des prix entre un générique classique (bleu) et un biosimilaire (rose) [13].

Pour soutenir le développement et l'essor des biosimilaires en France, l'article 47 de la Loi de Financement de la Sécurité Sociale (LFSS) pour l'année 2014 [14], autorise les pharmaciens d'officine à substituer un biomédicament par un biosimilaire sous certaines conditions (information du prescripteur, substitution uniquement lors de l'initiation du traitement, mention sur l'ordonnance, renseignement du dossier pharmaceutique...). La mise en place d'un tel décret implique une responsabilité accrue des pharmaciens vis-à-vis de médicaments complexes, parfois toxiques et présentant un risque immunogène important. De plus, les pharmaciens risquent d'être confrontés aux réticences des patients qui, au-delà de l'aspect substitution comme pour les génériques, donneront plus de poids à l'avis de leur médecin qu'à celui du pharmacien compte-tenu de la gravité des pathologies traitées.

CHAPITRE II
GENERALITES SUR LA
CULTURE MICROBIENNE :
APPLICATION AUX LEVURES

1. Introduction

Le terme « microbe », signifiant littéralement « petite vie », a été adopté par l'Académie des Sciences en 1878 suite à la proposition de Charles-Emmanuel Sédillot [15]. Il s'agissait pour ce médecin français de désigner, à travers l'utilisation d'un seul mot, les nombreux agents non visibles à l'œil à nu, disséminés dans l'atmosphère, et responsable de maladies. Le médecin et biologiste français Emile Roux définissait un microbe comme un : « être infiniment petit qui, à tout moment de son existence, ne peut être vu qu'à l'aide d'un microscope ordinaire » [16]. Aujourd'hui, le terme de micro-organisme, du grec mikrós « petit » et organismós « organisme », est utilisé préférentiellement par la communauté scientifique.

Les micro-organismes sont largement répandus dans la classification taxonomique actuelle et regroupent aussi bien des organismes procaryotes (bactéries et cyanobactéries), que des organismes eucaryotes (champignons, algues et protozoaires).

Au sein du règne fongique, les micro-organismes sont retrouvés dans deux divisions principales: les Deuteromycota, regroupant des espèces appelées *fungi imperfecti* (*Cephalosporium*, *Curvularia*) ; et les Amastigomycota. Dans cette dernière division, les micro-organismes appartiennent à plusieurs subdivisions : les zygomycètes, qui sont des champignons inférieurs saprophytes à filaments non cloisonnés (*Rhizopus*, *Blakeslea*) ; les ascomycètes, champignons supérieurs possédant un mycélium cloisonné (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Claviceps*) ; et les basidiomycètes, champignons les plus perfectionnés. Les levures sont quant à elles réparties dans trois des classes précédemment citées : les basidiomycètes, les deutéromycètes et surtout les ascomycètes, avec l'ordre des endomycétales où se trouvent la majorité des levures (Tableau 10).

Tableau 10. Classification simplifiée des levures⁶.

Division	Classe	Ordre	Famille	Genre
Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	<i>Saccharomyces</i> <i>Kluyveromyces</i>
			Pichiaceae	<i>Pichia</i> <i>Brettanomyces</i>
			Lipomycetaceae	<i>Lipomyces</i>
			Saccharomycodaceae	<i>Hanseniaspora</i>
			Debaryomycetaceae ou Saccharomycetaceae (selon les espèces)	<i>Candida</i>
			Eremotheciaceae	<i>Coccidiascus</i>
	Schizosaccharomycetes	Schizomycetales	Schizomycetaceae	<i>Schizosaccharomyces</i>
Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	-	<i>Cryptococcus</i>
			Sirobasidiaceae	<i>Sirobasidium</i>
			Tremellaceae	<i>Tremella</i>
			Trichosporonaceae	<i>Trichosporon</i>
	Microbotryomycetes	Filobasidiales	Filobasidiaceae	<i>Filobasidium</i>
		Leucosporidiales	Leucosporidiaceae	<i>Leucosporidium</i>
		Kriegeriales	Kriegeriaceae	<i>Rhodotorula</i>
		Sporidiobolales	-	<i>Sporobolomyces</i>

2. Rappels de biologie cellulaire

2.1. Comparaison procaryotes et eucaryotes

Bien que les levures soient des organismes unicellulaires de taille microscopique, rappelant les caractéristiques des organismes procaryotes tels que les bactéries, la présence d'un noyau clairement délimité dans leur structure les classe parmi les eucaryotes (Tableau 11). Cette appartenance constitue un intérêt génétique majeur dans le cadre de la production de protéines recombinantes car les levures, contrairement aux bactéries, possèdent la machinerie cellulaire nécessaire à la réalisation de modifications post-traductionnelles semblables à celles observées au sein des cellules mammifères. De plus, les levures constituent la forme cellulaire la plus simple parmi les eucaryotes : les réactions mises en œuvre sont moins complexes et les temps de générations sont plus courts, assurant une meilleure productivité avec ce système. Enfin, il est à noter que les levures se différencient des cellules animales par la présence d'une paroi et d'une vacuole.

⁶ Source : NCBI taxonomy browser, disponible à l'URL suivant : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi> [Consulté le 15 septembre 2014]

Tableau 11. Principales caractéristiques des cellules procaryotes et eucaryotes.

	Procaryotes	Eucaryotes	
	Bactéries	Levures	Cellules animales
Taille	1 à 10 µm	4 à 10µm	10 à 100µm
Noyau	Nucléoïde, pas de véritable noyau	Noyau vrai, avec membrane nucléaire	
ADN	Circulaire, un seul chromosome	Linéaire, découpé en plusieurs chromosomes	
ARN /synthèse protéines	Transcription et traduction couplées, localisées dans le cytoplasme	Synthèse d'ARN dans le noyau, maturation et traduction en protéines dans le cytoplasme	
Structure cytoplasmique	Pas d'organites	Nombreux compartiments, présence d'un cytosquelette	
Mitochondries	Aucune	Une à plusieurs dizaines	
Paroi	Variable	Présente	Aucune
Vacuole	Aucune	Variable	Aucune
Métabolisme	Anaérobie ou aérobie	Anaérobie ou aérobie	Aérobie
Organisation	Cellules habituellement isolées	Cellules isolées Parfois formes multicellulaires	Evoluée, cellules spécialisées
Division de la cellule	Scissiparité	Bourgeonnement	Mitose Méiose
Temps de génération (ordre de grandeur)	Minutes	Heure(s)	> 10 heures

2.2. Biologie cellulaire des levures

2.2.1. Structure et organisation

Au microscope optique (Figure 10), les levures apparaissent comme des cellules individualisées, de forme généralement ovoïde, avec un diamètre compris entre 4 et 10 µm.

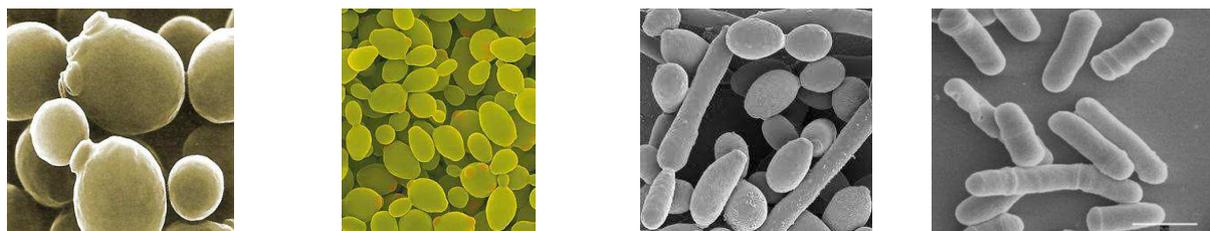


Figure 10. Morphologie de différentes levures visualisées au microscope.

Dans certains cas, des formes multicellulaires peuvent être observées. Selon les conditions, les cellules peuvent précipiter suite à une forte adhésion intercellulaire entre les parois. Ce phénomène, appelé floculation, est très utilisé dans l'industrie de la brasserie pour favoriser la sédimentation rapide dans les moûts. Une autre forme multicellulaire concerne les levures ascomycètes, qui peuvent former des thalles cloisonnés selon une croissance pseudo-hyphale.

Les différents composants cellulaires des levures peuvent être observés au microscope électronique (Figure 11). L'élément le plus extérieur est la paroi cellulaire, dont l'épaisseur est de 70 ± 10 nm. Elle représente 15 à 18% des matières sèches cellulaires et est composée presque exclusivement de polysaccharides de glucanes et de mannanes. Son rôle est de protéger et maintenir la forme de la cellule en réponse aux variations de pressions osmotiques. La deuxième barrière de la cellule est la membrane cytoplasmique, composée principalement de lipides (phospholipides et stérols), de protéines et de lipoprotéines. A noter que les stérols synthétisés par les levures sont des ergostérols, molécule remplissant les mêmes fonctions que le cholestérol des cellules animales. La membrane assure trois fonctions principales qui sont : former une barrière extensible, contrôler l'entrée et la sortie des solutés et servir de point d'attache aux constituants de la paroi. Entre ces deux barrières, se situe l'espace périplasmique, qui contient des mannoprotéines avec une activité hydrolase essentielle pour le clivage des molécules complexes en constituants simples et assimilables.

Le cytoplasme contient de nombreux organites dont les principaux sont : (1) le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, intervenant dans les phénomènes de maturation et de sécrétion des protéines ; (2) le noyau, qui contient les chromosomes au nombre de 16 pour la forme haploïde ; (3) les vacuoles, lieux de stockage et équivalent des lysosomes des cellules animales ; (4) les ribosomes, site de synthèse des protéines ; (5) les mitochondries, siège de la respiration ; (6) les peroxysomes, site majeur des métabolismes impliquant l'oxygène moléculaire (détoxification, assimilation des acides gras, métabolisation du méthanol ou des alcanes).

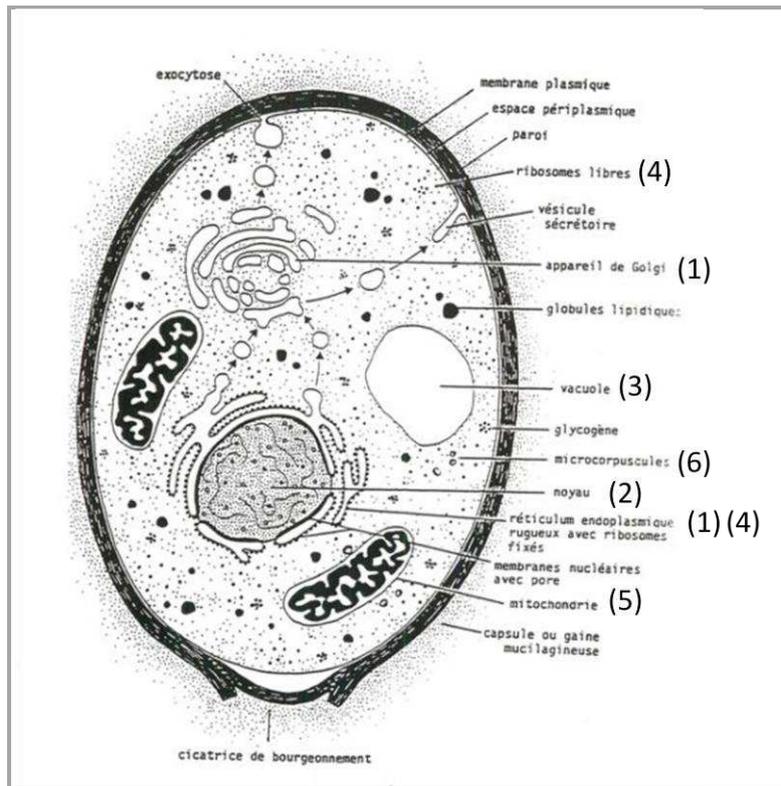


Figure 11. Représentation schématique de la structure d'une levure⁷.

2.2.2. Cycle cellulaire/ Mode de multiplication

Dans des conditions favorables, la multiplication des levures est dite végétative : une cellule mère bourgeonne pour donner une cellule fille identique. C'est la reproduction asexuée. Dans des conditions de carence en nutriments (azote, sucres), les levures se multiplient selon une reproduction sexuée. Les différents modes de reproduction sexuée observés chez les levures ont permis leur rattachement à trois classes du règne fongique : les ascomycètes (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*), caractérisés par la présence d'asques à l'intérieur desquels se forment les ascospores suite à la méiose ; les basidiomycètes (*Sporobolomyces*), formant des basidiospores localisés à l'extérieur des basides ; et les deutéromycètes, regroupant l'ensemble des levures dont le mode de reproduction sexuée n'est pas connu. D'un point de vue industriel, les basidiomycètes présentent peu d'intérêt : ce sont les ascomycètes qui sont majoritairement employés, et, parmi cette classe, seulement une dizaine d'espèces sont exploitées, dont la plus utilisée est *Saccharomyces cerevisiae*.

⁷ Disponible à l'URL : <http://www.abmauri.fr/la-cellule-de-levure-une-veritable-usine-biologique.html> (d'après : *Biolotechnologie des levures*, « Ultrastructure des levures », de R. Bonaly)

Le cycle le plus étudié est celui de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 12). Dans des conditions défavorables, une cellule à $2n$ chromosomes déclenche la méiose et la sporulation pour donner lieu à un asque composé, en théorie, de quatre spores à n chromosomes. Deux spores sont de signes a , les deux autres du signe α . Après germination, les facteurs a et α , produits par leurs cellules respectives, jouent le rôle de phéromones : seules deux cellules de signes opposés peuvent se conjuguer pour former, après fécondation, un zygote à $2n$ chromosomes. Ce mode de reproduction est qualifié de sexué car il y a caryogamie et méiose dans le cycle, bien qu'aucun gamétocyste, formes sexuelles différenciées, ne soit synthétisé.

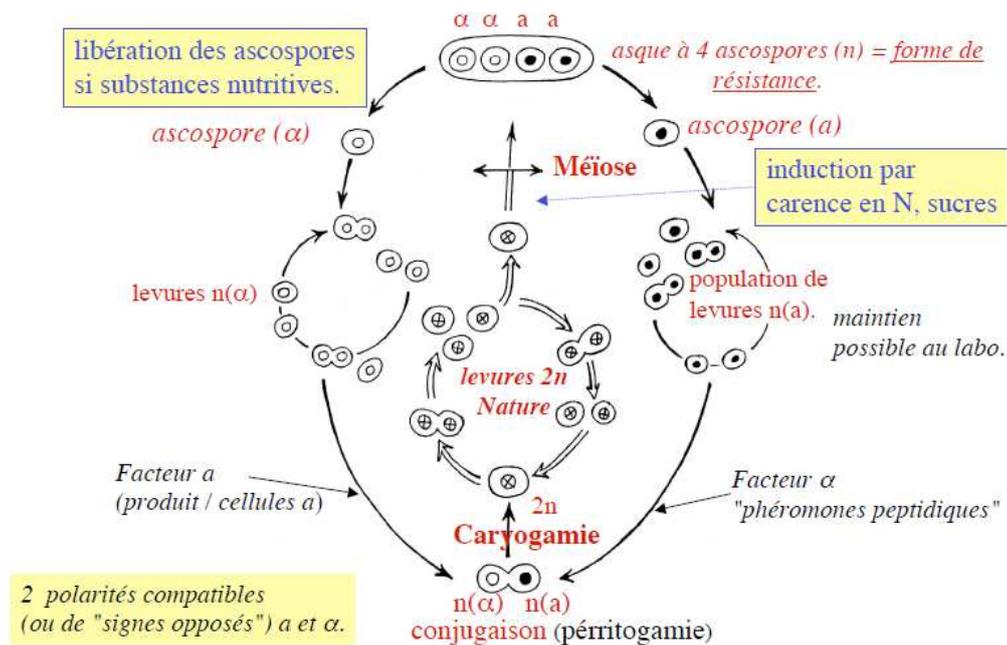


Figure 12. Cycle cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*⁸.

2.2.3. Métabolisme

Le terme métabolisme regroupe l'ensemble des réactions chimiques se déroulant dans les cellules. Il associe les réactions cataboliques et anaboliques, correspondant respectivement à la fragmentation de molécules complexes en composés plus simples avec libération d'énergie et à la synthèse de molécules complexes à partir de précurseurs.

Contrairement aux micro-organismes autotrophes qui ne peuvent se développer qu'à partir d'éléments minéraux, les levures sont des organismes hétérotrophes et nécessitent un apport en molécules organiques pour alimenter leurs métabolismes carboné, azoté et soufré. La majorité des levures sont saprophytes, c'est-à-dire qu'elles utilisent pour leur développement la matière

⁸ Extrait du cours « Les ascomycètes », de l'Unité d'Enseignement Mycologie, Pharmacie 4^{ème} année, par le Pr. Méryllon, Université Bordeaux Segalen, octobre 2010

organique inerte provenant notamment de la décomposition d'êtres vivants. D'autres sont parasites et se nourrissent alors d'aliments carbonés pris au détriment d'un organisme hôte.

Parmi les levures, certaines sont aérobies obligatoires (*Pichia sp.*, *Yarrowia sp.*, *Candida sp.*), d'autres sont aérobies facultatives (*Saccharomyces sp.*, *Kluyveromyces sp.*). La levure aérobique facultative la plus étudiée est *Saccharomyces cerevisiae*. Selon les conditions environnementales, elle tire son énergie de la respiration ou de la fermentation alcoolique (Tableau 12, Figure 13).

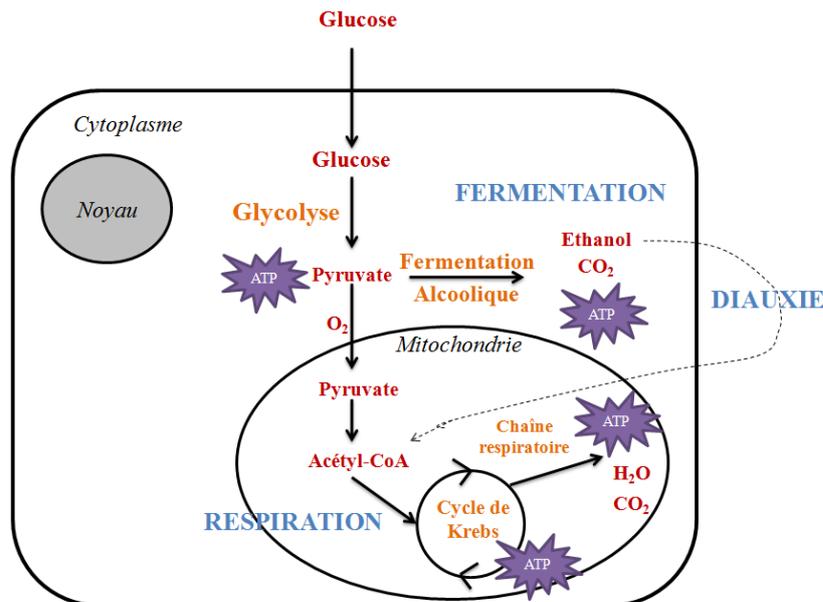


Figure 13. Représentation schématique des voies métaboliques de *Saccharomyces cerevisiae*.

En anaérobiose, c'est-à-dire en absence d'oxygène, le sucre est fermenté et l'oxydation du glucose est incomplète, conduisant à une faible libération d'énergie. Au contraire, en aérobiose, l'oxydation du glucose est complète et le rendement énergétique est élevé grâce à l'intégration du substrat carboné dans le cycle de Krebs au niveau des mitochondries. Il existe deux modes de passage de la fermentation à la respiration : un mode immédiat, impliquant des enzymes régulées par la concentration en pyruvate (pyruvate décarboxylase et pyruvate déshydrogénase) ; et un mode à plus long terme où la génétique intervient. En raison de son meilleur rendement énergétique, la voie respiratoire est utilisée préférentiellement par la levure. Toutefois, la respiration n'est possible qu'en présence d'oxygène et à condition que la concentration en glucose soit faible. Si la concentration en sucre augmente, la respiration est inhibée au profit de la fermentation, malgré la disponibilité en oxygène. Ce basculement de l'état respiratoire à l'état fermentaire est appelé effet Crabtree ou effet glucose. Il s'agit d'une répression catabolique par le glucose qui réprime l'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans son

propre métabolisme ou dans celui des autres sources de carbone. Une autre particularité du métabolisme de *Saccharomyces cerevisiae* est sa capacité à s'adapter à son environnement nutritif par des phénomènes de régulation métabolique appelés diauxie. Dans un premier temps, la levure est en mode fermentaire : elle dégrade le glucose et stocke l'énergie sous forme externalisée, via l'éthanol. Dans un second temps, *Saccharomyces* réoriente son métabolisme vers la voie respiratoire et utilise alors l'éthanol précédemment formé comme substrat.

Tableau 12. Comparaison des caractéristiques de croissance selon les conditions.

	Fermentation	Respiration
Conditions	Absence oxygène Forte concentration en glucose	Présence oxygène Faible concentration en glucose
Bilan énergétique	1 glucose → 2 ATP	1 glucose → 34 ATP
Bilan global	glucose → éthanol + CO ₂	glucose → H ₂ O + CO ₂
Rendement énergétique	Faible	Fort
Vitesse	Elevée	Faible
Oxydation du glucose	Incomplète	Totale
Flux du glucose	10% pour la biomasse	50% pour la biomasse
Sources de carbones utilisées	Sucres	Sucres, Acides organiques, Alcools

La levure *Pichia pastoris*, aérobie stricte, n'est pas capable de vivre en conditions anaérobies : la respiration est obligatoire. Mais cette levure présente la particularité d'être méthylotrophe, c'est-à-dire qu'elle est capable d'oxyder le méthanol par respiration, grâce à l'action d'enzymes spécifiques, les alcools oxydases (cf. Chapitre IV, §3.1.2. *Pichia pastoris* : une levure méthylotrophe).

3. Besoins nutritifs et milieux de culture

Pour croître et se multiplier, les levures puisent leur énergie sous forme d'énergie chimique, par oxydation de substrats organiques. Les besoins nutritifs, qualitatifs et quantitatifs, sont propres à chaque espèce, mais certains éléments sont primordiaux pour le développement des levures et la synthèse des constituants cellulaires. Les éléments carbone, oxygène, hydrogène et azote (C, O, H et N) constituent 95% de la masse sèche de la cellule et doivent donc être présents en grandes quantités dans le milieu (de l'ordre du g/L). Souvent, une molécule organique apporte l'ensemble de ces éléments. D'autres macroéléments sont importants : le soufre (S), constitutif des métabolites secondaires ; le phosphore (P), indispensable pour la biosynthèse de nombreuses molécules (ADN, ARN, ATP, ADP, AMP, lipides...) ; et dans une moindre mesure le calcium (Ca), le potassium (K), le magnésium (Mg) et le fer (Fe). Au-delà de ces macroéléments, différents sels minéraux sont nécessaires pour apporter des éléments

cofacteurs des réactions enzymatiques ou entrant dans la structure de certaines molécules (Zn, site actif de nombreuses enzymes ; Mn, catalyse le transfert de groupements phosphates ; Co, composant de la vitamine B12 ; Mo, fixant l'azote ; Cu, élément structurel). Ces composés sont qualifiés d'oligoéléments ou micronutriments car ils ne sont présents qu'en très faible quantité (de l'ordre du $\mu\text{g/L}$). Enfin, les levures nécessitent l'apport de facteurs de croissance, tels que des vitamines (biotine, vitamines B1 et B6), des acides aminés, et des additifs (précurseurs ou régulateurs de la biosynthèse) peuvent être suppléés afin de stimuler la synthèse des métabolites.

Le milieu de culture doit répondre aux exigences nutritives nécessaires à la croissance et à la multiplication des levures. Sa composition est étudiée et optimisée au laboratoire pour chaque souche productrice et les éléments qu'il contient doivent être assimilables par le micro-organisme. La complexité du développement d'un milieu de culture réside dans le fait qu'un milieu favorable à la croissance n'est pas nécessairement celui qui donnera les meilleurs rendements en produit d'intérêt. Le choix des nutriments entrant dans la composition du milieu de culture dépend de la souche utilisée et tient compte également du facteur économique : le coût des éléments nutritifs peut représenter jusqu'à 50% du prix de revient de la production. Il convient donc de réaliser des compromis pour obtenir des nutriments avec le coût le plus faible, disponibles et dont l'utilisation est aisée.

Différents types de milieux peuvent être utilisés. Les milieux complexes sont des milieux riches contenant plusieurs sources de carbone et des mélanges d'acides aminés, de vitamines et de sels. L'attrait économique de ces milieux, souvent issus de sous produits de l'industrie agro-alimentaire, telles que les mélasses, est contrebalancé par une productivité variable associée à une composition indéterminée. De plus, la qualité de la matière première est variable, exigeant des vérifications de la productivité, voire la mise au point d'un nouveau milieu. La stabilité au stockage, le coût de stérilisation et les caractéristiques rhéologiques sont d'autres paramètres à prendre en compte. Enfin, la concentration en oligoéléments de ces milieux peut ne pas être optimale pour la productivité et un mélange de micro-éléments devra alors être ajouté.

A l'opposé de ces milieux, des milieux synthétiques, de composition connue et bien définie, ont été développés. Ces milieux ne contiennent qu'une seule source de carbone, en concentration connue, qui constitue le substrat limitant. Ces milieux assurent la maîtrise du procédé mais nécessitent en amont une étude des besoins nutritionnels du micro-organisme. Le coût d'un milieu synthétique est élevé, et augmente avec le nombre de composés utilisés, notamment si des facteurs de croissance sont additionnés.

4. Caractérisation de la croissance

Caractériser la croissance revient à déterminer les paramètres cinétiques de la biomasse, du (ou des) substrat(s) et du (ou des) produits(s). Il s'agit également de définir les rendements de conversion du substrat en biomasse ($Y_{X/S}$) et en produit ($Y_{P/S}$).

La cinétique de croissance microbienne correspond au suivi de l'évolution du nombre de cellules au cours du temps après ensemencement. La croissance des micro-organismes peut être modélisée au moyen d'une équation simple qui estime la biomasse (X_n) à un instant donné (t) en fonction de la biomasse initiale (X_0) et du taux de croissance (μ) (Équation 1).

$$X_n = X_0 \cdot e^{\mu t}$$

Équation 1. Modèle de croissance.

L'établissement d'une courbe de croissance permet de rendre compte de l'évolution de la biomasse (Figure 14). La conversion de cette courbe en échelle logarithmique permet de déterminer les différentes phases croissances : (1) la phase de latence, au cours de laquelle le micro-organisme s'adapte à son environnement ; (2) la phase exponentielle, où la vitesse de division augmente jusqu'à devenir maximale : (3) la phase stationnaire, pendant laquelle la croissance s'arrête par épuisement de substrats ou accumulation de déchets ou modifications des paramètres de culture, il y a alors un équilibre entre les cellules vivantes et les mortes ; (4) la phase de mortalité, s'accompagnant de phénomènes de lyse cellulaire.

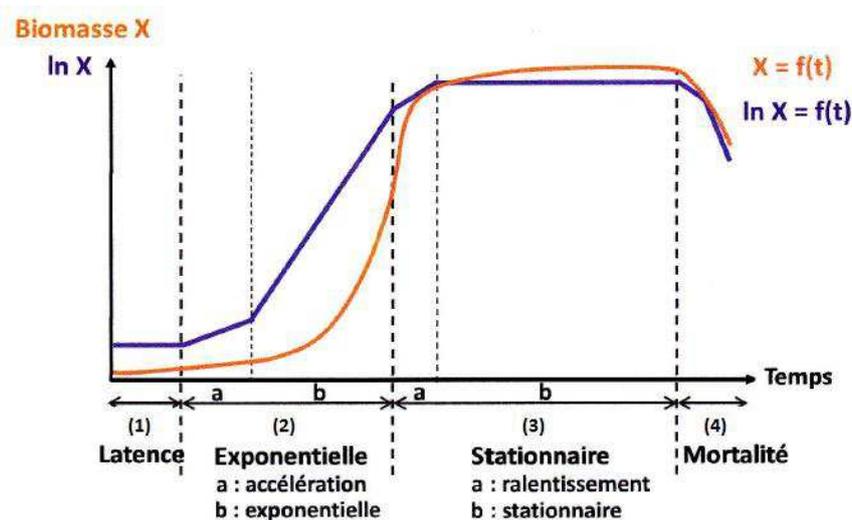


Figure 14. Courbe et différentes phases de croissance⁹. Courbe de croissance de la biomasse en fonction du temps (orange) et courbe en échelle logarithmique (violet).

⁹ Extrait du cours « Génie Fermentaire », de l'Unité d'Enseignement « Bioproduction, Purification et Caractérisation », S8, dispensé à l'ENSTBB, février 2013

Il est à noter que la détermination des phases n'est réalisable que dans des conditions de culture définies et dans un réacteur fermé après ensemencement (« batch »). A partir de la courbe en échelle logarithmique, le taux de croissance peut être calculé, qu'il s'agisse du taux de croissance instantané sur un intervalle de temps défini, ou du taux de croissance maximal, calculé pendant la phase exponentielle. A partir de ce dernier taux, le temps de génération (t_g), c'est-à-dire le temps de doublement de la population microbienne, peut être déterminé.

Le suivi de l'évolution du substrat et du produit peut également être visualisé à l'aide de courbes de consommation et de production respectivement. A partir de ces courbes, les vitesses volumiques de consommation et de production sont calculées et les vitesses spécifiques peuvent être déduites en rapportant les vitesses volumiques par unité de biomasse présente.

Exprimés en g/g, mol/mol ou en pourcentage, les rendements donnent une information concernant la productivité et l'efficacité de la souche. Ils permettent d'établir la part de substrat convertie en biomasse (rendement de croissance) et celle utilisée pour la production de métabolites (rendement de production).

5. Facteurs influençant la croissance

Les paramètres influençant la croissance agissent sur le taux de croissance et/ou sur le métabolisme microbien. Les procédés de fermentation mettent en œuvre des systèmes multiphasiques, associant une phase liquide (milieu de culture), une phase solide (cellules), et une phase gazeuse (aération). Par conséquent, les phénomènes physiques de solubilisation, diffusion et transfert influencent la croissance en rendant plus ou moins disponibles et accessibles les différents composés.

L'oxygène est indispensable à la respiration cellulaire car il s'agit de l'accepteur final de la chaîne de transport des électrons. Il peut toutefois être à l'origine de la production de radicaux libres, comme le peroxyde d'hydrogène, qui sont toxiques pour la cellule. Les micro-organismes sont plus ou moins sensibles aux variations de l'oxygène selon la présence, ou l'absence, d'enzymes de protection (peroxydase, catalase et superoxyde dismutase) dans la cellule.

La température peut avoir un effet sur la durée des phases de croissance et elle joue un rôle essentiel pour l'activation des enzymes. Il existe une température optimale pour l'activité enzymatique au-dessus de laquelle les enzymes sont inactivées, entraînant une chute du métabolisme qui peut être létale pour les cellules. Lorsque la température est inférieure à cette température critique, le métabolisme est ralenti mais n'entraîne pas la mort des cellules.

Par conséquent, même si des systèmes permettent de réguler la température dans un procédé, il est préférable de réaliser les cultures à des températures inférieures à la température critique afin d'éviter de désactiver la croissance, d'autant plus que les réactions cellulaires sont exothermiques.

Un autre paramètre important influençant la croissance est le pH. Chaque espèce possède une gamme de pH définie, sur laquelle sa croissance est optimum. D'une manière générale, le pH théorique des levures se situe entre 3 et 6,5 unités pH. La zone de pH optimal pour la croissance n'est pas nécessairement identique à celle utilisée pour la production : le pH doit être ajusté au cours du procédé, selon le but recherché, augmentation de la biomasse ou production de métabolites.

L'ensemble de ces facteurs liés à l'environnement correspondent aux paramètres de culture : ils sont définis au départ du procédé et leur évolution est contrôlée par les systèmes de régulation des bioréacteurs. Des facteurs liés aux variables d'état peuvent également influencer la croissance et dans ce cas, ce n'est plus un contrôle sur les paramètres qui est exercé, mais une modélisation. De nombreux éléments du milieu de culture sont susceptibles d'influencer la croissance, notamment les éléments carbone, azote et phosphate. La croissance peut être limitée par le substrat d'une manière quantitative (concentration) ou qualitative (affinité du micro-organisme pour le substrat). Différents modèles rendent compte de la limitation du substrat dont le plus connu est le modèle de Monod, qui fait intervenir la constante de saturation du substrat, c'est-à-dire la concentration de substrat pour laquelle le taux de croissance est égal à la moitié du taux de croissance maximal. Si la concentration en substrat devient trop élevée, par exemple suite à une accumulation du composé dans le milieu, le substrat peut avoir un effet inhibiteur ou toxique. La loi de Haldane, dérivée du modèle de Monod, rend compte de cette inhibition. La loi de Pirt permet d'établir les cinétiques d'utilisation du substrat vers la production de biomasse, la formation de produits ou les réactions de maintenance de la cellule. Enfin, les produits formés au cours de la culture peuvent également inhiber la croissance, phénomène descriptible par la loi de Kendall. Les cinétiques de formation des produits sont définies par le modèle de Luedeking-Piret, permettant de déterminer si la production est associée ou non à la croissance.

6. Mesures de la biomasse

La mesure de la biomasse est le paramètre le plus important dans le suivi de la croissance d'une population cellulaire et du déroulement de la fermentation. En effet, le suivi de la biomasse permet d'avoir une idée sur l'état de développement de la culture, sur la masse de cellules présentes et par conséquent sur la quantité de producteurs potentiels. Les mesures de la biomasse sont difficiles, du fait de la présence dans le milieu de composés insolubles.

Les mesures peuvent être réalisées hors-ligne, sur échantillon après prélèvement, ou en ligne, c'est-à-dire *in situ* dans le bioréacteur. Différentes techniques existent pour compter les cellules totales ou estimer les cellules vivantes. Il est judicieux d'effectuer plusieurs types de mesures afin de compiler des informations détaillées sur l'état de la population cellulaire.

6.1. Méthodes pondérales et gravimétriques

6.1.1. Masse fraîche et masse sèche

A partir du milieu contenant les cellules, un échantillon est prélevé puis centrifugé ou filtré. La pesée du culot ou du filtre permet de déterminer la biomasse fraîche. A l'issue d'une étape de dessiccation entre 80 et 100°C, la biomasse sèche est mesurée. Cette technique, simple à mettre en œuvre, nécessite la maîtrise de l'étape de séchage. Si la dessiccation est trop faible, de l'eau peut rester dans les cellules. Au contraire, si elle est trop forte, les matières organiques peuvent se volatiliser, entraînant une incertitude sur la mesure. De plus, les particules insolubles du milieu peuvent entraîner une surestimation de la quantité de cellules. Enfin, lorsque la concentration cellulaire est faible, les mesures sont peu précises : il faut alors augmenter le volume de prélèvement, ce qui peut être limitant pour des cultures à l'échelle du laboratoire.

6.1.2. Volume cellulaire

Le volume cellulaire correspond au volume occupé par le culot cellulaire après centrifugation. Cette mesure est très utilisée pour le contrôle des fermentations utilisant des micro-organismes filamenteux. Le prélèvement de milieu est inséré dans un tube gradué puis une étape de centrifugation permet d'éliminer le surnageant. Le culot obtenu est fonction de la vitesse et du temps de centrifugation. La difficulté de cette technique réside dans le fait qu'une calibration par micro-organisme est nécessaire et que les changements morphologiques au cours du procédé de culture peuvent influencer le volume occupé par le culot.

6.2. Méthodes optiques

6.2.1. Mesures d'une intensité lumineuse

La mesure d'une intensité lumineuse avant et après passage au travers d'une suspension cellulaire est une méthode simple pour estimer le nombre de cellules totales (Figure 15). La limite de ces techniques réside dans le fait qu'à fortes concentrations en biomasse, le signal n'est plus linéaire.

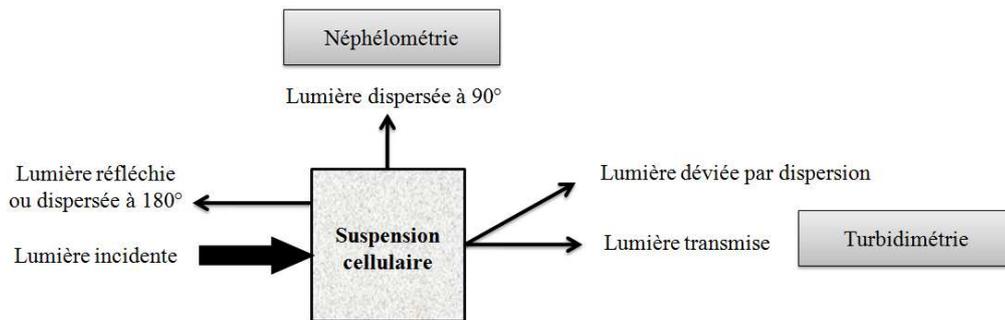


Figure 15. Principe de mesure de la turbidité par différentes méthodes.

6.2.1.1. Turbidimétrie

La turbidimétrie, ou densité optique, consiste à mesurer la différence entre la lumière incidente et la lumière transmise. Le signal obtenu, à une longueur d'onde de l'ordre de 600 nm, résulte de la diffusion et de l'absorption de la lumière. L'information obtenue par cette méthode est quantitative et non qualitative, aucune distinction n'étant faite entre les cellules vivantes et les cellules mortes. De plus, la couleur du milieu de culture, la présence de particules insolubles ou d'agrégats cellulaires compliquent la mesure et l'interprétation des résultats.

6.2.1.2. Néphélométrie

La néphélométrie est basée sur le rapport entre la lumière transmise et la lumière diffusée à 90°. La longueur d'onde utilisée dans cette technique, proche de l'infrarouge (850 nm), permet de s'affranchir de l'influence de la couleur du milieu de culture. Les mesures sont réalisées *in situ* grâce à des sondes à fibres optiques ou des couples diode-photodiode. Ces sondes doivent être calibrées pour chaque micro-organisme et ne sont pas utilisables pour les organismes filamenteux. De plus, cette méthode est influencée par la présence de particules insolubles.

6.2.2. Comptage cellulaire

Les cellules présentes dans un échantillon peuvent être comptées à l'aide d'un microscope optique, en utilisant un hématimètre. Un hématimètre est une lame comprenant une cavité ou une chambre de profondeur connue. Il en existe différents types dont les principaux sont la cellule de

Malassez et la cellule de Thomas. Cette technique de comptage donne des informations sur la taille et la morphologie des cellules. Elle permet la numération des cellules totales ou des cellules vivantes grâce au traitement préalable de l'échantillon avec un colorant spécifique tel que le bleu de méthylène ou les sels de tétrazolium. L'inconvénient majeur de cette méthode est le manque de précision, dû aux dilutions et aux prélèvements non homogènes effectués.

D'autres techniques, plus sophistiquées, permettent de compter, trier et dénombrer automatiquement les cellules. Le compteur Coulter est un appareillage simple dans lequel un champ électrique est créé entre deux électrodes dont l'espacement est calibré en fonction du micro-organisme à étudier. Lorsqu'une cellule passe l'orifice, la résistance électrique augmente, ce qui génère un signal proportionnel à la taille des cellules. La principale limite de cette technique est l'absence de distinction entre les cellules vivantes et les cellules mortes. Pour obtenir des informations sur la viabilité, un cytomètre de flux peut être utilisé. Cet appareil analyse, de façon individuelle, plusieurs caractéristiques des cellules comme par exemple la taille, la forme, le pH, les caractéristiques membranaires, mais aussi la viabilité par traitement des cellules avec des réactifs fluorescents tels que le bromure d'éthidium pour marquer les acides nucléiques, ou l'isothiocyanate de fluorescéine pour marquer les protéines. Enfin, par l'application d'un champ électrique, les cellules peuvent être triées à l'aide du cytomètre.

6.3. Méthodes physiques

La dégradation des substrats en vue de la synthèse de biomasse est une réaction exothermique : il existe un couplage entre la croissance et le stockage d'énergie sous forme d'ATP. Un calorimètre à flux de chaleur permet de déterminer, on-line, la relation entre la cinétique de croissance et le flux de chaleur dégagée. Cette technologie, coûteuse, ne trouve un intérêt qu'au niveau des laboratoires académiques.

Lorsque le substrat utilisé est un polymère de masse moléculaire élevée ou lorsque le produit est un composé à viscosité élevée, un viscosimètre peut être utilisé pour suivre les changements rhéologiques du milieu au cours de la fermentation. Cette technique trouve également un intérêt pour les cultures à hautes densités cellulaires.

6.4. Méthodes électrochimiques

Dans les méthodes électrochimiques, un champ électrique est appliqué et différentes mesures sont réalisées telles que la conductance, l'impédance et la capacitance. Cette technique est utilisée on-line pour les cultures de cellules en suspension ou immobilisées, et dans le cas de phénomènes d'adhésion cellulaire. La principale limite réside dans la quantité importante de cellules nécessaires pour effectuer la mesure.

6.5. Méthodes biologiques

L'avantage des méthodes biologiques est leur aptitude à estimer la biomasse viable. La méthode principale est le dénombrement sur milieu solide, de type gélose agarose. A partir d'un prélèvement de milieu, l'échantillon est dilué en série puis déposé sur le milieu nutritif. Après incubation, une colonie de cellules se développe à partir de chaque clone viable initialement étalé. L'inconvénient majeur de cette technique est le temps de préparation des échantillons et le temps d'attente avant le dénombrement des colonies.

Il existe également des méthodes biologiques indirectes de mesures de la biomasse, par le biais de la détermination des composants cellulaires ou des composants du milieu, substrat ou produit. L'analyse des composants cellulaires consiste à doser les protéines, les acides nucléiques et l'ATP. L'intérêt du dosage des protéines est que ces molécules représentent 40 à 65% de la masse cellulaire et que leur proportion est relativement constante et indépendante des conditions de culture. Toutefois, des interférences peuvent avoir lieu si les protéines sont excrétées dans le milieu et il est parfois nécessaire d'avoir recours à des surfactants pour solubiliser les protéines membranaires. Dans des cas particuliers de cultures, l'ATP est analysé par dosage enzymatique utilisant la luciférase ou par dosage chromatographique HPLC. Des techniques immunologiques ou fluorescentes peuvent être mises en œuvre pour déterminer la biomasse.

Les nutriments peuvent être analysés. Si les réactions bilans sont clairement établies, l'analyse de la source de carbone ou de la source d'azote permet de déduire la quantité de biomasse. La consommation d'oxygène est également un indicateur de la croissance cellulaire. Enfin, l'analyse des produits formés peut donner une indication notamment le dégagement de dioxyde de carbone.

7. Conservation et banques

Il est primordial de conserver les propriétés du micro-organisme sélectionné, afin d'assurer la reproductibilité tout au long du développement et de la production à l'échelle industrielle. L'objectif de la conservation est de préserver des souches viables, pures (exemptes de contaminations), disponibles et à l'identique sur toute la durée de conservation souhaitée. Il s'agit également de conserver la stabilité de la souche, c'est-à-dire de maintenir ses propriétés biochimiques, génétiques et physiologiques.

7.1. Différentes techniques de conservation

Différentes techniques peuvent être mises en œuvre pour la conservation des souches. Le choix de la méthode est fonction du micro-organisme utilisé, de la fréquence d'utilisation et de la durée de conservation, pouvant aller de quelques jours à plusieurs années.

Une technique simple et coûteuse consiste à repiquer les cellules de milieu solide en milieu solide. Les cellules se multipliant, des modifications de la souche peuvent apparaître. Cette méthode est réservée pour une conservation courte. Une autre technique peu onéreuse est la dessiccation, où la déshydratation des micro-organismes permet de maintenir les cellules dans un état de vie ralenti sur une durée de 5 ans. L'eau est retirée des cellules au moyen d'un agent dessiccant ou par la chaleur sèche. Pour augmenter la viabilité et la stabilité des souches, des méthodes plus complexes, et plus coûteuses, ont été mises au point. La technique la plus employée est la lyophilisation. Le principe repose sur la déshydratation par sublimation sous pression réduite d'une suspension congelée de micro-organismes : l'eau à l'intérieur des cellules passe de l'état solide à l'état gazeux. Enfin, la dernière technique utilisée est la congélation où l'abaissement de la température arrête les réactions chimiques cellulaires. La congélation peut se faire à basse température (-70°C) ou à très basse température (jusqu'à -196°C dans l'azote liquide), l'idéal étant de réaliser une diminution progressive de la température en 0 et -30°C puis très rapide pour atteindre -196°C. Au contraire, avant utilisation, la décongélation doit être rapide par un réchauffement de la suspension à +35°C. L'inconvénient majeur de cette méthode est la maîtrise de la vitesse de congélation car des cristaux, intra et extracellulaires peuvent se former et désorganiser les constituants de la cellule conduisant à la mort du micro-organisme.

7.2. Banques de micro-organismes

Des banques de micro-organismes ont été créées afin d'établir des collections de souche. Dans le monde, plusieurs centaines de banques sont recensées. En France, l'autorité compétente est la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes), qui gère les dépôts de matériels biologiques et les brevets. Il existe différents niveaux de banques selon l'utilisation (Figure 16). La banque source est créée à partir d'une lignée cellulaire et sert à constituer la banque maître (MCB, Master Cell Bank). Une partie de la MCB sert à constituer la banque de travail (WCB, Working Cell Bank). L'autre fraction de la banque maître est stockée et n'est jamais utilisée pour la réalisation de tests. La banque de travail est réservée aux usages fréquents de la souche.

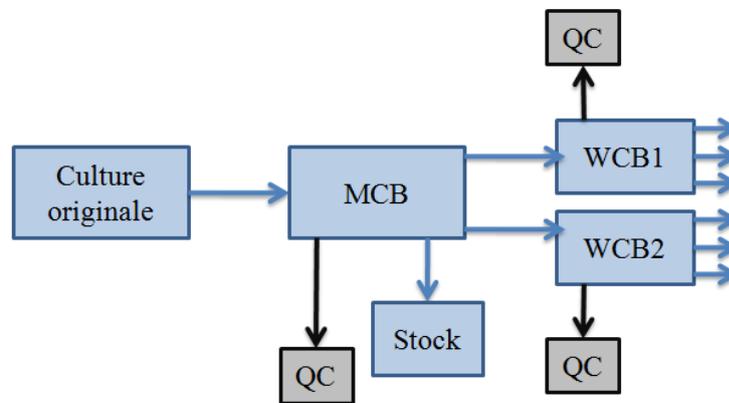


Figure 16. Différents niveaux pour les banques de micro-organismes. Master Cell Bank (MCB), Working Cell Bank (WCB), Contrôle Qualité (QC).

CHAPITRE III
UTILISATION INDUSTRIELLE
DES MICRO-ORGANISMES

1. Rappels de biologie moléculaire

L'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) constitue le support de l'information génétique de toutes les cellules vivantes. Cette molécule bicaténaire contient tous les renseignements nécessaires au développement et au fonctionnement d'un organisme. Sa structure s'organise sous la forme d'une double hélice composée d'une séquence de nucléotides, eux-mêmes constitués par l'association d'une base (adénine, thymine, cytosine ou guanine), d'un sucre (le désoxyribose) et d'un groupement phosphate.

La synthèse de protéines à partir de l'information génétique se déroule en deux étapes principales : la transcription, au cours de laquelle des molécules d'ARN (Acide RiboNucléique) sont synthétisées, et la traduction, où les acides aminés sont assemblés pour former les protéines (Figure 17).

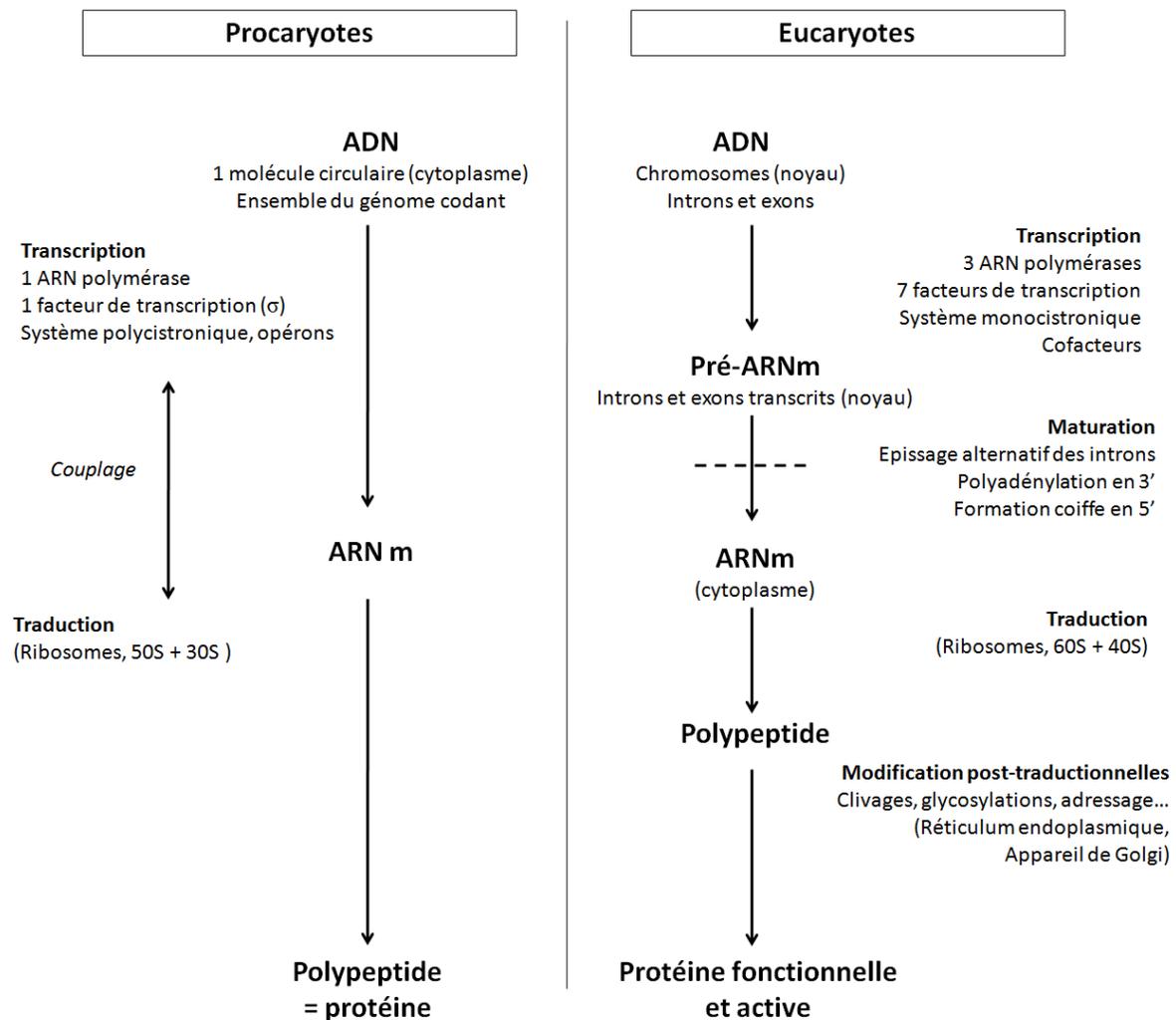


Figure 17. Etapes de la synthèse des protéines à partir de l'ADN : comparaison des systèmes procaryotes et eucaryotes.

Chez les procaryotes, les étapes sont couplées dans le cytoplasme : la traduction débute avant même la fin de la transcription. De plus, l'organisation des gènes sous forme de système polycistronique permet la synthèse d'un groupe de gènes, appelé opéron, à partir d'un seul promoteur. A noter que chez les procaryotes, l'ensemble du génome est codant.

Chez les eucaryotes, la transcription a pour but d'apporter l'information génétique depuis le noyau vers le cytoplasme, où se situe la machinerie pour la synthèse des protéines. L'ADN ne pouvant sortir du noyau, ce sont des copies des gènes qui quittent le noyau sous forme d'ARN messagers. Avant leur passage au travers des pores nucléaires, les molécules d'ARN subissent une maturation au cours de laquelle l'addition d'une coiffe en 5' et la polyadénylation en 3' permettent de stabiliser les molécules et de les protéger contre les enzymes de dégradation (nucléases, ARNases, exonucléases). De plus, les ARN sont épissés, c'est-à-dire que les introns sont retirés de la séquence pour ne laisser que les exons, séquences codantes chez les eucaryotes. Parfois, des exons sont éliminés à cette étape : c'est l'épissage alternatif qui permet à partir d'un même gène, d'engendrer l'expression de protéines différentes.

La correspondance entre le langage avec un alphabet à 4 lettres (A, U, G et C, correspondant aux 4 bases constitutives des ARN, Adénine, Uracile, Guanine et Cytosine respectivement), et le langage protéique à 20 composantes, est assurée par le code génétique (Figure 18). Ce code associe à chaque triplet de nucléotides, ou codon, porté par l'ARN messenger, l'acide aminé à incorporer dans la protéine en cours de synthèse. L'acide aminé est transporté par un ARN de transfert qui se lie au niveau du codon par un anticodon. Dans la cellule, ce sont les ribosomes qui effectuent l'interprétation du code génétique et assemblent les protéines.

		Deuxième lettre								
		U		C		A		G		
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U	
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C	
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop	A	
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp	G	
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U	
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C	
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A	
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G	
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U	
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C	
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A	
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G	
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U	
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C	
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A	
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G	

Figure 18. Code génétique.

Le code génétique est universel et commun à tous les êtres vivants. La dégénérescence du code se traduit par le fait qu'un acide aminé peut correspondre à plusieurs codons. Mais la fréquence d'usage de chacun de ces codons pour un acide aminé donné est variable : c'est le biais de codons. Cette notion est très importante lors de l'expression génique hétérologue : la proportion relative des ARN de transfert étant variable d'un organisme à l'autre, un codon peut devenir rare dans l'organisme hôte. La conséquence est le ralentissement de la traduction au niveau des ribosomes. En attente de l'ARN de transfert, l'ARN matrice peut alors se faire attaquer par des nucléases, entraînant la synthèse d'une protéine tronquée.

2. Expression de molécules recombinantes

La première source de protéines est la voie extractive à partir d'organismes les produisant naturellement, que ce soit des bactéries, des levures, des champignons ou des organismes plus évolués comme des animaux ou des plantes. L'introduction de la voie recombinante a permis une meilleure maîtrise des procédés, une production à plus grande échelle et à moindre coût, une source illimitée de protéines, l'amélioration de la sécurité du produit en s'affranchissant des risques associés à la présence d'agents infectieux et notamment de virus (prions, virus de l'hépatite C, virus du SIDA...). De plus, grâce à la voie recombinante, les propriétés des protéines ont été améliorées par mutagenèse dirigée ou aléatoire. Cette ingénierie des protéines a permis, par exemple, d'augmenter l'affinité des protéines pour leurs récepteurs ou encore de construire des protéines de fusion, facilitant les étapes de purifications ultérieures.

L'expression d'une molécule recombinante, ou expression hétérologue, consiste à introduire le gène codant pour la protéine d'intérêt dans une cellule hôte ne la synthétisant pas à l'état naturel. La synthèse de molécules recombinantes fait appel aux outils du génie génétique pour construire les systèmes de production. Elle fait intervenir trois acteurs : le gène d'intérêt, un vecteur d'expression et un organisme hôte. Le choix de la cellule hôte dépend des caractéristiques de la molécule à produire mais aussi des rendements, des coûts, de la qualité et des objectifs fixés (cf. Chapitre I, CHAPITRE I2.3. Systèmes de production). Le développement de vecteurs navettes, c'est-à-dire des vecteurs capables de se répliquer dans deux cellules hôtes différentes grâce à la présence de plusieurs origines de réplication (procaryote et eucaryote), a rendu possible l'utilisation de plusieurs organismes hôtes pour l'expression d'une molécule recombinante: un système sert à produire les plasmides recombinants, l'autre étant le système d'expression et de production de la molécule d'intérêt.

3. Etapes d'un procédé : de la fermentation au produit fini

3.1. Discussion autour du terme de fermentation

Selon le contexte, le terme « fermentation » possède plusieurs significations. Dans l'industrie agro-alimentaire, la fermentation désigne la production de boissons alcoolisées ou la détérioration des aliments. Au sens biochimique, il s'agit d'une réaction d'oxydo-réduction dont l'accepteur final est un composé organique, contrairement au métabolisme oxydatif où l'accepteur final est une molécule minérale, l'oxygène. D'un point de vue physiologique, la fermentation fait référence à un processus survenant en absence d'oxygène, et aboutissant à la production d'énergie à partir d'une substance organique, généralement issue de la dégradation du substrat. La nature des produits de la réaction permet de définir différents types de fermentations : fermentation lactique, alcoolique... En microbiologie, le terme de fermentation désigne les processus cataboliques au cours desquels les substrats sont incomplètement dégradés, même s'il s'agit d'un métabolisme oxydatif. L'utilisation du terme de fermentation oxydative est alors privilégiée dans ce dernier cas pour rendre compte de l'aspect respiratoire. Dans le domaine des biotechnologies, le terme fermentation désigne la culture en masse de micro-organismes aérobies ou anaérobies. C'est une étape qui s'inscrit dans un ensemble d'opérations unitaires industrielles, et qui aboutit à l'élimination d'un substrat en parallèle de la production de biomasse, de métabolites ou de produits de bioconversion. L'objectif du présent chapitre est de décrire les étapes du procédé de fermentation pour aboutir au produit d'intérêt final (Figure 19).

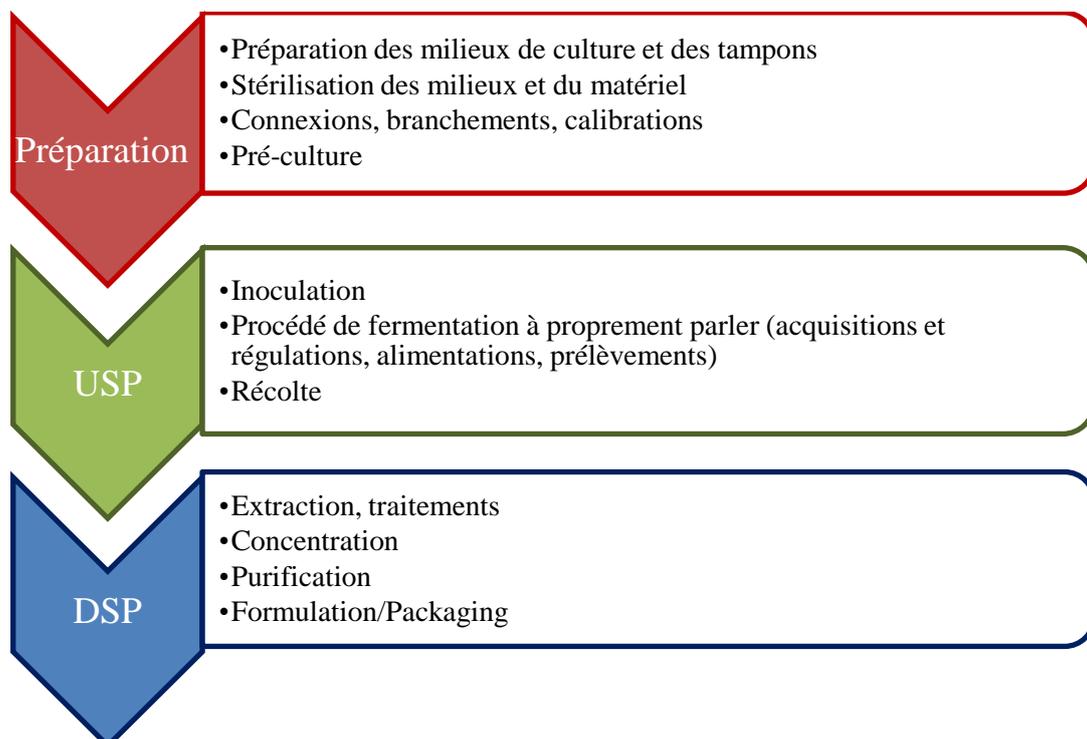


Figure 19. Vue d'ensemble des étapes du procédé de fermentation industrielle.

3.2. Préparations préalables à la culture

La mise en œuvre du procédé de fermentation implique des étapes de préparations. Il faut tout d'abord installer sur le bioréacteur tous les équipements utiles au procédé de fermentation et à son suivi (sondes préalablement calibrées, filtres pour les sorties d'air, axe et moteur d'agitation, membranes pour les prélèvements, tuyaux et connexions pour les solutions d'alimentation associées à des pompes calibrées) (Figure 20).

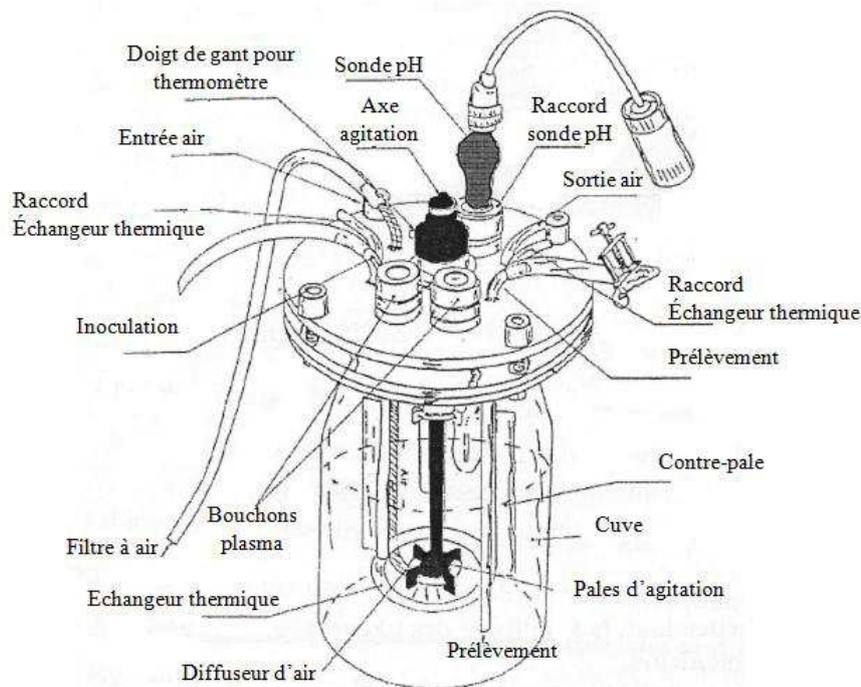


Figure 20. Représentation schématique d'un bioréacteur de 2 litres monté¹⁰.

En parallèle, le milieu de culture, les solutions d'alimentation et les tampons sont préparés. Le milieu de culture est obtenu par mélange, dans une base aqueuse, des différents composés essentiels à la croissance du micro-organisme plus ou moins les éléments nécessaires à la production de la molécule d'intérêt. Afin d'éliminer tout contaminant potentiel, la charge initiale est stérilisée au moyen de deux types de méthodes. La première consiste à établir des connexions pour transférer directement le milieu de culture dans le fermenteur. Après transfert de la charge, la stérilisation a lieu *in situ* par autoclavage. L'autre méthode consiste à stériliser à blanc le bioréacteur et la ligne de transfert : le milieu de culture est alors stérilisé en continu au cours de son transfert dans le fermenteur par de la vapeur saturante. L'avantage de cette dernière méthode réside dans le fait que de grands volumes peuvent être stérilisés. Mais cette technique est assez

¹⁰ Emprunté cours « Capteurs et mesures en biotechnologie », de l'Unité d'Enseignement « Bioproduction, Purification et Caractérisation », S8, dispensé à l'ENSTBB, février 2013

coûteuse et selon les systèmes, de la mousse peut être créée, empêchant le dégagement du dioxyde de carbone produit et augmentant le risque de débordement.

Lorsque la culture est réalisée à grande échelle, une étape de pré-culture est nécessaire pour obtenir, dans le bioréacteur de production, un inoculum en quantité suffisante et à un stade optimal de développement. Pour amplifier les cellules, une culture en erlenmeyer est généralement réalisée en inoculant le milieu avec une quantité connue de matériel vivant, issu d'une ampoule d'une banque de clones. L'inoculation du fermenteur de production est effectuée à partir d'un prélèvement de cette culture en fiole ou bien après une étape de propagation, c'est-à-dire après transfert des cellules dans des bioréacteurs de capacités croissantes jusqu'au fermenteur final.

3.3. Fermentation en bioréacteur : UpStream Process

L'objectif de l'UpStream Process (USP) est d'assurer la croissance des micro-organismes ainsi que la production de molécules d'intérêts en quantité importante. Cette étape de culture cellulaire est réalisée dans un bioréacteur, élément central du procédé de fermentation.

3.3.1. Bio-ingénierie des bioréacteurs

3.3.1.1. Conception des bioréacteurs

Il existe de nombreux modèles de bioréacteurs qui présentent chacun des spécificités propres. La conception d'un bioréacteur est primordiale pour assurer le bon déroulement du procédé, et doit tenir compte de la nature des tâches qui doivent y être exécutées. Un fermenteur correctement conçu doit en effet répondre à un certain nombre d'exigences : il doit résister aux sollicitations de températures, aux vibrations dues à l'agitation, aux surpressions, et doit être étanche aux contaminations extérieures. De plus, le fermenteur doit assurer l'établissement d'un environnement stérile et contrôlé, pour obtenir une croissance et une production optimales des micro-organismes. Parmi les facteurs à prendre en compte, l'un des plus importants est la notion de transfert : les échanges entre les cellules et le milieu de culture conditionnent la réussite du procédé. Cette notion de transfert est vaste et inclut divers aspects.

Il s'agit en premier lieu du transfert de matière : les micro-organismes doivent pouvoir assimiler les substrats et les composés nécessaires à leur croissance mais ils doivent également pouvoir sécréter les produits de leur métabolisme. Pour que ce transfert soit optimum, la répartition homogène des cellules dans le milieu doit être considérée : en cas d'hétérogénéité, le substrat risque de ne plus être dégradé dans certaines zones du bioréacteur, ou bien les produits du métabolisme peuvent s'accumuler et engendrer une inhibition de la croissance.

La conception des bioréacteurs doit faciliter les transferts de chaleur du milieu vers les cellules d'une part, pour que les micro-organismes se retrouvent à une température de croissance optimale, puis des cellules vers le milieu lorsque le procédé progresse car la croissance microbienne est une réaction exothermique.

Pour les processus mettant en œuvre des micro-organismes aérobies, le transfert de l'oxygène est un élément fondamental car cet élément intervient directement dans le métabolisme respiratoire en tant qu'accepteur final des électrons. Seul l'oxygène dissout est assimilable par les cellules. Puisque sa solubilité dans l'eau est limitée (inférieure à 10mg/L à 25°C sous une pression atmosphérique de 1013hPa), il doit être fourni en continu aux cellules. Cet apport est réalisé sous forme de gaz comprimé et stérile. Pour atteindre la cellule, l'oxygène traverse plusieurs barrières, chacune s'opposant à son transfert (Figure 21). Le transfert de l'oxygène peut être décrit par l'Équation 2.

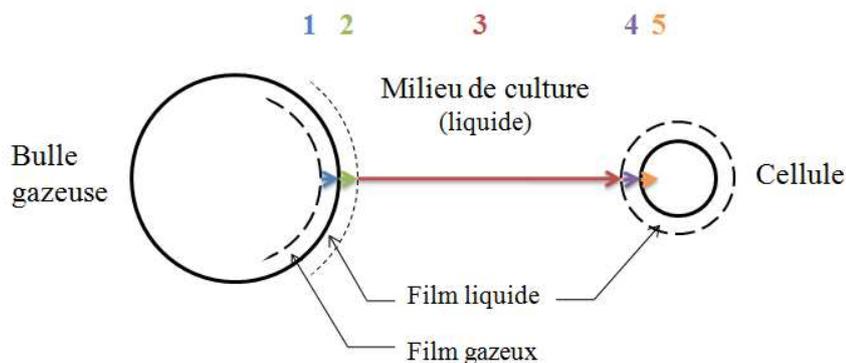


Figure 21. Les étapes du transfert d'oxygène[17]. Dissolution de l'oxygène depuis le film gazeux jusqu'au film liquide entourant la bulle (1 et 2), diffusion de l'oxygène dissout vers la cellule (3), transfert dans le film liquide entourant la cellule (4) et pénétration dans la cellule (5).

$$r_{O_2} = K_L a (C^* - C_L)$$

Équation 2. Equation globale du transfert de l'oxygène. r_{O_2} , vitesse d'oxygénation par volume de milieu ; K_L , coefficient de transfert par rapport au film liquide ; a , surface totale d'échange par unité de volume ; C^* , concentration saturante en oxygène dissout ; C_L , concentration effective en oxygène dissout.

La mesure du $K_L a$, le coefficient de transfert de masse volumétrique, permet d'évaluer la capacité d'aération du bioréacteur dans les conditions déterminées de l'étude. Plusieurs méthodes sont décrites pour la détermination du $K_L a$ [18]: la méthode au sulfite (Cooper, 1944), la méthode à la glucose-oxydase (Hsieh *et al*, 1969), des méthodes microbiologiques et des techniques utilisant des sondes à oxygène, de type polarographiques ou galvaniques. Trois méthodes peuvent être mises en œuvre : une méthode statique (Corrieu, 1975), où la valeur de $K_L a$ est déterminée dans les conditions où se déroulera la fermentation (agitation, température, milieu) mais en absence de cellules ; une méthode dynamique (Taguchi et Humphrey, 1966), très

employée car la mesure du K_{La} est réalisée pendant la culture ; et enfin la méthode des bilans gazeux (Corrieu *et al.*, 1975), dont l'intérêt majeur est la détermination en ligne du coefficient de transfert.

Toutes ces notions de transfert ne sont pas fixes dans le temps : au cours du procédé, les caractéristiques rhéologiques du milieu changent et des cellules évoluent, modifiant les échanges. Par conséquent, il est nécessaire d'agir sur les paramètres de fonctionnement du bioréacteur (vitesse d'agitation, débit d'air, ajout de substrat) pour placer les micro-organismes dans un environnement optimal tout au long de la culture. Cette optimisation passe par la bonne homogénéisation du milieu qui est obtenue par agitation de la culture (cf. Chapitre III, §3.3.1.2. Différents types de bioréacteurs).

3.3.1.2. *Différents types de bioréacteurs*

Une manière de classer les nombreux modèles de fermenteurs consiste à les répartir selon leur mode d'agitation.

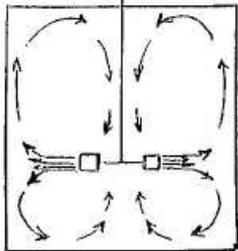
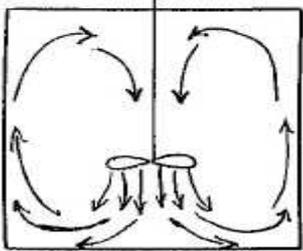
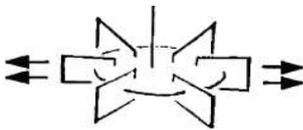
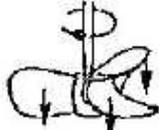
3.3.1.2.1 *Bioréacteurs à agitation mécanique*

Les bioréacteurs à agitation mécanique représentent le système le plus employé de par leur simplicité d'utilisation. La capacité de ce type de bioréacteurs s'étend sur une large gamme, allant de 0,5 litre à l'échelle du laboratoire, jusqu'à plusieurs centaines de milliers de litres, par exemple, pour la production d'antibiotiques. Alors qu'à petite échelle, les bioréacteurs sont en verre, ils sont en acier inoxydable à l'échelle industrielle.

L'homogénéisation est assurée par un mobile d'agitation soumis à un mouvement de rotation par l'intermédiaire d'un axe lui-même relié à un moteur. Le plus souvent, pour les bioréacteurs supérieurs à 500-1000 L, le moteur est disposé au-dessus de la cuve du bioréacteur, ce dernier devant alors supporter le poids de l'appareil. Le moteur peut également être placé à la base du bioréacteur ce qui présente l'avantage d'offrir un meilleur accès aux vannes et sondes placées sur la partie supérieure de la cuve. L'inconvénient, dans ce cas, est le recours à des joints d'étanchéité résistant aux pressions, potentiels points critiques de contamination. Pour les cuves inférieures à 1000 L, une alternative réside dans l'utilisation d'un moteur dont la transmission est assurée par accouplement magnétique.

Les mobiles d'agitation sont de deux types selon les flux générés (Tableau 13). Les agitateurs à débit radial sont particulièrement adaptés pour la culture de micro-organismes car ils assurent un bon transfert de l'oxygène par effet de cisaillement. Les plus employées sont les turbines à pales droites, appelées turbines de Rushton. Ces systèmes sont inadéquats pour les cellules fragiles telles que les cellules animales et pour les milieux visqueux. Dans ces cas, les agitateurs à débit axial, de type hélice marine, sont privilégiés car ils permettent une bonne circulation du fluide par un effet de pompage/brassage.

Tableau 13. Caractéristiques des mobiles d'agitation sur les bioréacteurs pour les systèmes en phase liquide.

Mobile d'agitation	Pale Rushton	Hélice marine
	Radial	Axial
Débit		
Effet	Cisaillement	Pompage/brassage
Transfert oxygène	++	-
Utilisation	Micro-organismes	Cellules fragiles Fluides visqueux
Représentation schématique		

Le nombre de systèmes de pales dépend de la hauteur du liquide dans le bioréacteur et du diamètre de la cuve. Il est envisageable d'associer les deux types de mobiles sur le même axe. Des agitateurs non rotatifs existent, basés sur un mouvement de va-et-vient donnant un effet de pompage et donc adapté aux cellules fragiles. Enfin, l'agitation peut être optimisée par l'utilisation de contre-pales.

3.3.1.2.2 Bioréacteurs à agitation pneumatique

Les systèmes à agitation pneumatique permettent d'éliminer les forces de cisaillements engendrées par les agitateurs à pales. L'agitation de la culture se fait uniquement par injection d'air.

Du modèle le plus simple, correspondant à une colonne à bulles, à des systèmes plus perfectionnés comme le bioréacteur air-lift type Lefrançois (Figure 22), ces systèmes présentent l'avantage de supprimer les cisaillements, d'augmenter la dissolution de l'oxygène et ils permettent une meilleure élimination de la chaleur dégagée lors de la culture. Les coûts élevés en énergie pour injecter l'air, et l'élimination peu efficace de la mousse expliquent leur utilisation moindre dans l'industrie.

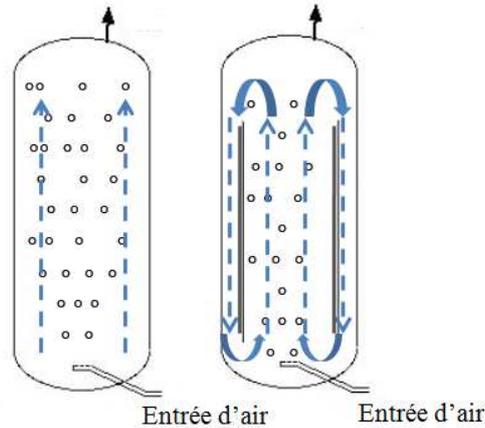


Figure 22. Bioréacteurs à agitation mécanique. Colonne à bulles (A) et bioréacteur type Lefrançois avec mouvements de convection (B).

3.3.2. Différents procédés de culture

Les procédés de fermentation peut être classés en trois modes opératoires, à savoir le batch, le fed-batch et le mode continu, selon la stratégie d'alimentation en nutriments et cellules dans le bioréacteur (Tableau 14).

Tableau 14. Différents types de procédés de culture.

Procédé	Batch	Fed-batch	Continu
Système	Fermé	Ouvert	Ouvert
Représentation schématique			
Volume	Constant	Variable	Constant
Flux d'entrée	Aucun	Milieu, substrats	Milieu, substrats
Flux de sortie	Aucun	Aucun	Milieu et cellules

Dans le procédé batch, également appelé procédé discontinu, l'ensemble des éléments nécessaires à la culture sont introduits dans le fermenteur au départ. En fin de procédé, tout le milieu et les cellules sont retirés du bioréacteur et traités. Puisqu'aucune solution nutritive n'est ajoutée au cours du temps, la quantité de substrat est limitée à la quantité initiale. Tous les procédés de fermentation commencent par un procédé de batch : c'est la technique essentielle pour déterminer les paramètres de croissance de la souche utilisée. Les avantages de ce mode opératoire sont la simplicité et la rapidité de mise en œuvre (préparation du matériel, contrôles et suivis) et la durée limitée de la culture. Les inconvénients sont une production limitée de biomasse (concentration en substrat fixe et limitante), un niveau de productivité faible avec une accumulation possible de produits inhibiteurs de la croissance, rendant le procédé batch inapproprié dans ce cas.

Le procédé de fed-batch est un mode opératoire discontinu alimenté : des nutriments sont additionnés au cours de la culture de manière contrôlée. La caractéristique majeure de ce procédé est la variation du volume de culture puisque des substrats sont ajoutés mais que le milieu n'est pas soutiré. L'estimation du volume de fermentation ne néglige aucuns des apports et soustractions, que ce soit les ajouts de liquides (substrats, liquides de régulation – acide/base), les ajouts de solides, les prélèvements ou le phénomène d'évaporation. L'objectif du fed-batch est d'augmenter la biomasse avant la phase d'alimentation pour la production de la molécule d'intérêt. Le choix du type d'alimentation et la concentration en substrat dépendent du but à atteindre, de la durée du procédé et de la capacité du bioréacteur. Les différentes stratégies envisageables sont une alimentation séquentielle ou une alimentation continue selon un débit constant, linéaire ou exponentiel. Les avantages du procédé fed-batch sont la possibilité d'accumuler de la biomasse à hautes densités cellulaires et d'adapter le débit d'alimentation en fonction de la croissance cellulaire souhaitée. Avec un procédé fed-batch, il est également possible de contrôler la concentration en substrat dans l'environnement : la maîtrise cette concentration permet d'éviter l'accumulation de substrat et la formation de produits pouvant inhiber la croissance. Les inconvénients sont qu'en fin de culture, les phénomènes de transferts sont limités du fait des volumes importants générés. Tout comme pour le procédé batch, si le produit d'intérêt synthétisé est toxique pour la cellule, le procédé fed-batch est inadéquat; il faudra alors s'orienter vers un procédé de culture en continu.

Au cours des procédés en continu, les systèmes sont ouverts : des nutriments sont ajoutés au milieu de culture en parallèle du prélèvement du milieu et des cellules, de sorte à ce que le volume dans le bioréacteur soit maintenu constant. Ce mode opératoire est particulièrement

intéressant pour des cultures de longues durées. Après adaptation des cellules, un régime permanent est établi au cours duquel les concentrations en biomasse, en substrat et en produit sont constantes.

Plusieurs techniques de culture continue sont possibles : (1) le pH-stat, où le pH est maintenu constant ; (2) la technique turbidostat, où la biomasse présente est quantifiée par turbidimétrie et le flux de substrat est réglé pour maintenir constante la densité cellulaire ; (3) et la technique chémostat, la plus utilisée, où le substrat est le facteur limitant de la croissance. Les avantages de la culture en continu sont que l'environnement nutritionnel est maîtrisé, les rendements de conversion du substrat en biomasse sont optimisés et ils offrent la possibilité de travailler sur des longues durées sans temps morts. Ce procédé est en revanche peu approprié à la production de biomasse, d'autant plus que la stabilité des souches est fragilisée, que des phénomènes de sélections cellulaires peuvent apparaître, et que le risque de contamination est important. La culture en continu nécessite par ailleurs des équipements supplémentaires pour réaliser le traitement du produit en ligne (séparation et purification).

Des procédés continus ont été développés pour réaliser des cultures à hautes densités cellulaires. Ces systèmes, qualifiés de « pseudo-ouverts », associent les avantages des modes opératoires continus et fed-batch, à savoir un environnement nutritionnel maîtrisé, l'obtention de concentrations cellulaires très élevées tout en évitant l'accumulation de produits toxiques, et une productivité volumique importante. Deux technologies sont principalement utilisées : la rétention et le recyclage de la biomasse. La rétention de la biomasse consiste à confiner les cellules dans le bioréacteur par des phénomènes de floculation ou en les immobilisant. Dans ce dernier cas, les cellules sont fixées sur un support par adsorption sur des billes (alginate, dextran), inclusion dans un polymère (gélatine, agarose, alginate) ou encapsulation dans une matrice (cellulose, alginate). Le recyclage de la biomasse est effectué grâce à un système de recirculation qui permet la réintroduction des cellules soutirées dans le bioréacteur. Ce système, à l'extérieur du bioréacteur, comprend un organe de séparation (centrifugation ou filtration) ou de concentration pour séparer la biomasse des phases liquides.

3.3.3. Suivi et régulation d'un procédé de fermentation

Pour que la culture soit optimale sur toute la durée du procédé, il est essentiel de suivre et réguler les paramètres de fermentation. La régulation vise à maintenir un écart minimal entre la valeur mesurée dans le fermenteur au moyen d'un capteur, et la valeur de consigne préalablement déterminée.

La régulation peut être manuelle, auquel cas l'opérateur agit directement sur les paramètres, par exemple, en actionnant une pompe pour délivrer un soluté ; ou elle peut être automatique, et l'objectif est alors de faire fonctionner le procédé de façon la plus autonome possible grâce à la mise en place d'une boucle de régulation. Le pilotage des processus fait appel à des outils du génie des procédés et d'instrumentation dont le rôle est de trouver une relation entre les signaux d'entrée et les signaux de sortie en s'appuyant sur la théorie (modélisation) ou sur les résultats expérimentaux (identification). Cette relation peut être représentée graphiquement sous la forme d'un schéma dit fonctionnel (Figure 23).

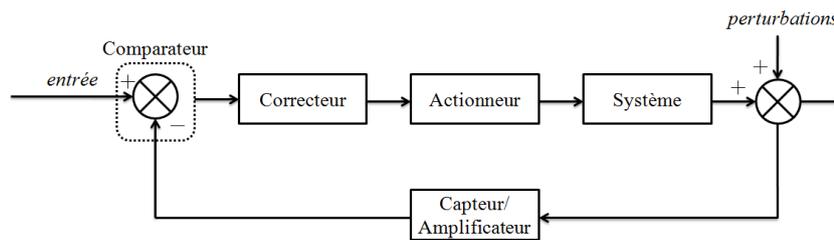


Figure 23. Schéma fonctionnel d'un système comprenant une boucle de régulation.

Le premier élément du système de régulation est le capteur (Tableau 15). C'est un dispositif sensible aux variations de la grandeur à réguler et qui émet un signal électrique en relation avec la mesure. Ce signal est ensuite amplifié et standardisé pour afficher la valeur dans son unité. Le second élément de la boucle est le comparateur, qui calcule l'écart entre la mesure et la consigne, et transmet la valeur à l'actionneur. Après transformation du signal, l'actionneur agit sur le système (le fermenteur) pour le faire évoluer et tenter de réduire l'écart entre la mesure et la consigne.

Tableau 15. Exemple de capteurs couramment employés pour la régulation des procédés de fermentation (liste non exhaustive).

Paramètre mesuré	Capteur	Principe
Température	Résistance métallique (platine, cuivre, nickel)	Augmentation de la résistance avec la température
	Semi-conducteurs	Variation des caractéristiques du transistor avec la température
Débit	Débitmètre à turbine	Détection rotation de la turbine
	Débitmètre à flotteur	Indication par la position du flotteur
	Débitmètre à pression différentielle	Mesure de perte de charge
	Débitmètre massique	Mesure d'une différence de température aux extrémités d'une résistance chauffante
Vitesse agitation	Dynamo tachymétrique	Mouvement donné par l'axe d'agitation
Niveau de mousse	Sonde thermique	Éléments chauffés, présence de mousse détectée par différence de chaleur
pH	Electrodes	Mesure potentiométrique
Oxygène dissous	Sonde à oxygène (polarographique ou galvanique)	Mesure ampérométrique

Selon leur action, différentes familles de correcteurs sont distinguées : (1) les correcteurs proportionnels (P), les plus simples et les moins coûteux, ils agissent sur le temps de réponse du système et sur sa dynamique ; (2) les correcteurs intégrateurs (I), qui eux dégradent la stabilité mais améliorent la précision du système ; (3) les correcteurs dérivateurs ou à avance de phase (D), toujours utilisés en association, ils possèdent un effet stabilisateur. Certains régulateurs associent ces trois types d'action (correcteurs P.I.D) et permettent d'obtenir une régulation très fine du procédé.

Toutes ces composantes, comparateur, régulateur, actionneur, sont aujourd'hui commandées par un ordinateur qui récolte l'information, analyse et enregistre les données, et calcule des modèles pour contrôler les différents paramètres.

3.4. DownStream Process

3.4.1. Extraction de la protéine d'intérêt

A la fin du procédé, la protéine d'intérêt se retrouve dans un environnement constitué du milieu de culture, de débris cellulaires, et de diverses autres protéines. L'étape d'extraction consiste à isoler la protéine d'intérêt à partir de ce matériel biologique. L'objectif est de préparer l'échantillon en vue des étapes de purifications ultérieures. Deux cas de figures sont à distinguer (Figure 24). Si les protéines sont sécrétées dans le milieu de culture sous forme soluble, l'extraction consiste à récupérer le milieu extracellulaire après une étape de centrifugation ou de filtration à travers une barrière poreuse, de type fibres creuses. Une concentration de l'échantillon récupéré peut être nécessaire afin de réduire la quantité d'eau présente. Cette étape est réalisée par précipitation, évaporation ou filtration sur membrane. Si les protéines ne sont pas sécrétées, une lyse cellulaire doit être envisagée avant de récupérer et de traiter le contenu intracellulaire. Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour déstabiliser les membranes telles que la sonification, un choc physique, l'utilisation d'un broyeur à billes, d'agents chimiques (détergents) ou biologiques (lysozymes, cellulases). Dans les cellules, la protéine d'intérêt peut être soluble dans le cytoplasme, auquel cas de nombreuses molécules contaminent l'échantillon (lipides, protéines, protéases), ou bien insoluble et se présenter sous forme de protéines membranaires ou de corps d'inclusion.

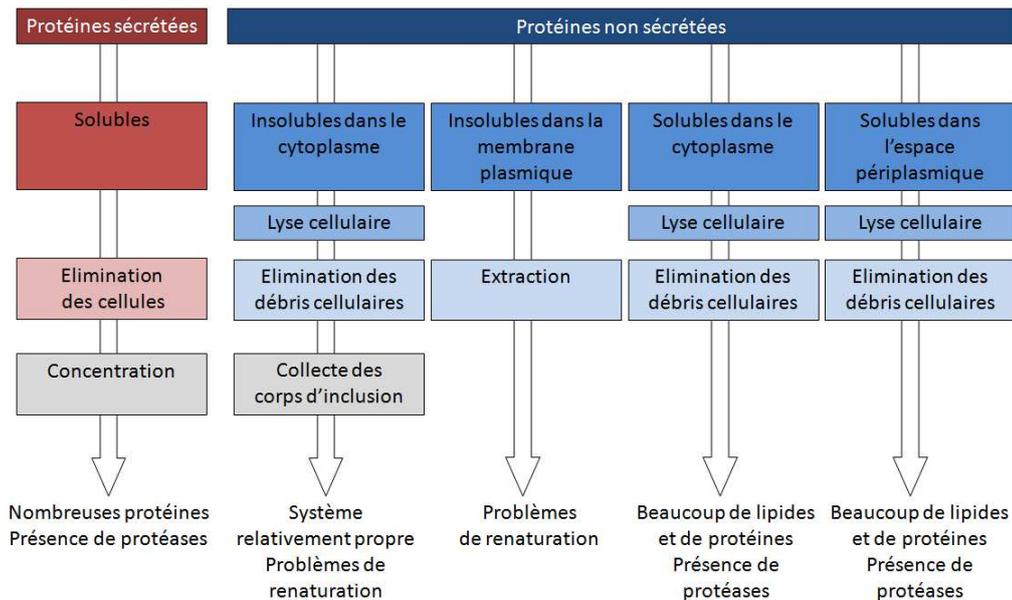


Figure 24. Différentes voies pour l'extraction de la protéine d'intérêt à partir de la culture¹¹.

Les étapes, les contraintes et les tampons utilisés sont propres à chaque cas précédemment cité. Le cas le plus complexe se produit lorsque les protéines forment des corps d'inclusion. Il faut alors solubiliser la protéine à l'aide d'agents détergents (SDS, Triton, Tween), qui par leurs propriétés amphiphiles, vont former des micelles englobant les particules insolubles. Cette solubilisation entraîne la dénaturation de la protéine qu'il faudra renaturer par la suite pour restaurer son activité biologique.

3.4.2. Etapes de purification

L'objectif des étapes de purification est d'isoler la protéine d'intérêt des autres protéines et contaminants du mélange dans lequel elle se trouve. Les notions de pureté et de rendement sont au cœur de ces étapes de séparation. La stratégie de purification peut se décliner en trois étapes ayant chacune un objectif spécifique (Figure 25).

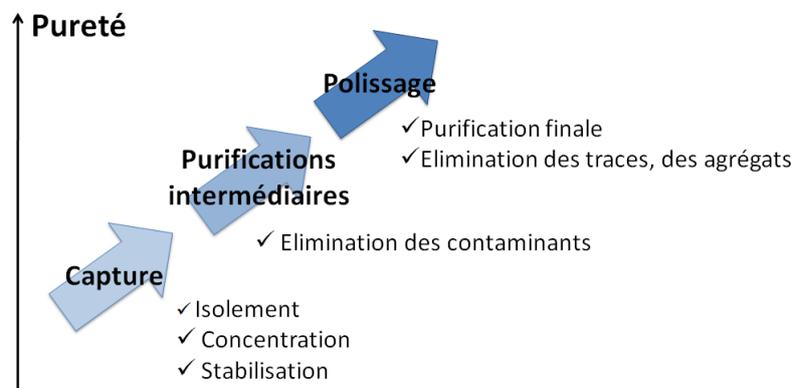


Figure 25. Stratégie de purification en trois étapes¹¹.

¹¹ Extrait du cours « Purification de biomolécules », de l'Unité d'Enseignement « Bioproduction, Purification et Caractérisation », S8, dispensé à l'ENSTBB, janvier 2013

Avant de définir une stratégie, il convient de définir les objectifs en termes de qualité, de pureté et d'activité. Par exemple, si la protéine est destinée à un usage thérapeutique, la pureté et la quantité attendues en fin de procédé sont respectivement de 99,5% et de l'ordre du kilogramme. Les propriétés de la protéine cible doivent également être clairement définies (stabilité vis-à-vis de la température, du pH, force ionique, sensibilité aux protéases...). Les techniques utilisées doivent être robustes, applicables à toutes les échelles, et doivent employer des tampons et des additifs utilisables à grande échelle. L'utilisation de techniques différentes permet de tirer avantage de toutes les caractéristiques de la protéine d'intérêt. Toutefois, le nombre d'étapes doit être optimisé afin de limiter les pertes de produits, les coûts et la durée du procédé de purification. Les principales techniques de chromatographie utilisées pour séparer les molécules (Tableau 16) se basent sur les caractéristiques des protéines regroupées sous l'acronyme CHASM pour Charge, Hydrophobicité, Affinité, Solubilité et Stabilité et Masse moléculaire.

Tableau 16. Techniques chromatographiques utilisées pour la purification de la molécule d'intérêt.

	IEX (Ion Exchange)	HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography)	Chromatographie d'affinité	Exclusion stérique
Principe	Adsorption par interactions électrostatiques	Adsorption par interactions hydrophobes en présence de fortes concentrations en sels	Interaction spécifique avec le ligand	Séparation en fonction de la taille des molécules
Résine	Anionique (chargée positivement) ou Cationique (chargée négativement)	Ligands avec groupements hydrophobes (noyau phénol, chaîne carbonée)	Ligands spécifiques	Billes avec des pores plus ou moins grands
Elution	Modification du pH pour induire une répulsion ionique ou ajouts de sels (compétition)	Diminution de la concentration en sels	Modification du pH, modification de la force ionique, addition d'une molécule entrant en compétition	Elution isocratique par ordre inverse de la masse moléculaire

4. Contrôle qualité

Dans l'industrie pharmaceutique, la réglementation impose de nombreux contrôles afin de garantir la qualité et la sécurité du produit administré aux patients. Ces contrôles sont à effectuer à plusieurs niveaux : au niveau de l'environnement (eau, air, surfaces, personnel), au cours du procédé (cf. Chapitre III, §3.3.3. Suivi et régulation d'un procédé de fermentation), ainsi qu'au niveau de la souche et du produit final.

4.1. Contrôle des souches

Dans tous les procédés industriels, il convient de vérifier que le clone utilisé pour les cultures correspond à la souche sélectionnée initialement. Des contrôles microbiologiques (observation au microscope, isolement sur des milieux riches ou sélectifs, antibiotype), biochimiques (galeries) et génétiques (génotypage, séquençage, PCR sur colonies, identité et nombre de copies du plasmide) doivent être régulièrement réalisés sur les tubes stock de la souche sélectionnée et sur l'inoculum afin de vérifier l'identité, l'homogénéité, la stabilité génétique, la pureté et la viabilité des clones. De plus, les micro-organismes doivent conserver leur activité et leur performance au cours du temps ce qui implique de contrôler la qualité de productivité de la souche ; pas uniquement la quantité de produit synthétisé, mais aussi la vitesse spécifique de production.

4.2. Contrôle de la protéine produite

L'identité, la pureté et la concentration de la protéine d'intérêt doivent être contrôlées tout au long du procédé, dans le produit final et dans les fractions ne devant, normalement, contenir que les contaminants.

L'identité de la protéine peut être testée par des techniques d'électrophorèse sur gel, de western-blot, de chromatographie HPLC, ou pour aller plus loin des techniques de spectrométrie de masse et de séquençage. La pureté de la protéine est estimée par électrophorèse ou HPLC. La concentration de la protéine est déterminée par dosage colorimétrique, par la mise en œuvre de tests enzymatiques, en mesurant l'absorbance à 280 nm, en pratiquant un test ELISA ou en ayant recours à la spectrométrie de masse quantitative.

Les principaux contaminants à contrôler sont des endotoxines, des protéines de la cellule hôte (HCP – Host Cell Proteins), la présence d'antibiotiques résiduels ou d'autres agents chimiques utilisés au cours du procédé et pouvant altérer la stabilité de la molécule.

CHAPITRE IV

MISE EN PLACE ET DEVELOPPEMENT

D'UNE PLATEFORME DE CULTURE POUR

LA LEVURE *PICCHIA PASTORIS*

1. Avant-propos

Le site Merck Biodevelopment de Martillac a récemment élargi son activité au développement et à la production de molécules recombinantes à partir de micro-organismes. L'un des systèmes utilisés est la levure *Pichia pastoris*. *Pichia pastoris* appartient à l'ordre des Saccharomycetales, au même titre que *Saccharomyces cerevisiae*, et fait parti de la famille des Pichiaceae. Aussi connu sous le nom de *Komagataella pastoris*, c'est un eucaryote unicellulaire aérobie obligatoire, capable de croître dans des milieux contenant du glycérol, du glucose mais aussi du méthanol, ce qui en fait tout son intérêt.

Pichia pastoris est un hôte privilégié pour la production de protéines recombinantes du fait de sa capacité à croître à des densités cellulaires élevées, supérieures à 130 g de matière sèche /L [19,20], et de la présence dans son génome d'un promoteur fort pAOX₁, permettant l'expression à haut niveau de protéines hétérologues, de l'ordre du gramme par litre. *P. pastoris* est de plus en plus utilisée en tant qu'hôte alternatif au système d'expression eucaryote *Saccharomyces cerevisiae*, car l'expression à grande échelle de certaines protéines hétérologues au sein de ce système, a révélé de faibles rendements en protéines et des problèmes de perte du plasmide ou d'hyperglycosylations [21].

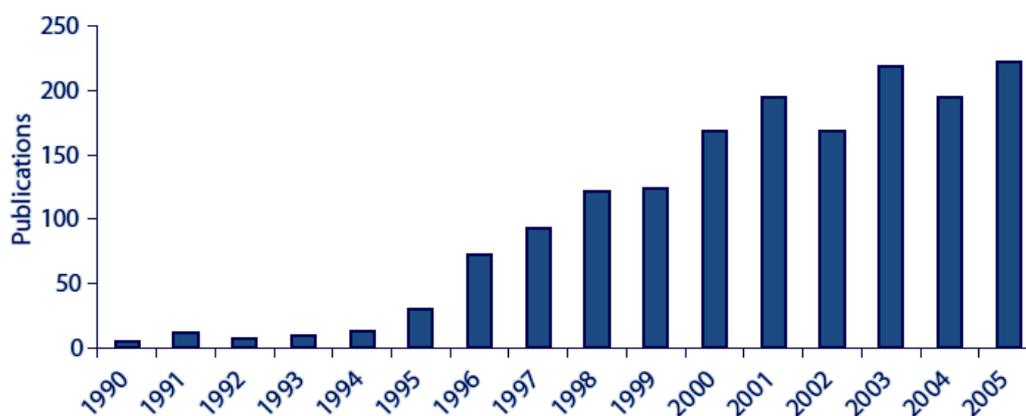


Figure 26. Evolution du nombre de publications où le système d'expression de *Pichia pastoris* a été utilisé, de 1990 à 2005 [22]. Estimation par extrapolation linéaire basée sur des données réelles pour les neuf premiers mois.

Devant l'essor de ce système d'expression (Figure 26) et en vue de réduire les coûts et le temps de développement des procédés à l'arrivée de nouveaux clones, Merck Biodevelopment souhaite mettre en place une plateforme générique permettant de développer rapidement des procédés hautement efficaces. Une première approche a été évaluée au laboratoire concernant l'étape de purification de la molécule d'intérêt [23]. Elle a abouti à la création d'un ensemble d'outils qui permettent de définir les essais à réaliser afin d'atteindre les spécifications finales du produit en terme de quantité et de pureté.

L'objectif de la présente étude expérimentale a été d'initier le développement de l'étape de fermentation de la plateforme, en axant les recherches sur l'optimisation du milieu de culture. Afin de définir un milieu générique minimum, il est apparu nécessaire de miniaturiser le procédé de fermentation pour tester un grand nombre de milieux différents à petite échelle et ne sélectionner que les plus favorables pour une étude à plus grande échelle. Les microplaques représentent une alternative de choix aux systèmes de culture en Flask ErlenMeyer (FEM) pour effectuer ce criblage, principalement de par des avantages logistiques, avec la multiplicité des manipulations envisageables en parallèle, ainsi que par la disponibilité d'équipements annexes compatibles tels que des multipipettes, des robots pour la préparation des échantillons et des lecteurs de microplaques.

Le projet a débuté par la mise en place du système de culture en microplaque au laboratoire, à la suite de laquelle la croissance et la productivité de *P. pastoris* ont été évaluées. A partir des résultats obtenus, un milieu chimiquement défini a été développé selon une stratégie de simplification. Après le criblage des éléments, la capacité de *P. pastoris* à produire la molécule d'intérêt avec le milieu minimum retenu a été évaluée en bioréacteur de un litre.

2. Entreprise d'accueil de l'étude expérimentale

L'étude expérimentale a été effectuée dans le cadre du stage de fin d'études du cursus suivi à l'ENSTBB (Ecole Nationale Supérieure de Technologie des Biomolécules de Bordeaux). Le stage s'est déroulé entre le 15 juillet 2013 et le 31 janvier 2014 au sein du laboratoire de développement de l'unité microbiologique de la société Merck Biodevelopment, filiale de Merck KGaA.

Merck KGaA (Kommandit Gesellschaft auf Aktien), est un groupe pharmaceutique et chimique qui opère à l'échelle internationale avec ces quelques 38000 employés répartis dans 66 pays [24]. Ancré dans la tradition familiale, le plus ancien groupe pharmaceutique trouve son origine à Darmstadt, où Friedrich Jacob Merck a fait l'acquisition en 1668 de la pharmacie de l'Ange (Engel-Apotheke). Depuis, la société a accru le nombre de ses partenaires, elle a diversifié son activité et elle exporte son savoir-faire à travers le monde, comme par exemple avec son antenne aux Etats-Unis connue sous le nom d'EMD (Emmanuel Merck Darmstadt). Aujourd'hui, le capital de Merck KGaA est détenu à hauteur de 70% par la famille Merck, les 30% restants étant la propriété d'actionnaires extérieurs. Les activités du groupe s'articulent autour de deux branches, la pharmacie et la chimie, dont les applications se répartissent en quatre divisions : Merck Serono, Merck Millipore, Performance Materials et Consumer Health Care.

Merck Serono est la division la plus importante de Merck KGaA avec près de 56% des ventes totales du groupe [24]. Elle a été créée en 2007 suite à la fusion de l'entreprise Suisse Serono avec la division Merck Ethicals. Elle compte aujourd'hui plus de 17000 collaborateurs à travers le monde. Merck Serono est engagé dans l'amélioration de la santé et dans l'apport de nouvelles solutions thérapeutiques à partir de molécules innovantes. La division consacre plus de 20% de son chiffre d'affaires total à la recherche et au développement de nouveaux traitements, soit un investissement de plus d'un milliard d'euros par an. Ses domaines d'expertise sont les suivants : l'oncologie, les maladies neurodégénératives, l'endocrinologie, la fertilité et les pathologies métaboliques et cardio-vasculaires.

Basée à Martillac en Gironde, Merck Biodevelopment (MB) est une unité de Merck spécialisée dans le développement et la production, à partir d'organismes vivants, de molécules à visée thérapeutique destinées aux essais précliniques et cliniques de phase I, II et III. Issue de l'association de Merck Millipore et de Merck Serono, MB rassemble à ce jour plus de 150 personnes sur le site, sous la direction de D. Peyret. Suite au projet Micromotion, MB s'est doté d'un centre d'expertise en micro-organismes et est devenu le seul site de Merck à maîtriser simultanément des procédés biotechnologiques utilisant des cellules de mammifères (CHO), des bactéries (*Escherichia coli*) et des levures (*P. pastoris*). Pour chaque activité, mammifère ou microbiologique, MB intègre un service de développement, chargé de développer des procédés à l'échelle du laboratoire puis de transférer les paramètres pour les changements d'échelles ; ainsi qu'un service de production dont l'objectif est de répondre aux besoins en substances actives des clients selon les règles cGMP. Chaque service de développement ou de production est subdivisé en deux domaines : l'UpStream Process (USP), ayant en charge les procédés de cultures pour la production de la molécule d'intérêt, et le DownStream Process (DSP) qui assure les étapes de purification de la molécule synthétisée.

3. Contexte de l'étude

3.1. Système d'expression : *Pichia pastoris*

3.1.1. Historique

La capacité de certaines levures à utiliser le méthanol comme source d'énergie a été décrite pour la première fois dans les années 1970 par Koichi Ogata [25]. Le recours à cette matière première, peu coûteuse et facilement accessible, a placé les levures méthylophiles comme un système majeur pour la production de biomasse et de protéines. Initialement développé pour produire des SCP (single cell-proteins) destinées à l'alimentation animale comme alternative au soja, l'utilisation de ce procédé a connu un déclin suite à la crise pétrolière à la fin des années 1970, associée à la chute du prix du soja.

Ce n'est qu'à partir des années 1980 que l'exploitation de la levure *Pichia pastoris* connaît un nouvel essor grâce à l'association de la société Phillips Petroleum, à l'origine du développement de milieux de cultures et de protocoles pour la croissance de *Pichia pastoris*, avec le SIBIA (Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates Inc.). L'isolement du gène et du promoteur de l'alcool oxydase en parallèle du développement de vecteurs et de souches ont fait de cette levure un outil biologique majeur en tant que modèle eucaryote et surtout en tant que système d'expression de protéines hétérologues. La capacité de la levure à synthétiser les protéines recombinantes en grandes quantités n'a fait qu'amplifier l'intérêt des industriels.

En 1993, Phillips et Petroleum ont vendu le brevet à la société RCT (Research Corporation Technologies) et ils ont autorisé Invitrogen à vendre le système d'expression *Pichia pastoris* sous forme de kit, accord encore maintenu aujourd'hui entre RCT et Invitrogen.

3.1.2. *Pichia pastoris* : une levure méthylophile

Parce qu'elle est capable d'assimiler le méthanol comme source de carbone, *Pichia pastoris* est qualifiée de levure méthylophile, au même titre que des levures appartenant aux genres *Candida*, *Hansenula*, et *Torulopsis*. Ce caractère méthylophile s'explique par la présence dans le génome de *Pichia*, de deux copies du gène de l'alcool oxydase, AOX₁ et AOX₂. La voie métabolique conduisant à la libération d'énergie à partir du méthanol est décrite de manière détaillée dans la littérature [26, 27, 28]. Les réactions et les acteurs impliqués dans ce métabolisme, qui présente la particularité d'être très compartimenté, sont conservés parmi toutes les levures méthylophiles.

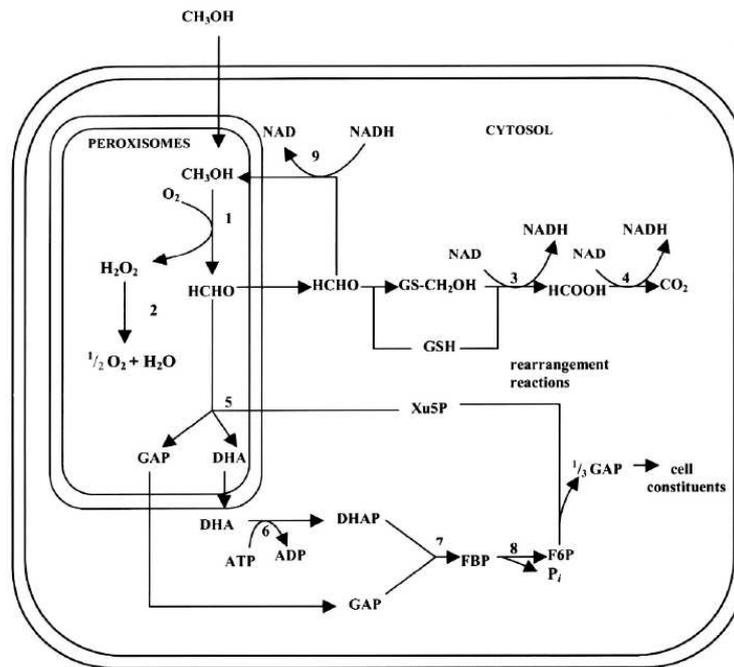


Figure 27. Métabolisme de la levure *Pichia pastoris* en présence de méthanol [29]. Alcool oxydase (1), catalase (2), formaldéhyde déhydrogénase (3), formate déhydrogénase (4), dihydroxyacétone synthase (5), dihydroxyacétone kinase (6), fructose-1,6-bisphosphate aldolase (7), fructose-1,6-bisphosphatase (8), formaldéhyde réductase (9).

Après assimilation par diffusion à travers la membrane plasmique, le méthanol est localisé dans le peroxysome où il est oxydé en formaldéhyde sous l'action de l'AOX. Cette réaction utilise l'oxygène comme accepteur d'électrons et génère du peroxyde d'hydrogène, lui-même transformé en oxygène et en eau sous l'action d'une catalase au niveau des peroxysomes. Une partie du formaldéhyde est excrétée dans le cytosol où il s'associe avec le glutathion pour former un complexe. Ce complexe est ensuite oxydé en formate puis en dioxyde de carbone au cours de deux réactions de déhydrogénation successives faisant intervenir la formaldéhyde déhydrogénase et la formate déhydrogénase. Au niveau du cytoplasme, le formaldéhyde est également pris en charge par une enzyme dépendante du NADH, la formaldéhyde réductase, qui le réduit en méthanol. Avec l'AOX, cette enzyme participe à la régulation intracellulaire des concentrations en formaldéhyde et en NADH. Le formaldéhyde restant dans le peroxysome réagit avec du xylulose-5-phosphate pour former le glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) et le dihydroxyacétone (DHA). Ces deux composés à trois atomes de carbone sont ensuite métabolisés dans le cytoplasme et contribuent à la production de biomasse et de constituants cellulaires.

L'oxygène est un facteur limitant de la voie métabolique du méthanol : en cas d'apport insuffisant en oxygène, l'AOX n'est plus fonctionnelle et le méthanol s'accumule dans la cellule, jusqu'à devenir toxique au-delà de 5g/L [30]. La régulation du métabolisme du méthanol est

intimement liée à l'expression des gènes codant pour les AOX, et notamment le gène codant AOX₁, car il régule 85% de l'activité de l'AOX dans la cellule [29]. Ces régulations ont été observées au niveau transcriptionnel : en présence de méthanol, 5% des ARN matures sont transcrits à partir du gène AOX₁, alors qu'avec une autre source de carbone, ces ARN sont indétectables [31]. La régulation de l'expression du gène AOX₁ est soumise à deux types de mécanismes : un mécanisme de répression et un mécanisme d'induction. D'une manière simplifiée, l'expression du gène AOX₁ est réprimée en présence de fortes concentrations de glucose ou de glycérol [20] et elle est induite suite à l'addition de méthanol [26].

3.1.3. Construction des souches

L'expression d'un gène hétérologue chez *Pichia pastoris* peut se décliner en trois étapes : l'insertion d'un gène d'intérêt dans un vecteur d'expression, l'introduction du vecteur recombinant dans la cellule hôte, et l'évaluation du potentiel d'expression du clone ainsi créé. Aujourd'hui, des banques de clones et une grande variété de vecteurs commerciaux sont disponibles.

3.1.3.1. Vecteurs d'expressions

Les éléments communs constituant les vecteurs d'expression pour *Pichia* sont les suivants (Figure 28): une séquence promotrice, le plus souvent le promoteur pAOX₁ (Tableau 17), mais également les promoteurs pGAP, pFLD1, pPEX8 et pT1 comme alternatives ; une séquence de terminaison de la transcription, dérivée du gène AOX₁ ; et la cassette d'expression avec des sites de restrictions uniques pour l'insertion du gène d'intérêt. Certains vecteurs possèdent également des fragments originaux des séquences AOX₁ 3' afin de pouvoir intégrer la cassette d'expression au niveau du locus AOX₁ par remplacement du gène natif (cf. Chapitre IV, §3.1.3.2. Souches communément utilisées).

Tableau 17. Avantages et inconvénients liés à l'utilisation du promoteur pAOX₁ [32].

Avantages	Inconvénients
Transcription de la protéine hétérologue finement régulée et contrôlée par un mécanisme de répression/induction	Suivi du méthanol durant le procédé difficile
Expression de grandes quantités de la protéine hétérologue	Risque associé au stockage de quantités importantes de méthanol
Croissance cellulaire avant surexpression du gène d'intérêt (répression de la transcription)	Deux sources de carbone sont nécessaires, avec une transition de l'une à l'autre à maîtriser
Induction facile de la transcription par ajout de méthanol	

La construction du vecteur recombinant est généralement réalisée chez *E. coli*, c'est pourquoi la plupart des vecteurs utilisés sont des vecteurs navettes bactéries/levures. En plus de la cassette d'expression, ces vecteurs possèdent une origine de réplication procaryote pour le maintien du plasmide dans la bactérie. Ils contiennent un marqueur de sélection commun à ces deux organismes, le plus souvent, le gène *Sh ble*, issu de *Streptoalloteichus hindustanus* et conférant une résistance à la zéocine, un antibiotique glycopeptidique de la famille de la bléomycine qui se lie et casse les molécules d'ADN.

Pour la sécrétion des protéines hétérologues, certains vecteurs possèdent une séquence codant pour un signal de sécrétion directement en aval du promoteur. La séquence la plus utilisée est celle codant le facteur prepro α dérivant de *Saccharomyces cerevisiae*. Des vecteurs sont également construits avec la séquence signal du gène de la phosphatase acide (PHO1) de *Pichia pastoris*.

Enfin, des séquences appelées étiquettes, ou tag, peuvent également être insérées pour faciliter les étapes de purification ultérieures.

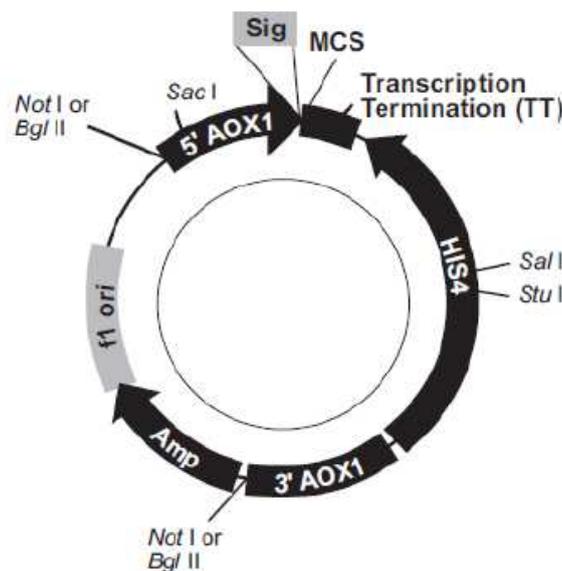


Figure 28. Eléments constitutifs des vecteurs pour l'expression dans *Pichia pastoris*¹². Origine de réplication du plasmide dans *E. coli* (f1ori) ; promoteur pAOX1 (5' AOX1) ; peptide signal (Sig) ; site de clonage multiple (MCS) ; site de terminaison de la transcription (TT), marqueurs de sélection (Amp, HIS4) et séquence 3' du gène AOX1 (3' AOX1).

¹² Source : Catalogue n°K1710-01 « *Pichia* expression kit », par Life Technologies (Invitrogen), 2014. Disponible à l'URL suivante : http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf [Consulté le 20/07/2014]

3.1.3.2. *Souches communément utilisées*

Toutes les souches de *Pichia pastoris* dérivent de NRRL-Y 11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL). La plupart ont été mutées au niveau d'un gène, les rendant auxotrophes pour un composé particulier. Cette manipulation génétique permet de sélectionner, par complémentarité, les clones ayant intégré dans leur génome le vecteur d'expression, celui-ci étant construit pour apporter le gène fonctionnel.

On distingue trois phénotypes différents de *Pichia pastoris* selon leur habilité à utiliser le méthanol [29, 33]. Cette différence phénotypique s'explique au niveau génomique par la présence, ou non, des gènes fonctionnels AOX₁ et AOX₂ (Tableau 18).

Tableau 18. Propriétés des différentes souches de *P. pastoris* selon le phénotype. AOX_n^{+/−}: présence/absence des gènes AOX₁ et/ou AOX₂. Vitesse de métabolisme sur méthanol, comparée à la souche sauvage (WT, Wild Type) : rapide (++) , ralenti (+), nulle (-).

Phénotype	Gène AOX	Métabolisme sur méthanol	Exemples de souches
WT	AOX ₁ ⁺ ,AOX ₂ ⁺	++	NRRL-Y 11430
Mut ⁺	AOX ₁ ⁺ ,AOX ₂ ⁺	++	GS115, JC 100, X33, PPF1
Mut ^s	AOX ₁ [−] ,AOX ₂ ⁺	+	KM71, CBS7435
Mut [−]	AOX ₁ [−] ,AOX ₂ [−]	-	MC 100-3

Les souches Mut⁺ (*methanol utilization plus*), dont la plus utilisée est la souche GS 115 (*His4*), expriment les deux gènes et possèdent donc des caractéristiques de croissance identiques à la souche sauvage sur méthanol. Ce type de souche est obtenu en insérant la cassette d'expression au niveau du locus AOX₁, ou *His4*, par un simple cross-over (Figure 29A et B). Les souches Mut^s (*methanol utilization slow*), à l'image de la souche KM71, n'expriment que le gène AOX₂, ce qui se traduit par un métabolisme ralenti. L'obtention de ces souches s'effectue par remplacement du gène AOX₁ natif, par l'insert contenant le gène d'intérêt (Figure 29C). Cette opération est rendue possible par la présence, dans le vecteur d'expression, de séquences homologues au locus AOX₁ situées à chaque extrémité, qui permettent un double crossing-over. Enfin, les souches Mut[−] (*methanol utilization minus*), tel que MC100-3, présentent une délétion des deux gènes, engendrant une incapacité à croître sur un milieu contenant uniquement du méthanol. La demande moindre en méthanol de ces souches Mut[−] explique l'intérêt des industriels à les cultiver en raison du risque d'incendie associé à l'utilisation de méthanol. Les souches de ces trois phénotypes conservent la capacité d'induire l'expression de protéines placées sous le contrôle du promoteur pAOX₁ [34]. Des études reportent même de meilleurs résultats avec les souches pour lesquelles les gènes AOX sont délétés, par rapport aux souches sauvages [35]. Toutefois, la plupart des recherches actuelles exploitent les souches Mut⁺ et Mut^s.

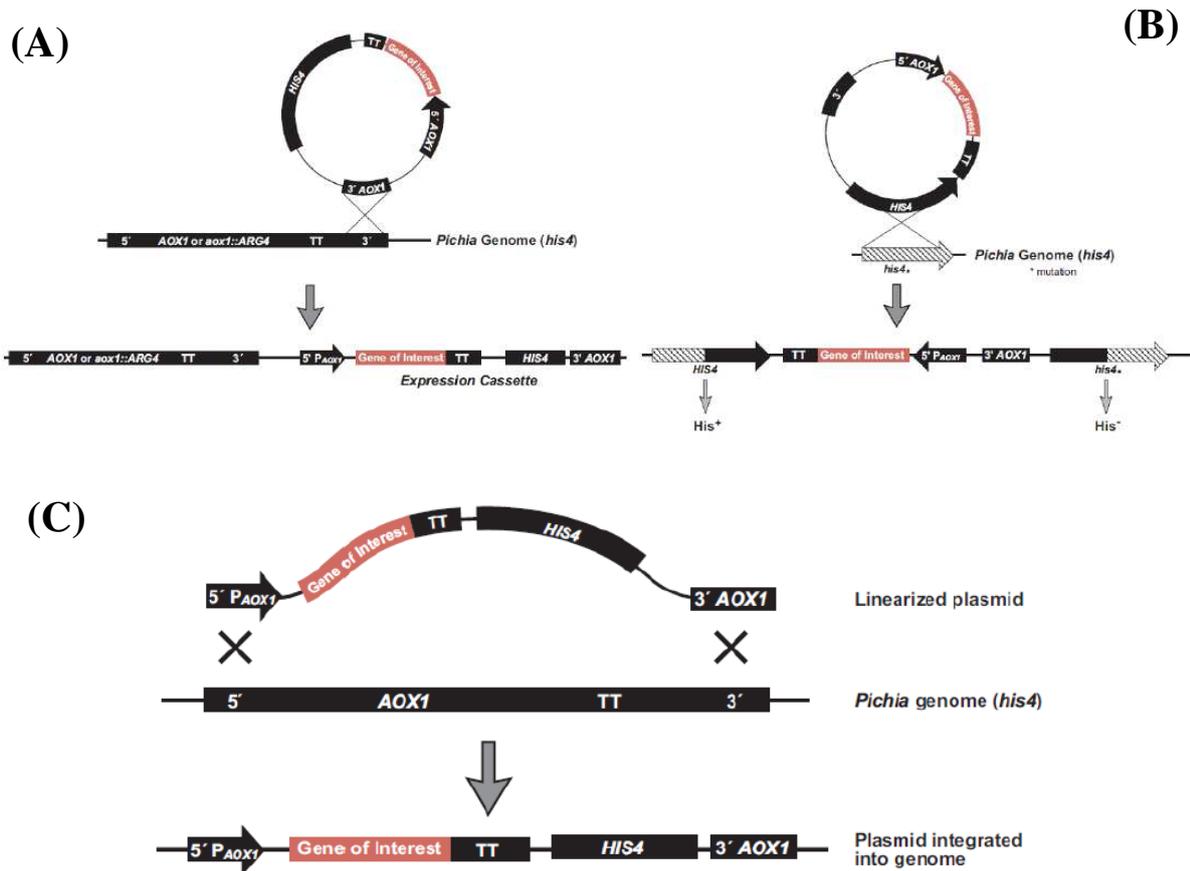


Figure 29. Différentes voies d'intégration du vecteur dans le génome de *Pichia pastoris*¹³.

Une autre série de souches, SMD, a été développée afin de remédier à l'instabilité observée avec certaines protéines hétérologues dans le milieu de culture. La cause de la dégradation de ces protéines est la présence dans le milieu de protéases. Bien qu'à l'état naturel, les protéases de *Pichia pastoris* restent contenues dans le milieu intracellulaire, la culture à haute densité cellulaire peut engendrer un stress conduisant à la lyse des cellules, libérant ainsi les protéases qui se retrouvent au contact des protéines hétérologues. Des souches déficientes en protéases permettent d'éviter ce phénomène mais comparées aux souches sauvages, elles présentent une viabilité moindre, un taux de croissance plus faible et leur transformation est plus difficile. C'est pourquoi le recours à ce type de souche est réservé aux cas où les autres mesures prises pour limiter les phénomènes de lyses cellulaires, ou pour limiter l'activité des protéases, (par exemple, un ajustement du pH), ne donnent pas de rendements satisfaisants.

¹³ Source : Catalogue n°K1710-01 « *Pichia* expression kit », par Life Technologies (Invitrogen), 2014. Disponible à l'URL suivante : http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf [Consulté le 20/07/2014]

3.1.3.3. *Intégration, transformation et sélection*

Il n'existe, à ce jour, aucun vecteur d'expression épisomal stable développé pour *Pichia pastoris*, c'est-à-dire un vecteur demeurant sous forme d'ADN circulaire extrachromosomique et doué de réplication autonome. Les vecteurs disponibles s'incorporent dans le génome de la cellule hôte et, comme précédemment énoncé, le mode d'intégration est conditionné par leur construction. Soit le vecteur est digéré par une enzyme de restriction et la forme linéarisée ainsi obtenue s'intègre par simple crossing-over, soit le gène natif est remplacé par double-crossing over. Il est également possible d'augmenter le nombre de copies du transgène dans une cellule en réalisant des multi-insertions (Figure 30). Puisque le gène d'intérêt est présent en multiples copies, un plus grand nombre de protéines recombinantes sont synthétisées et parfois les rendements obtenus sont meilleurs [26].

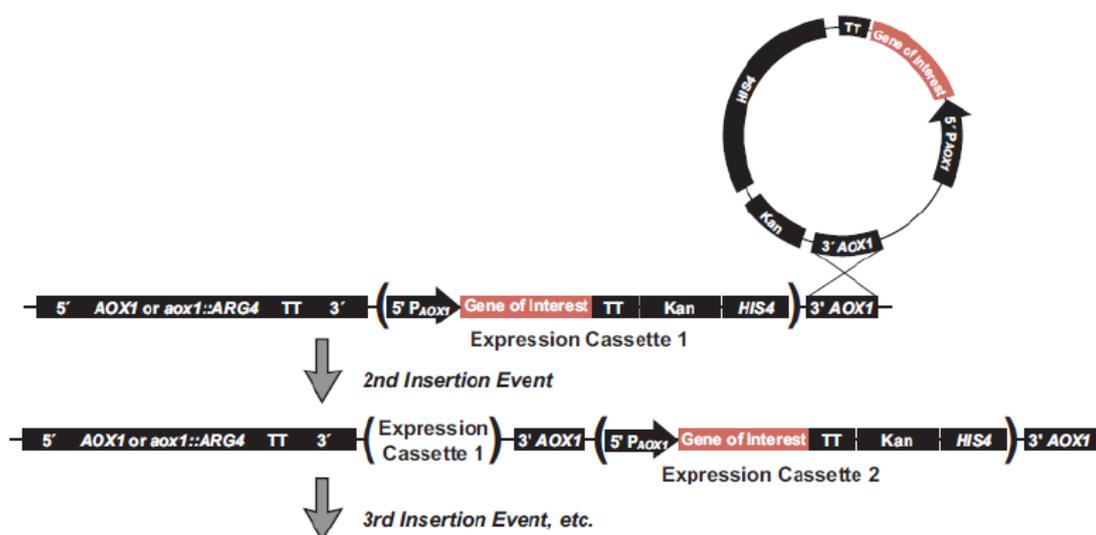


Figure 30. Intégration multicopies du vecteur d'expression¹⁴.

La transformation de *Pichia pastoris* fait intervenir les mêmes méthodes que celles employées pour la transformation de *Saccharomyces cerevisiae*. *Pichia pastoris* peut être transformée au moyen de sphéroplastes, par électroporation ou par une coprécipitation de l'ADN avec du chlorure de lithium, du chlorure de calcium ou du polyéthylène glycol. L'électroporation est la méthode la plus rapide, la plus simple, et la plus performante pour transformer la souche KM71 pour une intégration en simple crossing-over. La technique des sphéroplastes est à privilégier pour l'obtention de souches multicopies ou pour l'intégration avec remplacement de gène.

¹⁴ Source : Catalogue n°K1710-01 « *Pichia* expression kit », par Life Technologies (Invitrogen), 2014. Disponible à l'URL suivante : http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf [Consulté le 20/07/2014]

Deux types de marqueurs sont utilisés pour la sélection des clones recombinants. Il s'agit de biomarqueurs tels que HIS4 (gène histidinol déhydrogénase), ARG4 (gène argininosuccinate liase) et URA3 (gène orotidine 5'-phosphate décarboxylase), qui, par des phénomènes de complémentation, restaurent les voies métaboliques des souches auxotrophiques respectivement pour l'histidine, l'arginine et l'uridine; ou bien de marqueurs conférant une résistance à molécule pharmaceutique, comme le gène *kan^R* ou le gène *Sh ble*, procurant respectivement une résistance à la kanamycine et à la zéocine. Ces différents marqueurs peuvent être associés pour améliorer la précision de la sélection des clones recombinants.

3.1.4. Glycosylation

Les anticorps monoclonaux, les hormones, les facteurs de croissance, les facteurs du sang, sont des protéines glycosylées et leur chaîne carbonée latérale est impliquée dans différents mécanismes cellulaires, comme par exemple la reconnaissance cellulaire ou la liaison à un récepteur, mais aussi dans la stabilité, la conformation et la solubilité de la molécule. Les glycosylations réalisées par les levures sont différentes de celles observées chez les eucaryotes supérieurs dans le sens où les oligosaccharides synthétisés ne contiennent que des résidus mannoses. En effet, les levures sont dépourvues de la mannosidase, enzyme exprimée dans l'appareil de Golgi des eucaryotes supérieurs et responsable du retrait des éléments mannoses. Cette différence peut entraîner une augmentation de l'immunogénécité de la molécule par rapport à la protéine dans l'organisme natif. Toutefois, les chaînes oligosaccharidiques synthétisées par *Pichia pastoris* sont plus courtes que celles retrouvée chez *S. cerevisiae* : en moyenne, les glycoprotéines exprimées par *Pichia* contiennent 8 à 14 résidus mannoses contre 40 à 150 pour *Saccharomyces*. [33]. Aujourd'hui, le génie génétique tend à humaniser les voies de glycosylation chez la levure pour s'affranchir de cette contrainte.

3.1.5. Production de protéines recombinantes par *Pichia pastoris*

3.1.5.1. Intérêt pour la production de protéines hétérologues à l'échelle industrielle

La levure *Pichia pastoris* est largement utilisée comme hôte pour l'expression de protéines hétérologues, tant pour des travaux de recherches que pour une utilisation industrielle [26,32]. Plus de 500 protéines ont été exprimées avec ce système qui associe les avantages des systèmes procaryotes et eucaryotes [36]. Il présente des caractéristiques de croissance assimilables aux procaryotes avec un taux de croissance rapide et une capacité à croître à des densités cellulaires élevées, supérieures à 130 g de matière sèche /L [19,20]. En tant que micro-organisme eucaryote,

il a le potentiel de sécréter des protéines solubles, correctement conformées, fonctionnelles et stables grâce aux modifications post-traductionnelles mises en jeu (glycosylations, formation ponts disulfures, méthylations) [37]. En présence de méthanol, l'AOX représente plus de 30% des protéines solubles totales [38], indiquant la puissance de l'élément promoteur pAOX1. La transformation des levures avec un vecteur où le gène d'intérêt se retrouve sous la dépendance de ce promoteur permet la production de protéines recombinantes à un haut niveau, pouvant aller jusqu'à 12 g/L [39].

3.1.5.2. Généralités sur le procédé de production

Le gène d'intérêt étant placé sous le contrôle du promoteur pAOX₁, la production de protéines hétérologues chez *Pichia pastoris* se base sur le fait que les enzymes requises pour le métabolisme du méthanol sont présentes uniquement lorsque le substrat des cellules pour leur croissance est le méthanol [32].

La production de grandes quantités de molécules recombinantes en FEM est difficile du fait de la limitation en volume, du faible taux de transfert de l'oxygène malgré la présence possible de déflecteurs, et de l'incapacité à suivre efficacement les paramètres physico-chimiques (pH, aération, pression partielle en oxygène...). Au contraire, l'ensemble des paramètres peut être contrôlé simultanément en bioréacteur (cf. Chapitre III, §3.3.3. Suivi et régulation d'un procédé de fermentation) et les cultures réalisées avec ce système donnent des niveaux en protéines plus élevés.

Pour obtenir des rendements élevés, il est essentiel d'optimiser la formation de biomasse car la production de protéines recombinantes chez *Pichia pastoris* est liée à la croissance. Pour augmenter le nombre de cellules, la concentration initiale en substrat peut être augmentée, sans toutefois dépasser le seuil au-delà duquel la concentration est inhibitrice. Une autre méthode consiste à développer une stratégie d'alimentation permettant d'obtenir des hautes densités cellulaires avant la phase d'induction. Classiquement, le procédé de fermentation de *Pichia pastoris* comporte trois étapes (Figure 31) : une phase de croissance où la quantité initiale de substrat est limitée (phase de batch) ; une phase d'alimentation, ayant pour but d'accumuler de la biomasse par ajout en continu (ou séquentiel) de nutriments au milieu (phase de fed-batch); et une phase d'induction où l'expression de la protéine d'intérêt est favorisée par l'addition de méthanol.

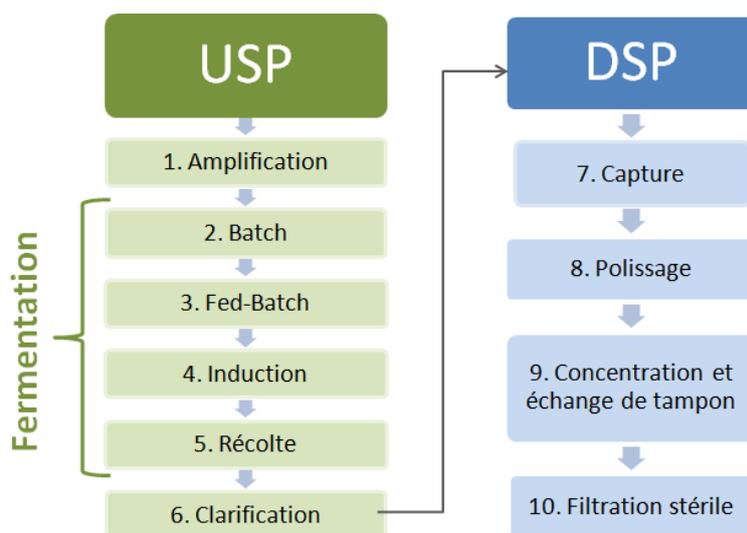


Figure 31. Etapes du procédé telles que mises en œuvre au laboratoire. Suite à une étape d'amplification en FEM, le procédé de fermentation débute par une phase de batch au cours de laquelle la source de carbone pour la levure est du glycérol. Lorsque le milieu est épuisé, le métabolisme des levures ralentit, ce qui se traduit, entre autres, par une augmentation de l'oxygène dissous, car le système de régulation ne répond pas instantanément. Ce signal marque le début de la phase d'alimentation (fed-batch), dont le but est d'augmenter considérablement la biomasse. Lorsque la biomasse fraîche atteint une valeur de $400 \pm 20 \text{ g/L}$, l'induction de l'expression de la protéine est déclenchée par l'ajout dans le milieu de méthanol. Après 96 heures d'induction, le milieu de culture est récolté et le surnageant est séparé du culot cellulaire au cours d'une étape de clarification sur fibre creuse. La molécule d'intérêt, qui se trouve dans le surnageant, est ensuite purifiée au cours des étapes de DSP. La première étape vise à capturer la molécule d'intérêt sur une résine MEP (Mercapto-Ethyl-Pyridine) en mettant à profit les interactions hydrophobes. Puis une chromatographie échangeuse de cations permet d'éliminer les contaminants tels que les protéines de la cellule hôte ou des agrégats : c'est le polissage. Le procédé de purification se termine par une ultrafiltration/diafiltration (UF/DF) et par plusieurs dialyses qui permettent de placer la protéine d'intérêt dans le bon tampon et à la concentration souhaitée. Enfin une dernière étape de filtration stérile est réalisée avant l'envoi de la molécule au site d'Aubonne de Merck, qui effectue la formulation du médicament.

La quantité de méthanol dans le milieu influence fortement la culture : l'augmentation de la concentration en méthanol entraîne l'augmentation du niveau d'expression de la molécule d'intérêt, jusqu'à une concentration optimale au-delà de laquelle un effet d'inhibition a été décrit, accompagné d'une diminution du niveau d'expression [40,41]. Zhang [42] a reporté qu'au-delà d'une concentration critique de $3,65 \text{ g/L}$ en méthanol, l'effet était négatif sur la croissance. Kobayashi et al [30] ont observé le même phénomène à partir d'une concentration en méthanol de 5 g/L .

Plusieurs stratégies sont évoquées dans la littérature pour la réalisation de cette phase d'induction [43,44,45,46] avec par exemple, la mise en place d'une alimentation mixte glycérol/méthanol ou encore avec l'optimisation du débit de méthanol à partir de modèles mathématiques.

Pichia pastoris ne sécrète qu'un faible niveau de protéines endogènes dans le milieu extracellulaire : sous réserve que la séquence de la molécule d'intérêt soit associée à une séquence signal pour adresser la protéine dans la voie de sécrétion, la majorité des protéines du

milieu de culture est donc représentée par la protéine hétérologue, ce qui facilite les étapes de purification.

En fin de culture, le surnageant contenant la molécule d'intérêt est séparé de la masse cellulaire par une étape de clarification. Afin d'obtenir la molécule thérapeutique en accord avec les spécifications de concentration et de pureté, différentes étapes de chromatographie et de filtration sont réalisées (Figure 31).

3.2. Plateforme générique de culture

3.2.1. Objectif

L'utilisation de fermenteurs pour la production de protéines recombinantes avec *Pichia pastoris* est privilégiée car l'environnement de culture est contrôlé. Toutefois, le recours à des systèmes de culture à petite, voir micro-échelle, trouve un intérêt lors du développement des procédés. De tels systèmes offrent la possibilité de tester un grand nombre de conditions dans un temps réduit et à moindre coût, tant sur le plan humain, que matériel.

L'objectif d'une plateforme de culture est de mettre en place des outils pour développer rapidement les procédés de production pour un clone donné. Il s'agit là de définir une méthodologie appropriée pour ajuster les paramètres de culture en fonction des résultats observés. L'aspect générique vient du fait qu'à partir d'un protocole de base, les conditions optimales de croissance et de production du clone pourront être rapidement identifiées et adaptées à partir des connaissances acquises au cours du développement de la plateforme.

3.2.2. Système de culture en microplaque

L'intérêt pour l'optimisation à petite échelle des bioprocédés en microplaque (MP) a considérablement augmenté depuis quelques années par le gain de temps que le système représente. La culture en microplaque de souches aérobies soulève des difficultés telles que le risque de contamination croisée entre les puits et des taux d'aération faibles. Pour pallier à ces problèmes, la société Enzysscreen a développé le système Duetz® (Enzysscreen, Haarlem, Pays-Bas).

Ce système comprend un couvercle spécialement conçu afin de prévenir le risque de déversement de suspension cellulaire entre les puits, d'éviter la contamination par l'air, de limiter l'évaporation excessive d'eau à partir du milieu (inférieur à 5% de volume perdu par jour) et de permettre l'établissement des échanges gazeux avec le maintien d'un pourcentage de saturation en oxygène supérieur à 75% [47]. Le couvercle est constitué d'un support en acier

inoxydable sur lequel sont montées successivement une couche en microfibrilles, une couche d'ePTFE (expanded PolyTetraFluoroEhylene) et enfin une couche en silicone de 8mm d'épaisseur (Figure 32A). Pour assurer un taux de remplacement de l'air suffisant, le diamètre des perforations de la couche en silicone a été optimisé [47]. La microplaque et le couvercle sont associés par l'application d'une force de 500N à l'aide d'un système de clamp approprié (Figure 32C), entraînant la compression de la couche de silicone par un facteur deux. Tous les puits se retrouvent ainsi isolés individuellement dans un environnement stérile et peuvent être considérés comme des mini-fermenteurs avec des propriétés similaires [48].

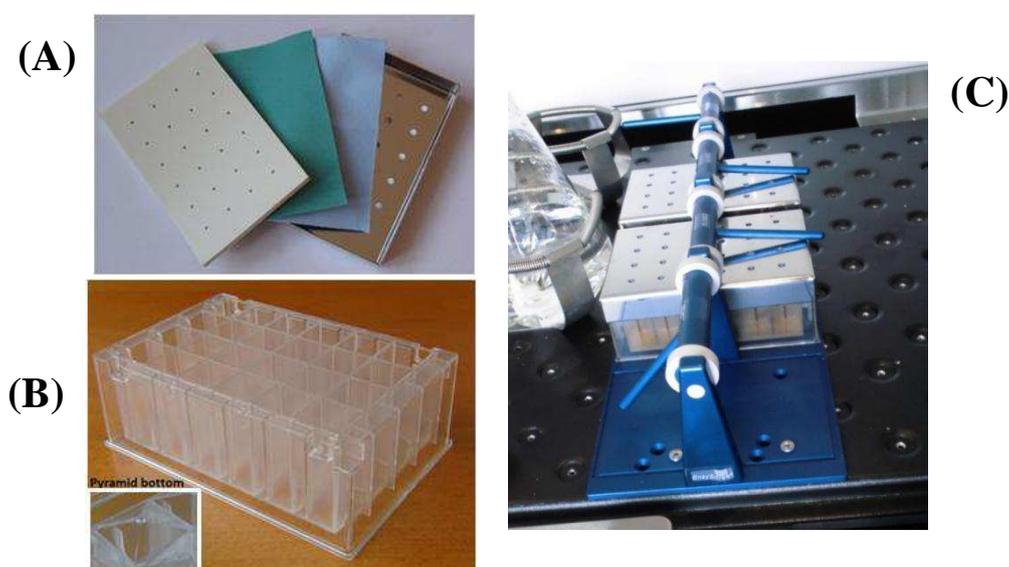


Figure 32. Différentes composantes du système Duetz® développé par EnzyScreen®. Différentes couches du couvercle (A) avec de gauche à droite, couche en silicone, ePTFE, microfibre et support en acier inoxydable ; microplaque 24 puits utilisée dans le cadre du projet (B); système de clamp (C).

Parmi la gamme proposée par EnzyScreen® [49], le choix du modèle de microplaque s'est basé sur le critère du taux de transfert de l'oxygène, paramètre primordial dans le cas de la levure aérobie *P. pastoris*. Des études ont démontré que le taux de transfert de l'oxygène dépend de plusieurs paramètres dont le volume de culture, la morphologie des puits de la microplaque, l'amplitude et la vitesse d'agitation [35,41,42,43] (Annexe 1).

En prenant en compte les contraintes techniques du laboratoire de MB Martillac (amplitude d'agitation maximum de 25mm), le meilleur taux de transfert d'oxygène reporté est de 39mmol O₂/L/h, obtenu avec une plaque de 24 puits carrés et un volume de culture de 2500µl [47,50,51]. C'est donc ce modèle qui a été retenu pour le projet (Figure 32B).

4. Matériel et méthode

4.1. Souche et plasmide

Au cours de ce projet, une souche recombinante X33(Mut⁺) de *Pichia pastoris* a été utilisée. Les levures ont été transformées par un plasmide pPICZ α de 3,6kb (Invitrogen, Etats-Unis) (Figure 33), dans lequel le gène codant pour la molécule d'intérêt a été inséré. Suite à l'intégration du plasmide dans le génome de *P. pastoris*, la protéine est exprimée sous le contrôle du promoteur pAOX1 inductible par le méthanol. Les molécules synthétisées sont exprimées sous forme de protéines de fusion avec un peptide C-terminal. Ce peptide-C terminal contient l'épitope *c-myc* qui permet la détection de la protéine de fusion avec un anticorps anti-*myc*, couplé ou non à l'enzyme HRP (Horse Radish Peroxidase). Le peptide-C terminal contient également une étiquette polyhistidine, qui pourrait être mise à profit pour la purification de la protéine de fusion par chélation sur une résine métallique (cuivre, zinc ou nickel).

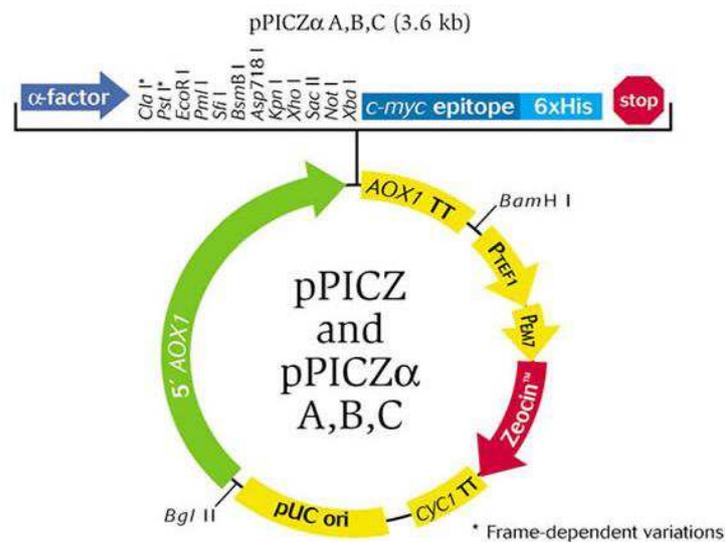


Figure 33. Carte des éléments du plasmide pPICZ α A, B et C [52]. 5' AOX1, région promotrice (942kb) du gène AOX1 inductible par le méthanol et permettant l'expression du gène d'intérêt à haut niveau ; α -factor, facteur α issu de *Saccharomyces cerevisiae* qui constitue un signal de sécrétion de la protéine recombinante dans le milieu de culture ; site de clonage multiple, lieu d'intégration du gène d'intérêt après action d'enzymes de restriction ; *c-myc epitope*, épitope *myc* pour la détection de la protéine d'intérêt ; 6xHis, étiquette polyhistidine facilitant la purification de la protéine d'intérêt ; AOX1 TT, site de terminaison de la transcription ; P_{TEF1}, promoteur issu de *Saccharomyces cerevisiae* qui induit l'expression du gène de résistance à la zéocine chez *Pichia* ; P_{EM7}, promoteur synthétique procaryote qui induit l'expression constitutive du gène de résistance à la zéocine chez *E.coli* ; Zeocin, gène de résistance pour la sélection des micro-organismes transformés par le plasmide ; Cyc1 TT, issu de *S. cerevisiae*, augmentant la stabilité du gène de résistance; pUC ori, permettant la réplication et la maintien du plasmide chez *E. coli*.

Les clones utilisés sont issus d'une banque de développement (PDCB) produite par MB, elle-même constituée à partir d'une banque de recherche (RCB) fournie par Ablynx (Zwijnaarde, Belgique), laboratoire à l'origine du développement de la molécule étudiée. Les clones sont conservés à -80°C dans des tubes de cryoconservation.

4.2. Molécule d'intérêt

La molécule d'intérêt est un Nanobody®, développé par le laboratoire Ablynx. Il s'agit de fragments d'anticorps à domaine unique (VHH) dérivant de la partie variable de la chaîne lourde d'un anticorps (cf. Chapitre I, §2.2.1.4 Ingénierie des anticorps).

4.3. Systèmes et milieux de culture

4.3.1. Systèmes de culture

4.3.1.1. Système Duetz

Le système de miniaturisation retenu dans le cadre de ce projet comprend des microplaques en polypropylène transparent avec 24 puits carrés (17x17x40mm) à fond pyramidal, représentant un volume total de 11mL pour un volume de culture recommandé de 3mL (Figure 32B). A usage unique, elles ont été stérilisées par irradiation aux rayons gamma.

4.3.1.2. Système DasGip®

Lors du changement d'échelle, la culture de *Pichia pastoris* a été réalisée avec le système Cellferm-pro® (DasGip®, Jülich, Allemagne, racheté en 2012 par la société Eppendorf) permettant de contrôler jusqu'à huit fermenteurs simultanément. Le système est équipé de plusieurs modules permettant de réguler les paramètres au cours de la culture (Figure 34). Le logiciel d'exploitation DASGIP CONTROL 4 permet, via le système DASGIP Control System, de transmettre des informations aux modules et ainsi de programmer, d'exécuter et d'automatiser certaines étapes de culture de manière indépendante pour les différents fermenteurs. Ce même logiciel permet d'extraire et de compiler l'ensemble des données acquises au cours de la culture en vue de leur analyse.

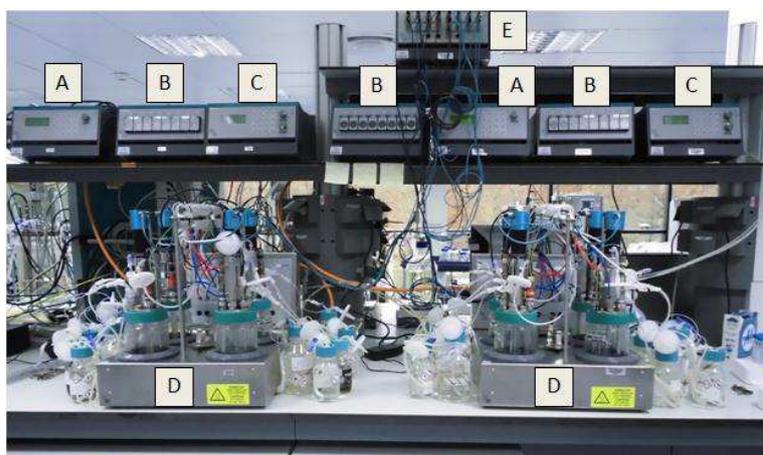


Figure 34. Système Cellferm-Pro® développé par DasGip. Module de contrôle de la température et de l'agitation (A); pompes péristaltiques contrôlant les débits d'alimentation (B); module de régulation de l'apport en gaz (C); support « Dasgip Bioblock » (D); module de mesure du pH et de la pression partielle en oxygène dissout (E).

Les fermenteurs sont agités à l'aide d'une turbine de type Rushton et sont caractérisés par un volume utile de un litre. La température à l'intérieur du bioréacteur est mesurée par une sonde thermique en platine RTD (Resistance Temperature Detector) (Eppendorf, Etats-Unis). La mesure du pH est réalisée grâce à une sonde pH 405-DPAS (Mettler Toledo, Suisse). La pression partielle en dioxygène dissout (pO_2) est mesurée par une sonde polarographique O_2 InPro® 6000 (Mettler-Toledo, Suisse) exprimant un pourcentage de saturation.

4.3.2. Milieux de culture et solutions

Les milieux YPD (Yeast extract Peptone, Dextrose) et CMP (Complex Medium for Production), respectivement utilisés au laboratoire pour l'amplification et pour la production en fermenteur, ont servi de référence en tant que milieux complexes au cours du projet. Le milieu YPD contient par litre les éléments suivants : extraits de levures, 10g ; peptone, 20g ; glucose ; 20g. Le pH du milieu est de $5,8 \pm 0,2$. Ce milieu est stérilisé par filtration sur filtre $0,22\mu m$. Le milieu CMP est un milieu interne au laboratoire et contient les éléments suivants: peptones, phosphate de potassium dihydrogène, sulfate d'ammonium et glycérol. Après autoclavage à $121^\circ C$ pendant 30 minutes sous une pression de $2,1 \pm 0,1$ bar, le milieu est complété avec les éléments suivants : sulfate de magnésium, calcium dichloride dihydrate, éléments traces CMP et biotine. La solution d'éléments traces CMP contient: acide sulfurique 95-98%, sulfate de fer heptahydraté, sulfate de zinc heptahydraté, sulfate de cuivre pentahydraté, molybdate de sodium dihydraté, acide borique et acide citrique. Pour la culture en fermenteur DasGip®, le milieu CMP est supplémenté de $0,5 mL/L$ d'une solution d'antimousse 204 (Sigma-Aldrich, Etats-Unis).

Dans le but de maîtriser davantage le milieu de culture, un milieu synthétique est évalué. En effet, bien que les milieux complexes soient une source de nutriments riches pour les levures, permettant d'atteindre des niveaux de densités cellulaires et de productivités élevés, les peptones et les extraits de levures qui les constituent représentent une matière première non contrôlable, dont la composition peut varier entre les différents lots. L'utilisation d'un milieu synthétique permet de s'affranchir de cette variabilité par une composition chimiquement définie. Le milieu retenu comme référence synthétique par rapport aux milieux complexes est le milieu BSM (Basal Salt Medium).

Ce milieu, servant de base au développement de la plateforme, est largement décrit dans la littérature pour la culture de *P. pastoris* [29,34,43]. Sa composition commune comprend les éléments suivants (BSM_{ref}) : glycérol, phosphate de potassium dihydrogène, dipotassium phosphate, chlorure de sodium, sulfate de magnésium heptahydraté, sulfate d'ammonium,

chlorure de calcium dihydraté, iodure de potassium, sulfate de potassium, solution d'éléments traces BSM et chlorure de cobalt hexahydraté. La solution d'éléments traces BSM contient: sulfate de cuivre pentahydraté, sulfate de manganèse hydraté, acide borique, sodium molybdate dihydraté, sulfate de fer heptahydraté, biotine, chlorure de zinc, acide sulfurique 95-98%. Après ajout des différents constituants et ajustement du pH à $5,60 \pm 0,2$, le milieu est stérilisé par filtration sur filtre $0,22 \mu\text{m}$.

Pour la simulation du procédé fed-batch en microplaque et pour les essais en DasGip®, deux solutions d'alimentation ont été utilisées : une alimentation complexe, constituée de peptones et de glycérol; et une alimentation synthétique comprenant du glycérol, du phosphate de potassium dihydrogène, du dipotassium phosphate, du chlorure de sodium et du sulfate d'ammonium. Dans le cadre du projet, les solutions d'alimentation ne sont pas développées et sont utilisées telles que décrit précédemment. Pour la phase d'induction, une solution de méthanol pur (Merck KGaA, Allemagne) est utilisée. Tout au long du procédé, le pH a été ajusté par addition de solutions d'ammoniaque (Merck KGaA, Allemagne).

4.4. Protocole expérimental

4.4.1. Paramètres communs pour la culture en microplaque

Les plaques à usage unique ont été recouvertes du couvercle adapté préalablement stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 30 minutes. Le système de culture est ensuite placé sur le système de clamp, lui-même monté sur une plaque d'agitation dont l'amplitude est de 25mm. L'ensemble est introduit dans un incubateur Innova44 (Eppendorf, Suisse) dont la température est réglée à 30°C avec une vitesse d'agitation de 300rpm. L'humidité dans l'incubateur est assurée par la présence d'une fiole contenant de l'eau purifiée.

Pour toutes les expériences en microplaques, aucune étape de pré-culture n'est réalisée avant l'inoculation. Les puits sont inoculés à une densité optique cible de 0,015 ($DO_{f600\text{nm}}$) à partir d'une ampoule de la banque PDCB de *P. pastoris*. Le volume à inoculer (V_i) est calculé à partir de la mesure de la densité optique à 600nm de l'ampoule diluée au 1/100 dans de l'eau purifiée ($DO_{i600\text{nm}}$) et du volume de culture dans le puits (V_f) (Equation 3).

Equation 3. Calcul du volume à inoculer pour les cultures en microplaque. Densité optique à 600nm de l'ampoule diluée au 1/100 ($DO_{i600\text{nm}}$) et de la cible à atteindre dans chaque puits ($DO_{f600\text{nm}}$) ; volume à prélever à partir de l'ampoule diluée au 1/100 (V_i); et volume de milieu de culture dans chaque puits avant inoculation (V_f).

$$V_i = \frac{DO_{f600\text{nm}} \times V_f}{DO_{i600\text{nm}}}$$

4.4.2. Mise en place du système de culture en microplaque

4.4.2.1. Evaluation de la croissance

Lors de la mise en place du nouveau système de culture, un procédé batch a été mis en œuvre pour caractériser la croissance de *Pichia pastoris*. Trois milieux différents sont testés, YPD, CMP et BSM_{ref}. Pour chaque milieu, deux plaques ont été inoculées à des temps différents. Le décalage dans le temps permet d'obtenir un maximum de points pour le suivi de la croissance qui est réalisé sur une durée de 50, 52 et 72 heures respectivement pour les milieux YPD, CMP et BSM_{ref}. De plus, l'utilisation de deux plaques permet de disposer d'un nombre total de puits plus important et ainsi de pallier à la contrainte de volume. En effet, pour la mesure du pH et des masses fraîches/sèches, un prélèvement de 2mL est nécessaire ; or le volume de culture dans les puits est de 3mL. Par conséquent, lorsque les puits sont prélevés pour effectuer ces analyses, ils sont entièrement vidés et ne peuvent plus être utilisés pour un suivi ultérieur, d'où la nécessité de disposer de plusieurs puits. Enfin, l'échantillonnage est réalisé de manière aléatoire pour vérifier que chaque puits possède les mêmes caractéristiques, quelque soit sa position sur la plaque.

4.4.2.2. Evaluation du procédé en microplaque

L'ensemble du procédé de fermentation a été évalué par la mise en œuvre d'une simulation des phases de fed-batch et d'induction. Pour que la simulation soit la plus représentative du procédé initial en fermenteur, les quantités de carbone et d'azote ont été adaptées, et le pH a été régulé à $5,7 \pm 0,2$ par l'ajout d'une solution d'ammoniaque. Le volume de base à additionner pour atteindre la valeur de consigne a été estimé grâce à une équation simplifiée. Suite à la mesure du pH d'un échantillon de culture, un volume déterminé de cet échantillon est alcalinisé par l'ajout de base. Connaissant le volume restant dans le puits, le volume de base à ajouter est estimé. Par cette méthode, l'ensemble des paramètres influençant le pH n'est pas pris en compte mais des contrôles préalables ont montré que la méthode était applicable dans le cadre de l'expérience.

Des puits de contrôles, c'est-à-dire sans régulation du pH, ont été ajoutés à l'expérience pour étudier l'influence de cette régulation. Le volume initial dans les puits est de 2,5mL, laissant une certaine marge pour effectuer les différents ajouts (base, alimentation, méthanol) sans dépasser de manière excessive la valeur de 3mL, recommandée comme volume de travail. Après une phase de batch sur le milieu CMP (ou BSM), une solution d'alimentation complexe (ou synthétique) a été ajoutée séquentiellement à différents temps de culture. Les volumes ajoutés ont été calculés en prenant en compte le volume initial des puits et en adaptant les débits appliqués à l'échelle du fermenteur (cf. Chapitre IV, §4.4.4. Evaluation de la productivité en système DasGip®).

La même méthode de calculs a été appliquée pour les additions séquentielles de méthanol au cours de l'induction. Afin de respecter une phase d'adaptation à la nouvelle source de carbone, des ajouts par palier ont été effectués, comme dans le procédé en fermenteur, avec l'adaptation des trois débits appliqués en fermenteur. Les ajouts ont été réalisés de manière assez espacée dans le temps pour ne pas se placer dans des conditions toxiques pour les levures. L'induction dure ici 53 heures, alors qu'elle se déroule sur 96 heures pour le procédé en fermenteur. Une analyse Biacore (cf. Chapitre IV, §4.5.3. Analyse des protéines) est réalisée sur le surnageant en fin de culture afin de déterminer le titre en protéine d'intérêt.

4.4.3. Développement du milieu de culture en microplaque pour la croissance de *Pichia pastoris*

La première étape du développement du milieu BSM a consisté à simplifier sa composition. Des plans d'expériences ont été établis pour évaluer l'impact individuel des différents éléments du milieu afin de ne conserver que les éléments essentiels à la croissance de *P. pastoris*. Ces plans sont détaillés dans le paragraphe 5.2. Développement du milieu de culture en microplaque, du présent chapitre (Tableau 20, Tableau 22). Suite à ce criblage haut débit, d'autres plans d'expériences ont été proposés afin d'optimiser les concentrations et pour rechercher les interactions potentielles entre certains éléments (Tableau 24).

Pour toutes les expériences du développement du milieu BSM, la croissance a été suivie sur 53 heures et les prélèvements ont été réalisés selon des temps de culture précis basés sur les premiers résultats obtenus lors de la culture en microplaque avec le milieu BSM_{ref}. Le milieu de référence est inclus dans tous les plans d'expérience pour un contrôle inter-plaques.

En vue de l'évaluation de chaque élément pris séparément, de nombreuses variantes du milieu BSM_{ref} ont dû être réalisées (Annexe 2). La méthode de préparation du milieu BSM instaurée au laboratoire n'étant pas adaptée à ce criblage (Figure 35), une nouvelle méthode a été instaurée : à une solution de base (BSM_{base}) comprenant le glycérol, le sulfate d'ammonium, le chlorure de calcium, le sulfate de magnésium, la biotine et le tampon phosphate, chaque élément trace a été ajouté sous forme de solution individuelle. La concentration de la solution de stockage de chaque élément est fonction de la concentration cible (concentration initiale dans le milieu BSM_{ref}), de la solubilité dans l'eau du composé ainsi que du volume de solution stock à ajouter au mélange.

Le volume final de l'ensemble des variantes du milieu BSM reste inchangé : si un élément est absent du mélange, il est remplacé par un volume équivalent d'eau purifiée et le contre-ion qui lui est associé (par exemple l'ion chlore dans le chlorure de zinc) n'est pas compensé. Ainsi, le volume de solution stock de chaque élément trace à ajouter est identique quelque soit le mélange à préparer afin d'atteindre la concentration finale.

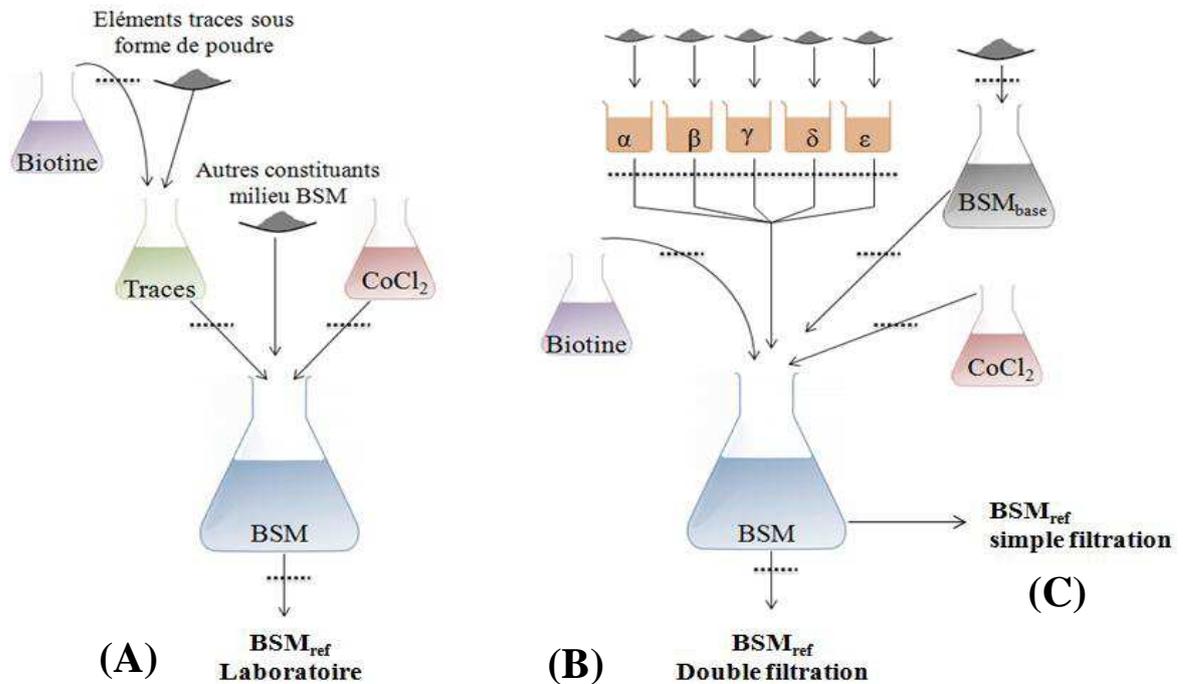


Figure 35. Méthodologie de préparation du milieu BSM. Méthode initiale instaurée au laboratoire (A) et nouvelle méthode pour le développement du milieu BSM (B et C). Les lignes discontinues représentent une étape de filtration sur filtre $0,22\mu\text{m}$. Traces : CuSO_4 , MnSO_4 , H_3BO_3 , MoNa_2SO_4 , FeSO_4 , ZnCl_2 supplémenté de biotine. Autres constituants : glycérol, sulfate d'ammonium, tampon phosphate, NaCl , MgSO_4 , CaCl_2 , KI , K_2SO_4 . α , β , γ , δ , ϵ : solution stock des éléments traces. BSM_{base} : glycérol, sulfate d'ammonium, tampon phosphate, MgSO_4 et CaCl_2 . Au cours des premiers essais de criblage, le mélange BSM est de nouveau filtré après mesure du pH et ajustement du volume dans un environnement non stérile (Méthode B). Par la suite (deuxième criblage, optimisation des concentrations et recherche d'interactions), puisque le pH ne nécessite pas d'ajustement, le mélange BSM est réalisé directement sous flux à partir des solutions filtrées et la filtration finale est supprimée (Méthode C).

Les différences dans la méthode de préparation du milieu BSM peuvent insérer un éventuel biais dans les résultats. Par conséquent, les analyses ne seront comparées qu'au sein d'une même expérience où les milieux ont été préparés de manière équivalente.

L'ensemble des résultats des plans d'expériences ont été analysés avec le logiciel de statistiques MiniTab® version 16.2.3 (MiniTab Inc, State College, Etats-Unis). Pour le traitement statistique des données, le logiciel calcule une régression linéaire, qui permet de mesurer l'effet des différents facteurs sur une réponse donnée (Equation 4).

Equation 4. Modélisation mathématique d'une régression linéaire simple. Y_i représente la variable aléatoire à expliquer (réponse quantitative), X_i la variable explicative (facteur), b_i et b_0 les coefficients du modèle et ε_i l'erreur.

$$Y_i = b_0 + b_i X_i + \varepsilon_i$$

Une analyse de la variance (ANOVA) permet ensuite de déterminer si l'effet est statistiquement significatif. Avant d'émettre des conclusions théoriques sur les effets ou les relations entre variables, il est important d'évaluer la qualité et la validité du modèle. La qualité statistique d'un modèle est quantifiée par le coefficient de détermination (R^2), qui correspond à la part de variabilité des réponses expliquée par le modèle. Ce coefficient varie entre 0 et 1. Un modèle statistique se basant sur des hypothèses, il faut également vérifier que les suppositions soient raisonnables. Par exemple, l'ANOVA suppose que les résidus sont indépendants et suivent une loi Normale. Pour analyser ces hypothèses, le logiciel MiniTab® calcule quatre graphiques (Figure 36A). Pour aller plus loin, un test de la Normalité (Kolmogorov-Smirnov par exemple) peut être effectué sur les valeurs résiduelles (Figure 36B).

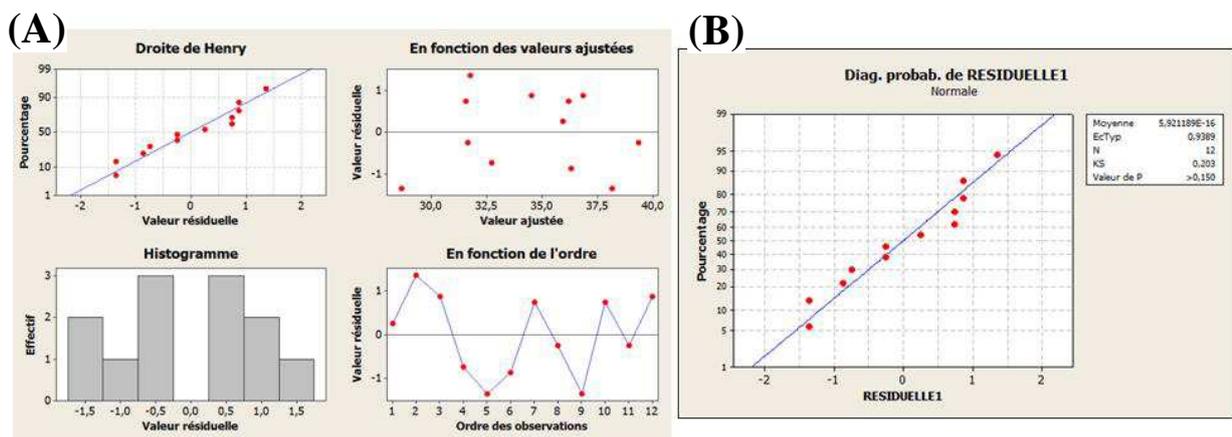


Figure 36. Vérification de la validité et de la qualité du modèle statistique calculé par le logiciel MiniTab®. Exemple de graphique quatre en un (A), avec l'analyse de la normalité à gauche et du caractère indépendant à droite. Exemple d'analyse de la Normalité sur les valeurs résiduelles selon la loi Kolmogorov-Smirnov (B). La p-value supérieure à 0,05 ($>0,150$) atteste que l'hypothèse nulle, à savoir que les données suivent une loi Normale, est acceptée.

4.4.4. Evaluation de la productivité en système DasGip®

La productivité a été évaluée par la mise en œuvre du procédé avec le système régulé DasGip®. Le plan d'expériences est détaillé dans le paragraphe 5.3. Evaluation de la productivité en système régulé (Tableau 25).

Avant inoculation des fermenteurs, une étape d'amplification est réalisée en FEM. Deux milieux d'amplification sont utilisés : le milieu YPD et le milieu BSM_{pos} (Annexe 2). Les erlenmeyers sont inoculés à une DO_{600nm} cible de 0,015 puis ils sont incubés à $30 \pm 2^\circ C$ sous une agitation de $200 \pm 20 rpm$ d'agitation pendant 32 heures pour le milieu BSM et 27 heures pour le

milieu YPD. A partir de ces FEM, 400mL de milieu CMP, BSM_{ref-} ou BSM_{pos} sont inoculés dans les DasGip® à une DO_{600nm} cible de 1,0.

Tout au long de la culture en fermenteur, chaque unité est réglée à une température de 30°C grâce au Dasgip Bioblock et le pH est ajusté à 5,6 par addition d'une solution d'ammoniaque. La pression partielle en dioxygène dissous est maintenue à 30% en cascade par l'agitation variant entre 400rpm et 1000rpm puis par le pourcentage d'oxygène dans le mélange gazeux qui varie entre 21 et 75%. Le débit de gaz est fixé à 60L/L/h pendant tout le procédé.

En fin de phase batch, lorsque les cellules ont consommé l'intégralité du glycérol du milieu initial, la source de carbone est épuisée : le métabolisme ralentit et les besoins en oxygène diminuent ce qui se traduit, entre autres, par une augmentation du taux d'oxygène dissous dans le milieu car le système de régulation ne répond pas instantanément. Lorsque ce taux dépasse 60%, le système est programmé pour déclencher les pompes d'alimentation : la phase de fed-batch débute. Les cultures sont alimentées en continu par une alimentation complexe ou synthétique avec un débit d'alimentation de 19,6mL/L/h ou de 23,0mL/L/h. A noter que l'alimentation synthétique est testée pour la première fois en fermenteur et qu'elle n'est pas développée dans le cadre de ce projet. L'adaptation du débit va permettre de délivrer la même quantité de glycérol par unité de temps, tant en milieu synthétique qu'en milieu complexe. En effet, la concentration en glycérol dans l'alimentation synthétique a été calculée par l'application d'un facteur déterminé en faisant le rapport en glycérol entre le milieu de culture et l'alimentation complexe. Le milieu BSM étant moins concentré que le milieu CMP, le titre en glycérol de l'alimentation synthétique est plus faible que celui de l'alimentation complexe.

L'objectif de cette phase de fed-batch est d'augmenter considérablement la quantité de biomasse avant l'induction. Lorsque la masse fraîche atteint une valeur de 400±20g/L, l'alimentation est stoppée manuellement, ce qui envoie un signal au système de contrôle qui déclenche alors l'alimentation en méthanol. Le méthanol étant toxique pour les levures au-delà de 5g/L, il est nécessaire de l'apporter en continu. Il est additionné par palier afin d'assurer une phase de transition : l'adaptation des levures à la nouvelle source de carbone est facilitée et les phénomènes d'inhibition dus à un apport excessif de méthanol sont limités. Pendant deux heures, un premier débit de 1,5mL/L/h est appliqué puis il est augmenté à 3,0mL/L/h pour les deux heures suivantes. Enfin, le débit est réglé à 5,5mL/L/h jusqu'à la fin de la phase d'induction. Après 96 heures sous méthanol, la culture est récoltée et centrifugée à 16000g pendant 30 minutes à 4°C. Des échantillons sont prélevés à partir du surnageant pour les analyses, et le reste du surnageant est conservé à -80°C alors que le culot cellulaire est éliminé.

L'échantillonnage pour l'évaluation de la croissance est réalisé tout au long de la culture par prélèvement du milieu de culture et des cellules, à intervalles réguliers, avec un point primordial avant l'induction. De plus, des échantillons de milieux de culture prélevés avant induction et 72 et 96 heures après induction, sont centrifugés afin d'estimer la quantité de protéines présentes dans le surnageant par analyse Biacore .

4.5. Analyse de la croissance et de la productivité

4.5.1. Mesures de biomasse

A partir d'un même prélèvement, différentes méthodes d'analyses sont effectuées pour le suivi de la croissance.

4.5.1.1. Densité optique

Le suivi de l'évolution de la densité optique à 600nm (DO_{600nm}) de la culture au cours du temps est effectué sur un spectrophotomètre Lambda bio & bio+ (Perkin Elmer, Etats-Unis). La mesure de DO_{600nm} est réalisée sur deux échantillons minimum, dilués si nécessaire dans de l'eau purifiée pour respecter la zone de linéarité de l'appareil (0,1 à 0,7). La valeur de DO_{600nm} de l'échantillon correspond à la moyenne des mesures. L'analyse de l'évolution de la DO_{600nm} en échelle logarithmique permet de déterminer les différentes phases de croissance et de calculer les temps de génération (T_g , exprimé en heure) à partir de la lecture graphique du taux de croissance (μ_{max} , exprimé en $heure^{-1}$) (Equation 5).

Equation 5. Calcul du temps de génération.

$$T_g (h) = \frac{\ln(2)}{\mu_{max} (h^{-1})}$$

4.5.1.2. Numération et viabilité sur milieu solide

La viabilité est estimée par étalement sur gélose Sabouraud (Merck KGaA, Allemagne) de l'échantillon dilué de dixième en dixième dans une solution de NaCl 0,9% stérile (Aguettant, France) de sorte à pouvoir distinguer des colonies isolées.

L'estimation des dilutions à étaler est basée sur la valeur de la DO_{600nm} . Une correspondance entre les valeurs et les dilutions a été préalablement établie au laboratoire par type de milieu (complexe ou synthétique) et sert d'outil indicateur.

Après incubation, au minimum 48 heures dans une étuve à 30°C, le nombre d'unités formant colonies (UFC) est estimé. Le résultat est exprimé sous forme du nombre d'UFC/mL de milieu de culture.

4.5.1.3. *Biomasse fraîche et sèche*

La mesure de la biomasse fraîche (masse fraîche, MF) et de la biomasse sèche (masse sèche, MS) est réalisée à partir d'un prélèvement, en doublon, de 1mL de milieu de culture. Après centrifugation à 13000rpm pendant 10 minutes (micro-centrifugeuse galaxy 7D Micro2416, VWR, Etats-Unis), le surnageant est éliminé et la masse du culot humide restant est calculée (MF).

A partir du culot humide, un dessiccateur MA100 (Sartorius, Allemagne) va permettre la mesure de la masse sèche selon un programme spécifique. Le culot humide est repris dans de l'eau purifiée en deux temps et la suspension cellulaire ainsi obtenue est déposée sur une coupelle pour permettre un séchage homogène. La dessiccation est réalisée par chauffage aux infrarouges de l'échantillon à 180°C, et s'arrête lorsque la variation de masse est inférieure à 1.10^{-4} g/seconde.

4.5.2. *Suivi du pH*

Pour le suivi hors-ligne, le pH est mesuré à l'aide d'une électrode Inlab® Expert Pro pH (Mettler-Toledo, Suisse) possédant une sonde de température intégrée. Au cours des étapes de développement du milieu, le nombre de puits par condition est réduit afin de limiter le nombre de plaques à utiliser et donc pour réduire le temps d'expérience. Par conséquent, la vidange des puits, réalisée pour disposer d'un volume suffisant de milieu pour la mesure du pH, n'est pas appropriée. Le pH a donc été estimé dans un premier temps par lecture du virement coloré de 100µL d'échantillon sur papier pH (Merck KGaA, Allemagne), avec des points de contrôles confirmés par la sonde précédemment citée ; puis il a été mesuré à l'aide d'une micro-électrode couplée à une sonde de température, InLab® Ultra Micro pH (Mettler-Toledo, Suisse), acquise au cours du projet.

4.5.3. *Analyse des protéines*

L'identification et la quantification des protéines est réalisée par le laboratoire de contrôle qualité du site de Martillac qui utilise la méthode Biacore (Figure 37). Cet appareil permet de détecter, en temps réel, les interactions entre les biomolécules et fournit des informations relatives à la spécificité de l'interaction, à la concentration de molécules initialement présentes et à la cinétique des phénomènes d'association/dissociation de la molécule avec son ligand. Il est constitué de trois éléments : un biocapteur, comprenant successivement un ligand, une couche de dextrane, une couche d'or et une plaque de verre ; un système de micro-canaux, apportant l'analyte sous forme de flux continu à la surface du biocapteur ; et un système de détection. La

technologie mise en œuvre se base sur le phénomène physique de résonance plasmonique de surface (SPR). Un faisceau de lumière polarisée monochromatique est envoyé sur une interface située entre deux milieux d'indices de réfraction différents. Par conséquent, une partie de la lumière incidente se réfléchit sur l'interface tandis que les autres rayons sont réfractés. La présence d'une fine couche d'or sur cette interface entraîne l'entrée en résonance des électrons du métal avec les photons du faisceau incident. Ce phénomène se traduit d'un point de vue énergétique, par une baisse de l'intensité du faisceau réfléchi au niveau d'un angle précis appelé angle de résonance. L'angle de résonance varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu : la détection par l'appareil est basée sur la capacité des molécules se liant spécifiquement à un ligand préalablement fixé sur l'interface, de modifier l'indice de réfraction, modifiant ainsi les conditions de résonance des ondes plasmoniques de surface. L'enregistrement de la variation de la position de l'angle de résonance permet de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées sur le biocapteur.

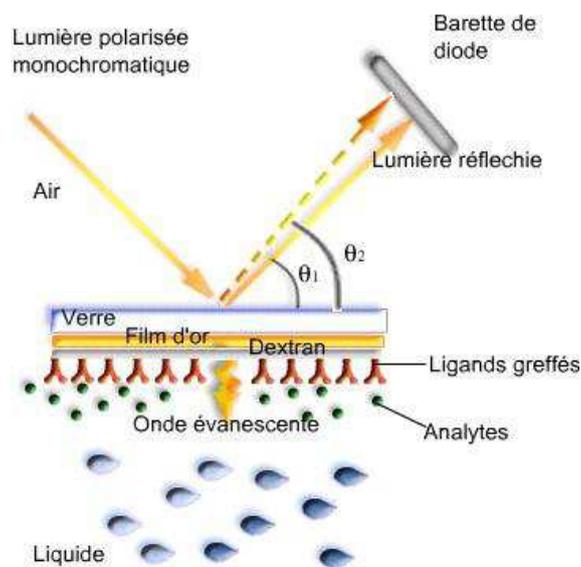


Figure 37. Principe de la technologie Biacore¹⁵.

Le biocapteur utilisé pour la reconnaissance du Nanobody® d'intérêt est la CM5 (CarboxyMéthyl 5) dont la couche de dextrane est couplée à la protéine A.

¹⁵ Extrait du cours « Principe de fonctionnement du Biacore », disponible sur la plateforme de cours en ligne Chamilo de Grenoble INP, depuis l'URL suivant : <http://chamilo2.grenet.fr/inp/> [Consulté le 02/04/2014].

5. Résultats

5.1. Mise en place du système de culture en microplaque

5.1.1. Evaluation de la croissance au cours d'une phase batch

Le premier objectif était de caractériser le système de culture en microplaque pour la levure *Pichia pastoris*. Pour évaluer la croissance, un procédé batch a été mis en œuvre. Des essais préliminaires avaient été menés en FEM pour évaluer l'étape d'amplification avec les milieux YPD et BSM_{ref} [53]. Les systèmes en FEM et en microplaques n'étant pas régulés, la comparaison des résultats permettra de valider, ou non, le modèle de culture en microplaque. En revanche, les résultats de ce système non régulé ne pourront être corrélés à 100% avec les données recueillies en fermenteur, où le pH et l'oxygénation du milieu sont ajustés pour maintenir les levures dans un environnement favorable à leur croissance.

Avec le milieu YPD, les profils obtenus en MP sont comparables aux courbes acquises au cours de l'amplification en FEM (Figure 38A). L'augmentation significative de la DO, après 13 heures de culture en FEM et après 18 heures en MP, associée à une diminution du pH, traduit une forte croissance de la biomasse. Le décalage dans le temps entre les deux systèmes peut s'expliquer par le fait qu'en FEM, les échanges gazeux, et donc le transfert en oxygène, sont favorisés du fait d'une plus grande surface d'échanges et de la présence de baffles sur les fioles, assurant une agitation optimale du milieu et provoquant des turbulences qui augmentent le coefficient de transfert de l'oxygène. La DO augmente jusqu'à un maximum de 79,5 en FEM et de 73,5 en MP, obtenus après 30 heures de culture. A ce même temps, l'écart d'UFC est inférieur à 1 unité log entre les deux systèmes, ce qui signifie que malgré une DO plus haute en FEM, le nombre de cellules vivantes est considéré équivalent. Au-delà de 28 heures de culture en FEM et de 30 heures en MP, le pH réaugmente puis se stabilise à une valeur de 5,25 en FEM et de 5,62 en MP. Cette réaugmentation du pH peut s'expliquer par un changement de métabolisme : le glycérol étant totalement consommé, les levures utilisent les acides aminés présents dans le milieu comme source de carbone, ce qui libère de l'ammoniaque. La stabilisation de la DO et du pH après 30 heures de culture sur une durée de 8 heures suggère que les cellules ont atteint un état stationnaire. Cette observation est confirmée par l'établissement d'une courbe de croissance en échelle logarithmique, où la pente devient nulle après 28 heures de culture en FEM et après 30 heures en MP (Figure 38B). A partir de cette même courbe, des temps de générations de 1h48 et de 1h41 ont été déduits (Equation 5) respectivement entre 6 et 20 heures en FEM et entre 14 et

22 heures en MP. En fin de batch, la DO montre un léger déclin et atteint une valeur finale de 72,5 en FEM et de 66,0 en MP.

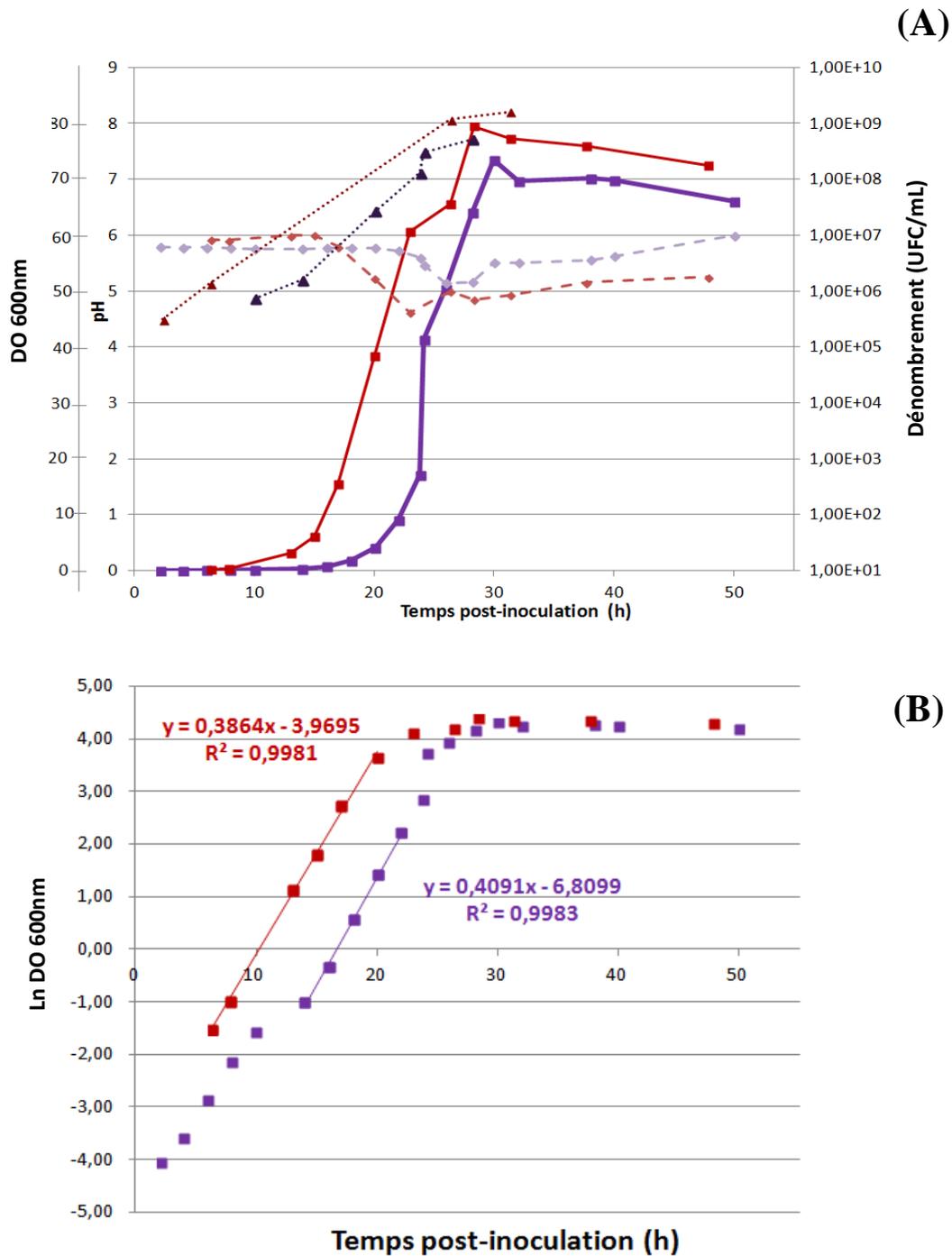


Figure 38. Comparaison des profils de croissance de *Pichia pastoris* obtenus avec le milieu YPD. Comparaison des profils en Flask ErlenMeyer (rouge) et microplaque (violet). Evolution de la densité optique à 600nm (■), du pH (◆), et de la viabilité (▲) (A). Comparaison des profils de DO en échelle logarithmique (B).

Avec le milieu BSM_{ref}, comme avec le milieu YPD, l'augmentation de la DO, et la diminution du pH en conséquence, est plus rapide avec le système en FEM et commence 17 heures après l'inoculation, soit 4 heures avant le système en MP (Figure 39A). Le maximum de densité optique est atteint après 40 heures pour les deux systèmes et vaut 61,4 et 37 respectivement pour la FEM et la MP. Bien que la culture en MP ait été réalisée sur une durée plus longue, la valeur finale de DO n'a pas atteint le maximum observé en FEM : elle s'est stabilisée à une valeur de 31. Toutefois, cette différence n'est pas observée au regard des masses fraîches qui montrent des profils similaires en FEM et en MP (Figure 39C). L'analyse des profils de croissance en échelle logarithmique a permis d'estimer les temps de générations en FEM et en MP qui sont de 2h29 et 2h10, respectivement calculés entre 8 et 28 heures et entre 6 et 30 heures (Figure 39B). L'analyse graphique de ces profils montre que les cellules ont atteint un état stationnaire après 37h30 en FEM et 39h en MP, ce qui est confirmé par la stabilisation du pH à une valeur de 2,7 en FEM, logiquement inférieur à la valeur de 3,1 obtenue en MP. Le fait que les valeurs de DO entre les systèmes en FEM et en MP ne soient plus en ligne après plusieurs heures de culture, alors que les profils de viabilité sont superposables (hormis le dernier point à 30 heures), peut résulter d'un changement de morphologie des levures ou bien d'une mortalité plus importante dans le cas des FEM. Il est à noter que, bien que la présence de baffles dans les erlenmeyers améliore les transferts en oxygène [54], ces structures induisent également un stress sur les cellules en culture. Afin d'investiguer cette dernière hypothèse, il serait intéressant de déterminer le nombre de cellules totales et de quantifier les débris cellulaires, par exemple par la mise en œuvre d'un comptage grâce à un cytomètre en flux.

La cohérence entre les données obtenues en microplaques et ceux en FEM montrent que les résultats des microplaques sont interprétables. Le nouveau système de culture en microplaque a été implémenté avec succès et est donc validé pour étudier la croissance de *P. pastoris* dans les conditions préalablement définies. Ne disposant pas de référence en système non régulé pour le milieu CMP, il est accepté que les résultats obtenus en microplaque avec ce milieu complexe soient exploitables au même titre que les données obtenues pour YPD et BSM_{ref}.

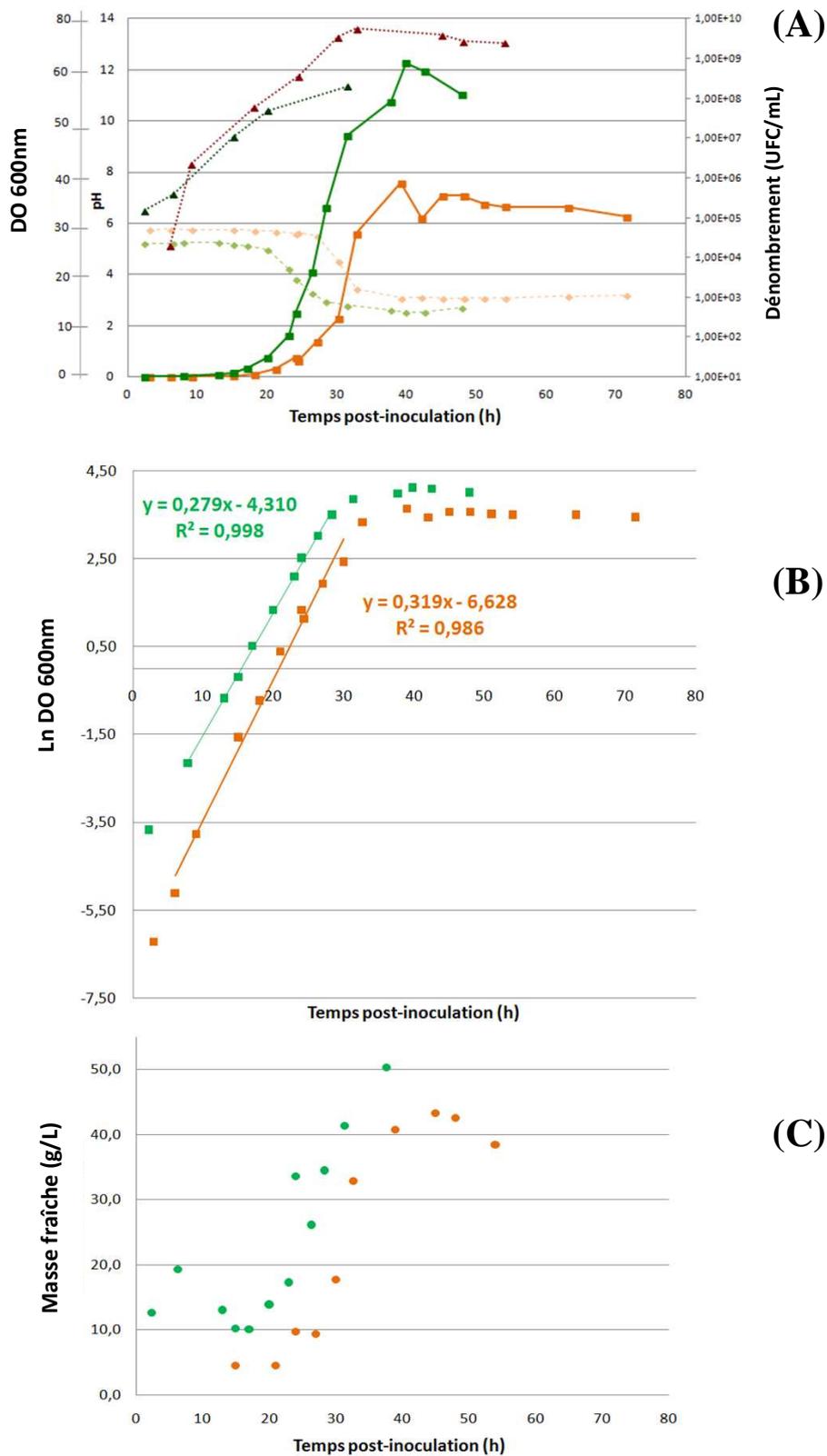


Figure 39. Comparaison des profils de croissance de *Pichia pastoris* obtenus avec le milieu BSM_{ref}. Comparaison des profils en Flask ErlenMeyer (vert) et microplaque (orange). Evolution de la DO à600nm (■), du pH (◆), et de la viabilité (▲) (A). Comparaison des profils de DO en échelle logarithmique. (B). Evolution de la masse fraîche (●) (C).

L'analyse des profils avec le milieu CMP montre une augmentation significative de la DO après 16 heures de culture, jusqu'à atteindre une valeur finale de 134 (Figure 40). Malgré une augmentation continue de la DO, le pH se stabilise à une valeur de 2,62 après 30 heures de culture. Le nombre d'UFC/mL se stabilise également à une valeur de $1,0 \cdot 10^9$. Cette tendance, qui suggère que la vitesse de division des levures diminue, est confirmée par la courbe en échelle logarithmique où un net ralentissement est observé après 30 heures de culture. Une hypothèse pour expliquer l'augmentation continue de la DO, serait la présence d'un phénomène de précipitation du milieu lorsque le pH diminue.

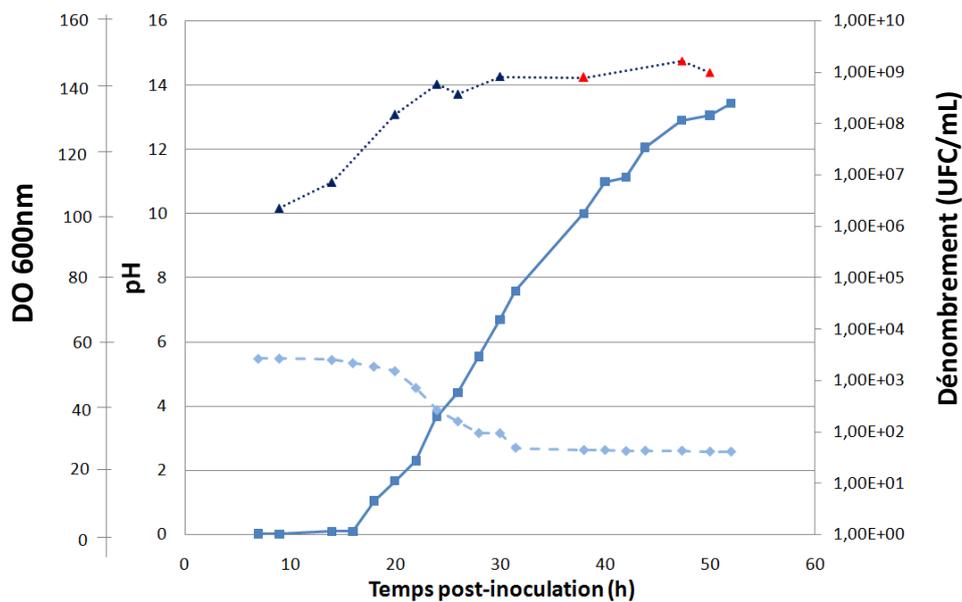


Figure 40. Profils de croissance obtenus en microplaque avec le milieu CMP. Evolution de la densité optique à 600nm (■), du pH (◆), et de la viabilité (▲). Les valeurs en rouge de viabilité correspondent à des estimations à partir de la lecture d'un seul étalement, contrairement aux autres où trois étalements différents, correspondant à trois dilutions différentes, étaient évalués.

Pour approfondir cette suggestion, un test simple a été réalisé sur le milieu CMP, où l'aspect visuel du milieu non inoculé a été évalué à l'œil nu dans un tube Falcon®. Initialement, à un pH de 5,7, un précipité est observable mais se dissout progressivement lorsque le pH est acidifié pour disparaître complètement à une valeur de pH de 3,4. Lorsque le pH est réaugmenté, le précipité réapparaît et devient persistant au-delà d'un pH de 5,9. Par conséquent, bien que l'essai n'ait pas été réalisé dans les mêmes conditions de température et d'agitation que l'expérience en microplaque, l'augmentation continue de la DO ne semble pas être expliquée par un phénomène de précipitation. Une autre hypothèse pour expliquer cette augmentation pourrait être un changement dans la morphologie des levures, impactant la mesure de la DO, ou bien le fait que les cellules continuent à croître à une vitesse plus lente, avec à un taux de mortalité plus important.

Après l'étude des résultats obtenus en microplaque pour chaque type de milieu pris séparément, les données ont été interprétées conjointement. Pour comparer les résultats, notamment en fin de culture, les valeurs de MF/MS ont été utilisées préférentiellement à la DO_{600nm} . Bien que toutes ces méthodes évaluent la quantité de biomasse totale, la mesure de la turbidité peut être impactée par le milieu lui-même. En effet, le signal de densité optique obtenu résulte de deux phénomènes : la diffusion, qui est fonction de la taille des particules mais aussi de l'absorption de la lumière qui est influencée par les particules insolubles et par la coloration du milieu. Comme les milieux contenant des peptones ou des extraits de levures (YPD et CMP) présentent un aspect foncé et sont opaques du fait de la présence de particules insolubles, un biais peut être inséré lors de la lecture de la DO, ce qui n'est pas le cas avec la mesure de la masse fraîche.

Concernant les deux milieux complexes, le temps de génération calculé en milieu CMP est de 1h52, légèrement supérieur à celui estimé en milieu YPD de 1h41 (Tableau 19). Les masses fraîches et sèches sont deux fois plus importantes en milieu CMP qu'en milieu YPD avec des valeurs atteignant 146g/L et 26,6g/L contre seulement 70g/L et 11g/L obtenus avec le milieu YPD. En fin de culture, le nombre d'UFC/mL est 1,5 fois supérieur en milieu CMP.

Tableau 19. Résultats de croissance obtenus lors de la mise en place du système de culture en microplaque avec les trois milieux YPD, CMP, et BSM_{ref}.

Milieu	DO _{600nm} max	DO _{600nm} finale	MF (g/L)	MS (g/L)	Viabilité finale (UFC/mL)	Temps de génération
YPD	73,5	66	70	11	$6,6 \cdot 10^8$	1h41
CMP	134	134	146	26,6	$1,0 \cdot 10^9$	1h52
BSM_{ref}	37,9	31,4	46	7,7	$4,7 \cdot 10^8$	2h10

Une hypothèse pour expliquer la différence observée est la composition des deux milieux. En effet, la source principale de carbone est différente : alors que le milieu YPD contient du glucose, le milieu CMP contient, lui, du glycérol. Bien que le glycérol ne donne lieu qu'à une molécule de pyruvate alors que le glucose en fournit deux, cette différence dans le bilan énergétique est balancée par une quantité en carbone apportée par le glycérol bien plus importante que la quantité fournie par le glucose (exprimée en C-mol/L). De plus, il a été démontré que la nature chimique différente de ces molécules avaient un impact sur les régulations métaboliques [55]. Un autre facteur à prendre en compte est la différence quantitative et qualitative des peptones apportées, pouvant être également assimilées comme source de carbone.

La comparaison entre les résultats obtenus en milieu synthétique et en milieux complexes montre des valeurs finales de biomasse totale inférieures avec le milieu de culture BSM_{ref}. La masse sèche finale est de 7,7g/L, soit 3,5 fois inférieure à la valeur obtenue avec le milieu CMP et la masse fraîche finale est de 46g/L, c'est-à-dire 3,1 fois inférieure à la valeur obtenue avec le milieu CMP. Ces valeurs plus faibles peuvent s'expliquer par le fait qu'avec un milieu synthétique, l'apport en nutriments se restreint à une source de carbone, d'azote, de phosphore et d'oligoéléments. Les micro-organismes peuvent donc se retrouver en état de carence vis-à-vis de certains éléments indispensables, engendrant un arrêt de la croissance. Au contraire, les milieux complexes permettent de couvrir l'ensemble des besoins nutritifs de la levure car ils contiennent des peptones, qui représentent une source d'acides aminés et de vitamines directement assimilables. De plus, non seulement les valeurs obtenues en milieu synthétique sont plus faibles, mais la vitesse de croissance est plus lente avec un temps de génération de 2h10, alors qu'avec les milieux complexes il est de 1h41 ou de 1h52. Cette différence peut également s'expliquer par la composition des milieux décrite précédemment : en milieu synthétique, la levure doit mettre en place de nombreux mécanismes pour synthétiser, à partir d'éléments simples, l'ensemble des composants cellulaires nécessaires à sa croissance, dont les protéines.

En parallèle de la caractérisation de la croissance de *P. pastoris*, le système lui-même a été évalué. Un échantillonnage aléatoire a permis de conclure que chaque puits est équivalent : quelque soit le puits prélevé sur une même plaque à un instant donné, les valeurs de DO et de MF/MS sont équivalentes (Figure 41A et B). De plus, il existe une bonne corrélation inter-plaques : les profils obtenus sur deux plaques inoculées à des temps différents s'alignent correctement par recouvrement (Figure 41C). Enfin, deux échantillons prélevés après le même temps de culture sur deux plaques différentes présentent des valeurs de suivi similaires.

A partir des résultats obtenus pour les trois milieux, il a été décidé de développer le milieu BSM_{ref}. Bien que la croissance observée soit plus lente en milieu BSM_{ref} et que les valeurs de biomasses soient plus faibles, le développement d'un milieu synthétique permet une meilleure maîtrise du procédé, notamment par la suppression de la variabilité induite par la présence de peptones ou d'extraits de levures, comme discuté précédemment.

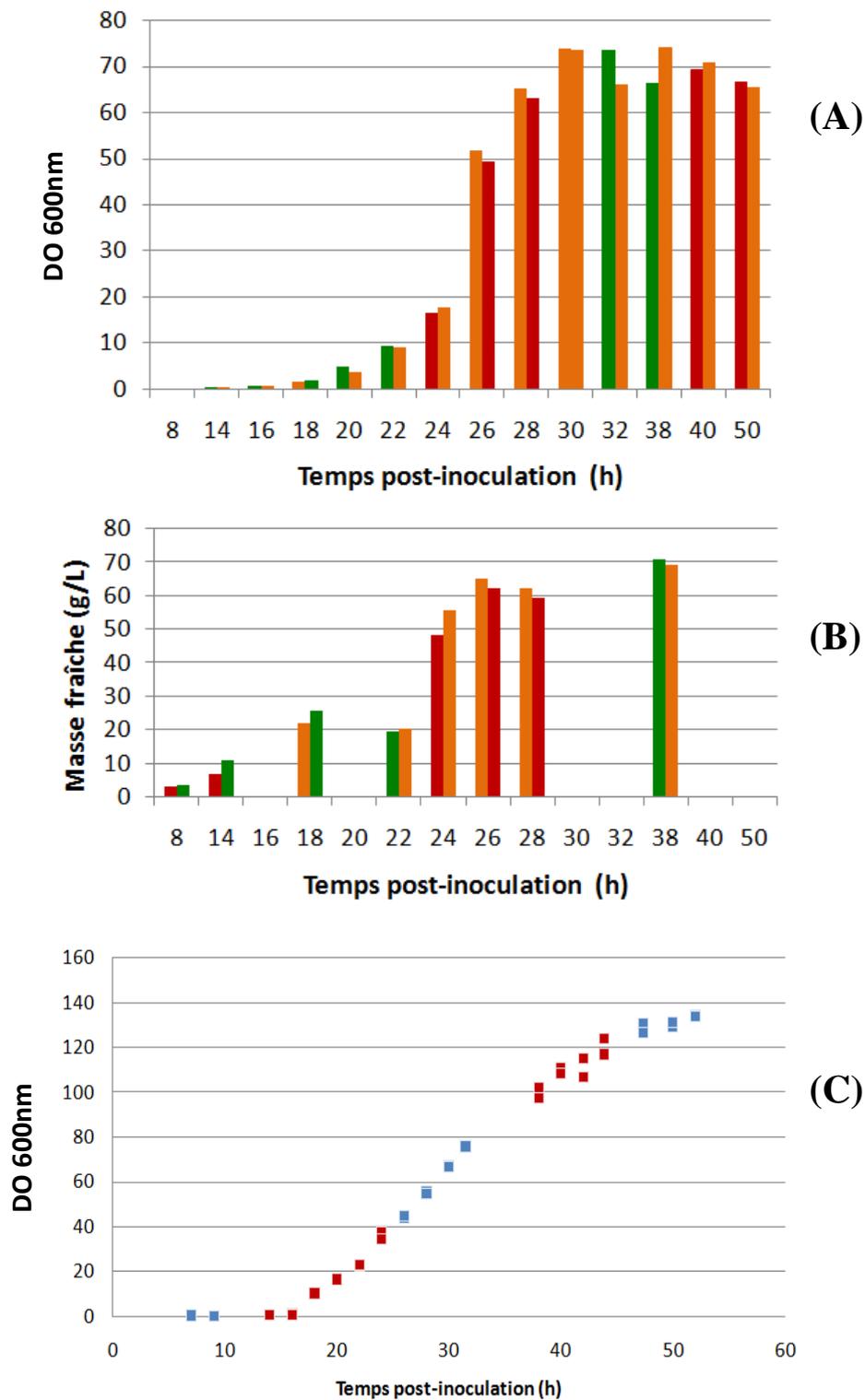


Figure 41. Evaluation du système de culture en microplaque. Evaluation de l'impact de la position du puits prélevé sur les mesures de biomasse par comparaison de deux puits prélevés aléatoirement, au centre (vert), en bordure (orange) ou sur les coins (rouge) de la plaque, à un instant donné (A et B). Recouvrement des profils de densité optique à partir de valeurs mesurées sur deux plaques différentes lors de la culture avec milieu CMP (plaque 1, bleu ; plaque 2, rouge) (C).

5.1.2. Simulation de l'ensemble du procédé en microplaque

Après avoir validé le modèle en microplaque pour la croissance en batch de *P. pastoris*, une simulation de l'ensemble du procédé a été mise en œuvre. L'objectif était de lever les limitations dues à la non-régulation du système (chute du pH, carence en substrat) au travers d'ajouts spécifiques, et d'estimer la productivité suite à l'induction par le méthanol.

Sur la phase de batch, la régulation du pH après 17 heures de culture du milieu CMP n'a présenté aucun bénéfice sur la croissance, comme le montre la comparaison du profil de densité optique avec le milieu CMP non régulé (Figure 42A). Par conséquent, pour les prochaines expériences mettant en œuvre un procédé batch en microplaque, aucun ajustement du pH n'a été réalisé par souci d'économie de temps et de ressources.

Au cours de la phase de fed-batch, l'addition de la solution d'alimentation sous forme séquentielle a permis de maintenir les cellules vivantes comme le montrent les diminutions successives du pH malgré les réajustements (Figure 42B et C). De plus, la biomasse fraîche est passée d'une valeur de 12,8g/L après le premier ajout de solution d'alimentation, à 78g/L avant induction avec le milieu BSM, et de 49,2g/L à 84g/L avec le milieu CMP, ce qui montre une accumulation de la biomasse. Il est à noter qu'en fermenteur, des masses fraîches de l'ordre de 400g/L sont trouvées en fin de fed-batch.

Après induction par le méthanol, les valeurs de DO se sont stabilisées et ont atteint une valeur de 125 avec le milieu CMP et de 117 avec le milieu BSM. L'analyse Biacore a permis de déterminer des concentrations en protéine d'intérêt de 11µg/L avec le milieu CMP et inférieures à 5µg/L avec le milieu BSM. Pour information, la productivité obtenue en fermenteur avec le milieu CMP s'étend de 3 à 6 g/L.

Les résultats de ce test ne sont pas probants : la méthodologie mise en œuvre ici ne permet pas d'induire l'expression du Nanobody® à un niveau acceptable. Dans l'état actuel, la capacité de la souche à produire la molécule d'intérêt ne peut être évaluée en microplaque avec ce protocole : la solution d'alimentation, la méthode de régulation du pH et/ou les stratégies d'alimentation et d'induction devront être développées et optimisées. Par exemple, une stratégie envisageable pour l'induction en microplaque consisterait à renouveler le milieu après centrifugation de la plaque [56].

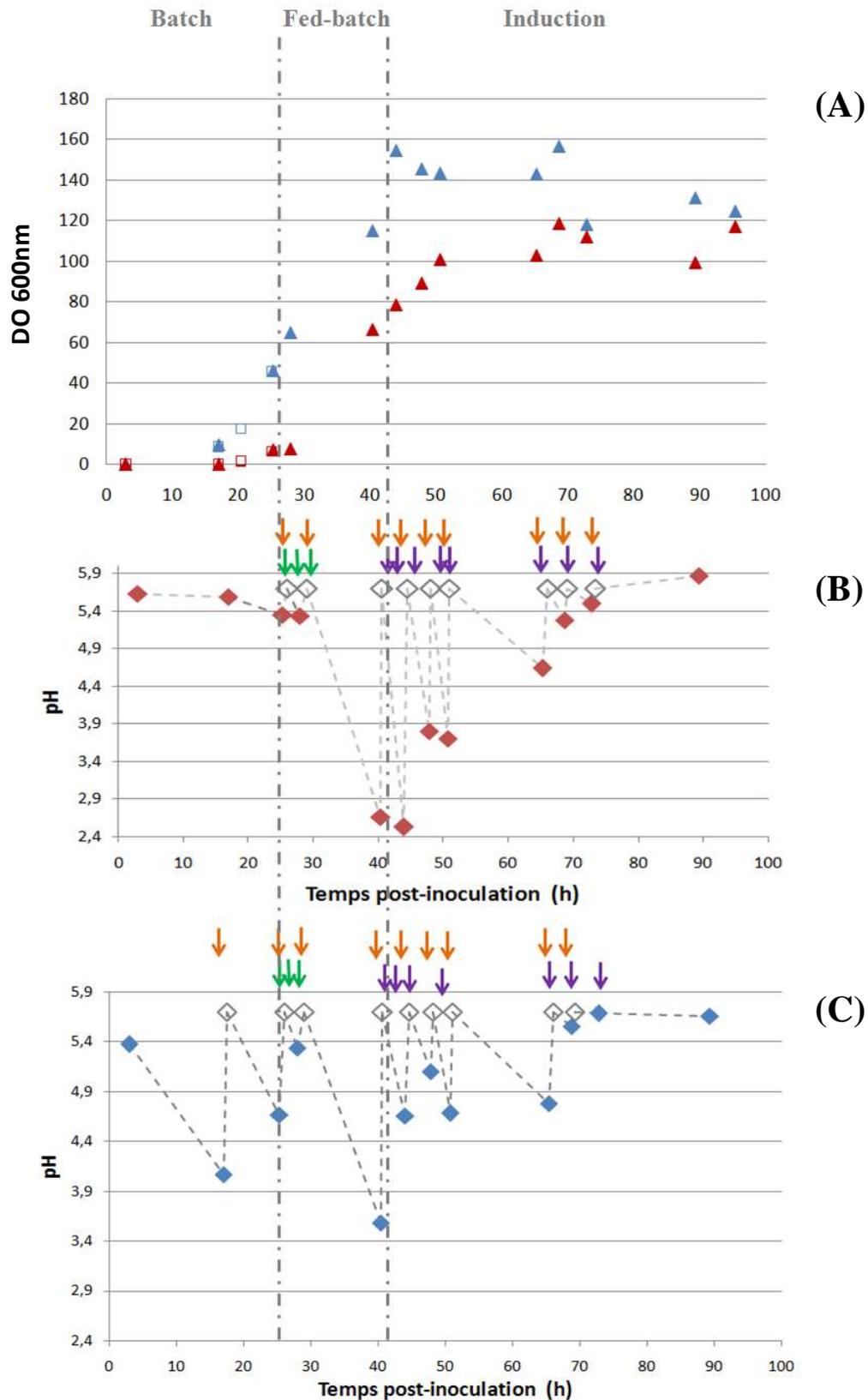


Figure 42. Evolution de la densité optique et du pH au cours de la simulation du procédé en microplaques. Milieu CMP (bleu) et milieu BSM (rouge). Evolution de la DO (A) des milieux non régulés (\square) et régulés (\blacktriangle). Evolution du pH avec le milieu BSM (B) et le milieu CMP (C). Une ligne discontinue facilite la lecture graphique des variations du pH entre les valeurs mesurées (\blacklozenge) et les valeurs théoriques après ajustements (confirmées par mesure du pH à l'aide d'une sonde en début de procédé) (\diamond). Les flèches représentent les ajouts de base (orange), de solution d'alimentation (vert) et de méthanol (violet).

5.2. Développement du milieu de culture en microplaque

L'optimisation du milieu de culture a consisté dans un premier temps à simplifier la composition du milieu synthétique BSM_{ref} afin de déterminer les éléments minimum essentiels à la croissance de *P. pastoris*.

Le milieu BSM_{ref} comprend au total dix huit éléments (Annexe 2) parmi lesquels certains sont indispensables à la croissance : le glycérol (source de carbone), le sulfate d'ammonium (source d'azote), le tampon phosphate (source de phosphate et système tampon du milieu) et la biotine (vitamine, essentielle pour la croissance). L'évaluation de l'impact des éléments restants, impliquant un nombre d'expériences trop important pour un premier criblage (plan factoriel complet 2^{13}), un choix arbitraire a été effectué pour réduire le nombre d'expériences et donc le temps global de l'essai. Il a été choisi de conserver dans le milieu le magnésium et le calcium en tant que macroéléments, car ceux-ci sont présents dans tous les milieux reportés dans la littérature. Pour réduire le nombre d'expériences, le choix des éléments à tester parmi les onze restants s'est fondé sur une étude bibliographique de différents milieux utilisés pour la croissance de *Pichia pastoris* [29,56,57,58], sur des recherches concernant le métabolisme de cette levure [59] et sur des préoccupations de sécurité, notamment pour limiter les produits CMR, tels que définis par la réglementation REACH (Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals). L'analyse de l'ensemble de ces données a permis de réduire à huit le nombre de composés du milieu BSM_{ref} à tester : NaCl, KI, K₂SO₄, CoCl₂, MnSO₄, H₃BO₃ et FeSO₄ (Annexe 3) ; les autres éléments traces, le cuivre, le zinc et le molybdate, sont conservés dans tous les milieux évalués.

Tableau 20. Matrice d'Hadamard pour le premier criblage et résultats expérimentaux correspondants aux différents milieux de culture. -1 : absence de l'élément, 1 : présence de l'élément. DO_{600nm}^f : densité optique en fin de culture, DO_{600nm}^{exp} : densité optique en fin de phase exponentielle (environ 30 heures après inoculation), Viab : viabilité exprimée en logarithme du nombre d'UFC/mL en fin de culture.

Exp	BSM CZM	NaCl (X ₁)	KI (X ₂)	K ₂ SO ₄ (X ₃)	CoCl ₂ (X ₄)	MnSO ₄ (X ₅)	H ₃ BO ₃ (X ₆)	H ₂ SO ₄ (X ₇)	FeSO ₄ (X ₈)	DO ^f 600nm	DO ^{exp} 600nm	Viab
1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	36,17	28,90	7,85
2	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	33,10	31,30	8,11
3	1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	37,70	32,50	8,13
4	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	31,97	25,40	8,13
5	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	36,77	35,60	8,29
6	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	35,43	28,80	8,18
7	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	36,93	33,30	8,34
8	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	31,37	34,05	8,21
9	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	27,27	23,20	8,13
10	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	32,30	27,55	8,15
11	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	39,07	33,75	8,46
12	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	35,37	27,95	8,42

La densité optique à 600nm, la masse fraîche et la viabilité ont été mesurées sur douze milieux différents selon une matrice d'Hadamard et les résultats correspondants sont présentés dans le Tableau 20. Les valeurs de masses fraîches ne sont pas renseignées car elles ont été extrapolées suite à une erreur de manipulation, et ne sont donc pas interprétables. Concernant la viabilité, la différence du nombre d'UFC/mL final est inférieure à 1 unité log dans les douze expériences considérées (Figure 43). En prenant en considération la variabilité intrinsèque de la méthode, il peut être déduit que la présence ou l'absence d'un élément trace, dans le milieu, n'influence pas de manière significative le nombre de cellules vivantes en fin de culture. Il est à noter que tout au long du projet, l'interprétation de la viabilité par étalement sur gélose Sabouraud du milieu de culture BSM a montré des limites : malgré une valeur croissante de la DO à 600nm, le nombre d'UFC ne semble pas dépasser un certain seuil. Par conséquent, ces interprétations ne seront pas prises en compte pour évaluer les écarts de croissance entre les différentes conditions mises en œuvre.

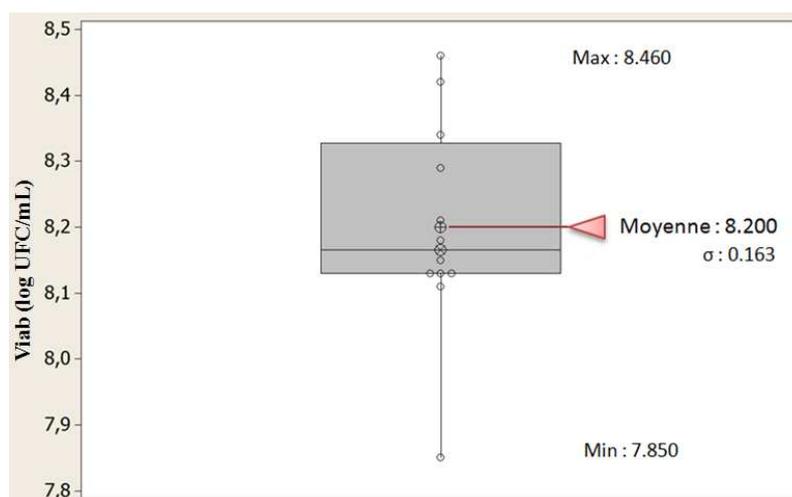


Figure 43. Boîte à moustaches présentant les valeurs statistiques descriptives de la viabilité (exprimée en logarithme du nombre d'UFC/mL) au cours du premier criblage.

Les valeurs de DO présentent, quant à elles, plus de variabilité. Pour approfondir cette observation, une analyse statistique des résultats a été réalisée. La régression calculée par le logiciel MiniTab® a permis de définir, pour chaque réponse considérée, la valeur des coefficients associés aux termes du modèle (Equation 6). La significativité de ces coefficients a ensuite été évaluée en appliquant un test de l'analyse de la variance (ANOVA) pour chaque réponse.

Equation 6. Modélisation de la réponse en fonction des huit facteurs du premier criblage, selon le plan matriciel prédéfini. Y représente la réponse, X_i représente le facteur évalué selon le plan défini (Tableau 20) et b_i représente les coefficients associés.

$$Y = b_0 + b_1 * X_1 + b_2 * X_2 + b_3 * X_3 + b_4 * X_4 + b_5 * X_5 + b_6 * X_6 + b_7 * X_7 + b_8 * X_8$$

Pour chaque ANOVA, la validité et la qualité du modèle ont été évaluées avant interprétation des résultats. Il a été démontré que les résidus suivent une loi Normale (p-value supérieure à 0,150 obtenue suite à un test de la Normalité de Kolmogorov-Smirnov sur les valeurs résiduelles) et que les valeurs du coefficient de détermination étaient suffisantes pour attester de la qualité du modèle (70,8 et 44,9%).

D'après les ANOVA, aucun élément ne possède simultanément un effet significatif sur les réponses analysées (Figure 44). Parmi les huit éléments testés, en considérant chaque réponse séparément, seul l'iodure de potassium a montré un effet significatif négatif sur la DO en fin de culture (p-value de 0,019). Cet impact est appuyé par la tendance négative observée sur la DO en fin de phase exponentielle. Par conséquent, il est admis que l'iodure de potassium possède un impact négatif sur la croissance de *P. pastoris* et sera donc supprimé dans les prochaines manipulations. Pour les sept autres éléments évalués, seules des tendances peuvent être dégagées.

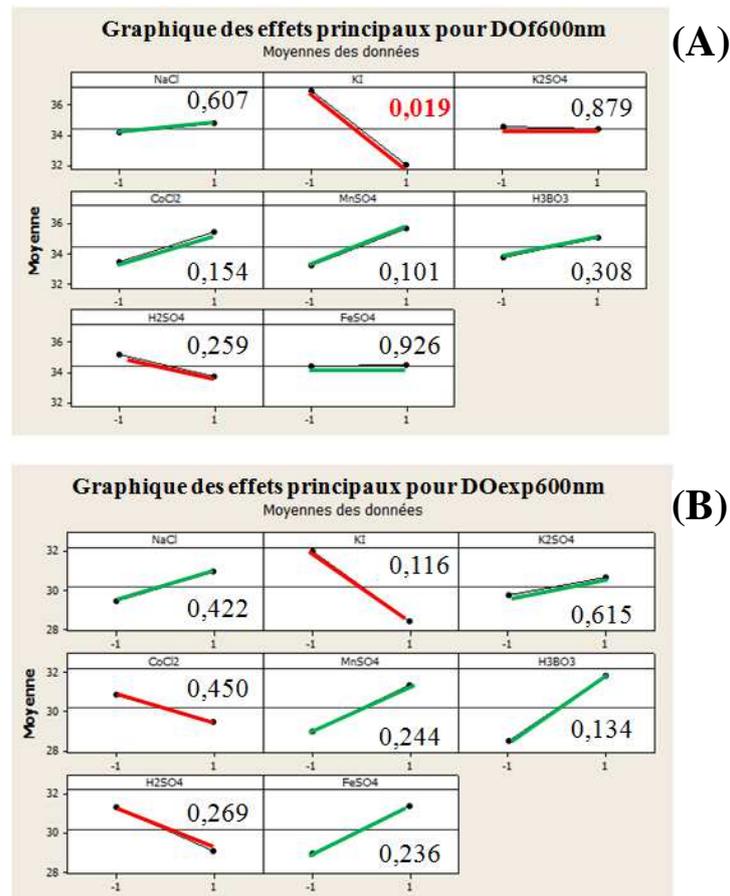


Figure 44. Représentation graphique des effets principaux des huit facteurs du premier criblage.

Effet principal observé avec la densité optique finale comme réponse (A) et la densité optique en fin de phase exponentielle (B). -1 : absence de l'élément considéré, +1 : présence de l'élément. Les couleurs des variations de chaque réponse correspondent aux coefficients calculés par régression : positifs (vert) ou négatifs (rouge). Les valeurs indiquées sur les graphiques correspondent aux p-values calculées par ANOVA (significatif si $< 0,05$).

Lors de ce premier test de criblage, l'expérience mettant en œuvre le milieu où tous les éléments testés sont retirés, donc un milieu ne contenant que le cuivre, le zinc et le molybdate comme micro-éléments (BSM_{CZM}) (Tableau 20, EXP12), a montré une valeur finale de DO_{600nm} de 35,4, soit 1,2 fois supérieure à la valeur obtenue avec le milieu de référence (Figure 45A). Un essai en FEM de 125mL a permis de confirmer ce résultat. Après 55 heures de culture, correspondant à la fin du procédé batch mis en œuvre en microplaque, la DO du milieu BSM_{CZM} est 1,5 fois supérieure à la DO du milieu de référence (Figure 45B). L'analyse des masses fraîches et sèches en FEM donnent des valeurs 1,2 et 1,7 fois plus élevées avec le milieu BSM_{CZM} par rapport au milieu de référence (Tableau 21). La viabilité évaluée à 55 heures est similaire quelque soit le milieu.

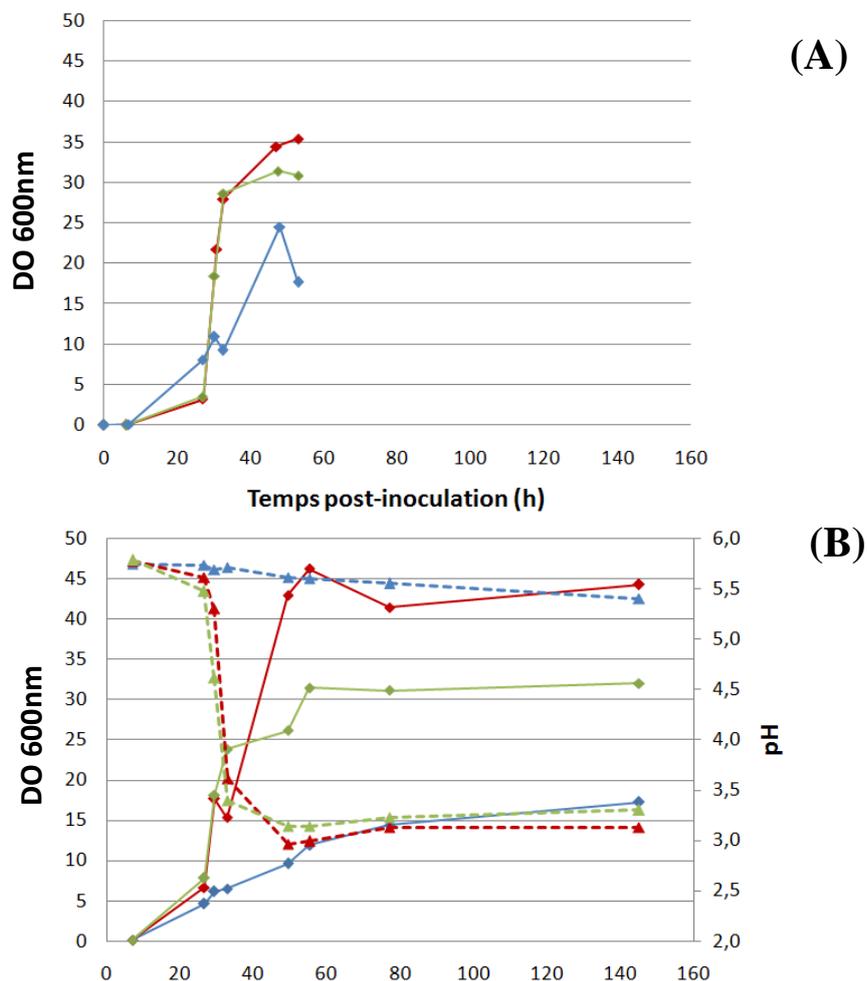


Figure 45. Evolution des profils de croissance en fonction de la composition du milieu BSM. Comparaison des profils obtenus en microplaques (A) et en Flask ErlenMeyer (B) avec les milieux BSM_{CZM} (rouge); BSM_{ref} (vert) ; BSM_{base} (bleu). Comparaison de la DO à 600nm (♦) et du pH (▲) au cours du temps.

Tableau 21. Résultats obtenus suite à des cultures en Flask ErlenMeyer 125mL. Comparaison des valeurs entre le milieu BSM_{CZM} et le milieu BSM_{ref}

Milieu	DO _{600nm}	MF (g/L)	MS (g/L)	Viabilité (UFC/mL)
BSM _{CZM}	46,2	44,1	8,9	2,84.10 ⁸
BSM _{ref}	31,4	37,8	5,3	2,42.10 ⁸

L'ensemble de ces résultats montrant que le profil de croissance du milieu BSM_{CZM} est légèrement supérieur à celui de la référence en fin de culture, un deuxième criblage a été réalisé afin d'évaluer les effets individuels de ces trois éléments. Un plan factoriel complet a été défini pour évaluer l'impact de ces trois facteurs sur la croissance de *P. pastoris* et les résultats correspondants sont présentés dans le Tableau 22.

Tableau 22. Matrice d'expériences pour le deuxième criblage et résultats expérimentaux selon les milieux de culture. -1 : absence de l'élément, 1 : présence de l'élément. DO_{600nm}^f : densité optique en fin de culture, DO_{600nm}^{exp} : densité optique en fin de phase exponentielle (environ 30 heures après inoculation), MF/MS ; masse fraîche/masse sèche.

Exp	CuSO ₄ (X ₉)	ZnCl ₂ (X ₁₀)	MoNa ₂ SO ₄ (X ₁₁)	DO _{600nm} ^{exp}	DO _{600nm} ^f	MF (g/L)	MS (g/L)
13	-1	1	1	22,70	33,07	41,00	4,85
14	1	-1	1	4,12	8,90	31,65	6,25
15	-1	-1	-1	11,28	11,38	21,95	4,50
16	1	1	1	22,95	39,17	60,15	8,05
17	1	1	-1	18,15	34,57	66,20	7,65
18	1	-1	-1	6,71	7,33	17,50	0,90
19	-1	1	-1	18,55	34,97	20,90	2,10
20	-1	-1	1	8,78	12,93	49,60	7,30

Visuellement, deux populations peuvent être distinguées en fin de culture (Figure 46). Cette observation est retrouvée dans l'analyse des profils de DO à 600nm (Figure 47). Après 33 heures de culture, une population présente une DO_{600nm} moyenne de 20,6±2,6 alors que l'autre possède une DO_{600nm} moyenne de 7,7±3,0. En fin de culture, la population haute présente une valeur de DO moyenne de 35,4, soit 3,5 fois plus élevée que celle de la population basse. Ces deux populations sont également retrouvées au regard des valeurs de MF et MS. La mise en parallèle de ces résultats avec le plan d'expériences révèle que les populations présentant des valeurs plus élevées correspondent aux milieux contenant du zinc, associé ou non au cuivre et/ou au molybdate.

Figure 46. Aspect des cultures en fin de phase batch suite au deuxième criblage en microplaque. Un même milieu est présent en triplicat selon une distribution en ligne. A l'œil nu, une croissance plus importante est présente pour les milieux des puits A.1-3 (EXP13), B.4-6 (EXP16), C.1-3 (EXP17) et D.1-3 (EXP19).

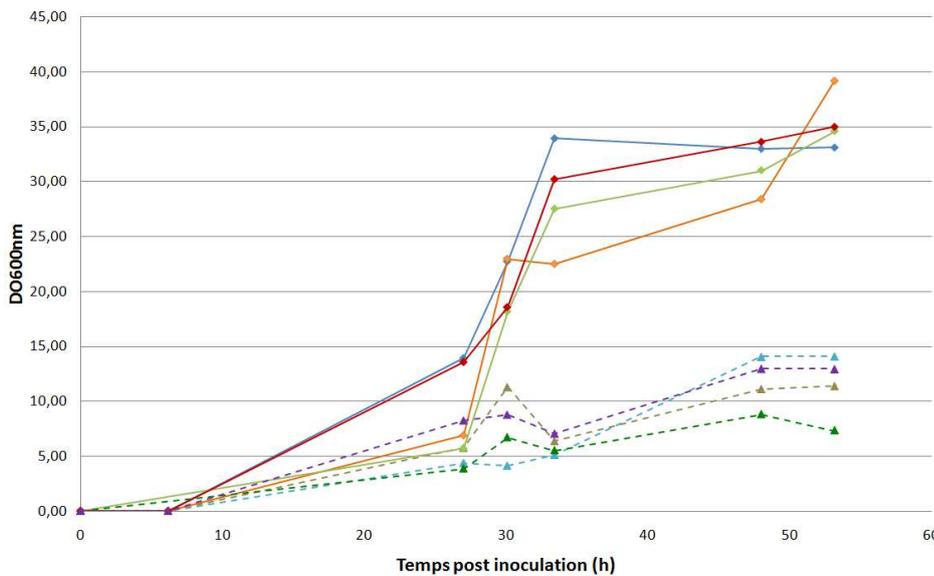
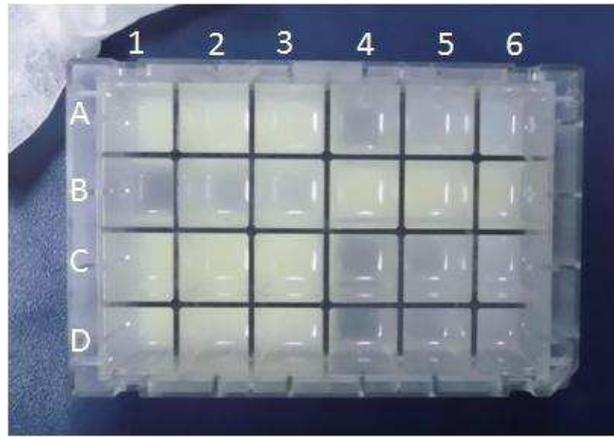


Figure 47. Suivi de la croissance au cours du deuxième criblage. DO à 600nm des milieux contenant (♦) ou non (▲) du zinc.

Pour approfondir ce résultat, une analyse statistique à l'aide du logiciel MiniTab® a été réalisée sur la DO_{600nm}^{exp} et sur la DO_{600nm}^f en prenant en considération le modèle mathématique suivant :

Équation 7. Modélisation de la réponse prenant en compte trois facteurs pour le second criblage. Y représente la réponse, X_i représente le facteur évalué selon le plan défini (Tableau 22) et b_i représente les coefficients associés.

$$Y = b_0 + b_9 * X_9 + b_{10} * X_{10} + b_{11} * X_{11}$$

Le logiciel a calculé par régression puis par ANOVA les coefficients associés aux termes de ce modèle et leur significativité. Les valeurs de R^2 (95,5% et 83,9%) indiquent que l'équation qui modélise l'expérience est capable de représenter le système dans le domaine expérimental défini. De plus, le test de la normalité de Kolmogorov-Smirnov sur les valeurs résiduelles montre que les résidus suivent une loi Normal. Parmi les trois facteurs évalués, seul le chlorure de zinc possède un effet significatif positif sur la DO, comme l'indiquent les p-values associées à ses coefficients (Figure 48).

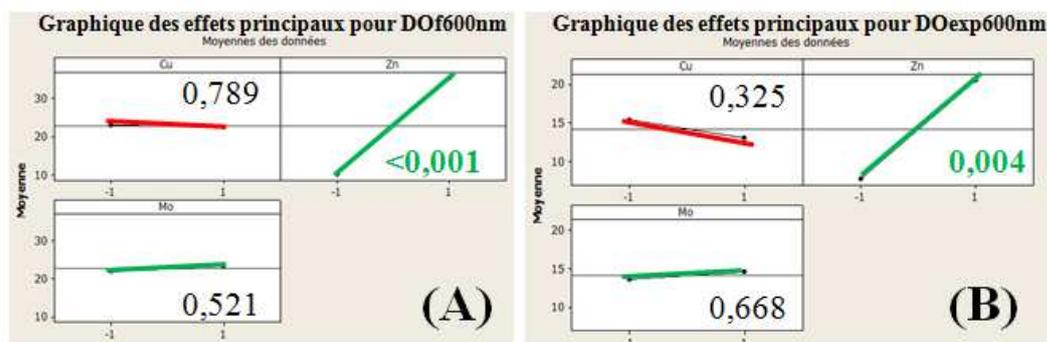


Figure 48. Représentation graphique des effets principaux du cuivre, du zinc et du molybdate. Effet principal observé sur la densité optique finale (A) et sur la densité optique en fin de phase exponentielle (B). -1 : absence de l'élément considéré, +1 : présence de l'élément. Les couleurs des variations de chaque réponse correspondent aux coefficients calculés par régression : positifs (vert) ou négatifs (rouge). Les valeurs indiquées sur les graphiques correspondent aux p-values calculées par ANOVA (significatif si $< 0,05$).

Puisque le zinc est le seul élément possédant un effet significatif positif sur la croissance de *P. pastoris*, il a été décidé d'évaluer l'impact d'une concentration plus élevée de cet élément dans le but d'optimiser la formation de biomasse au cours la phase de batch. Des concentrations deux, trois et quatre fois supérieures à la valeur retrouvée dans le milieu BSM_{ref}, selon un intervalle estimé à partir de données bibliographiques [60], ont été testées. La gamme de concentrations a été évaluée sur le milieu BSM_{base} supplémenté de zinc uniquement. De plus, les plans d'expériences préalablement établis pour le criblage des micro-éléments ne permettant pas d'évaluer les interactions, il a été décidé de tester cette gamme de concentrations sur le milieu BSM_{ref}, afin de ne pas négliger une éventuelle action combinée entre les éléments traces.

Enfin, il est intéressant de remarquer qu'à l'issue des deux criblages, quatre éléments possèdent une tendance positive sur la DO^{exp}_{600nm} (Figure 44 et Figure 48). Il s'agit du chlorure de sodium, de l'acide borique, du sulfate de fer et du sulfate de manganèse. Par conséquent, un milieu BSM_{base} supplémenté de ces quatre micro-éléments et de zinc, a été ajouté au plan d'expériences (milieu BSM_{pos}) dans l'optique de déceler une interaction éventuelle.

En absence de zinc, les valeurs de DO, de masses fraîches et de masses sèches indiquent que la croissance est moindre, que les autres éléments soient présents ou non (Figure 49). Le zinc est donc un élément essentiel pour observer une croissance significative de la levure. Lorsque le zinc est présent dans le milieu (BSM_{base} ou BSM_{ref}), le logiciel MiniTab® n'a pas décelé de différence significative entre les résultats obtenus avec les différentes concentrations. La gamme de concentrations testées n'ayant pas permis de distinguer de différences dans le comportement de croissance de la levure, la concentration du milieu de BSM_{ref} est retenue comme minimum suffisant pour la suite des expériences.

Lorsque le zinc est associé à d'autres éléments traces, les résultats de DO, de masse fraîche et de masse sèche sont supérieurs (Figure 49). De plus, le milieu contenant l'ensemble des éléments (BSM_{ref^-}) et le milieu contenant uniquement les éléments « positifs » (BSM_{pos}) présentent des valeurs de croissance similaires (Tableau 23). Par conséquent, une action combinée est suspectée entre le zinc et un ou plusieurs des autres éléments du milieu BSM_{pos} . A l'issue du criblage, le milieu BSM_{pos} a été défini comme milieu minimum.

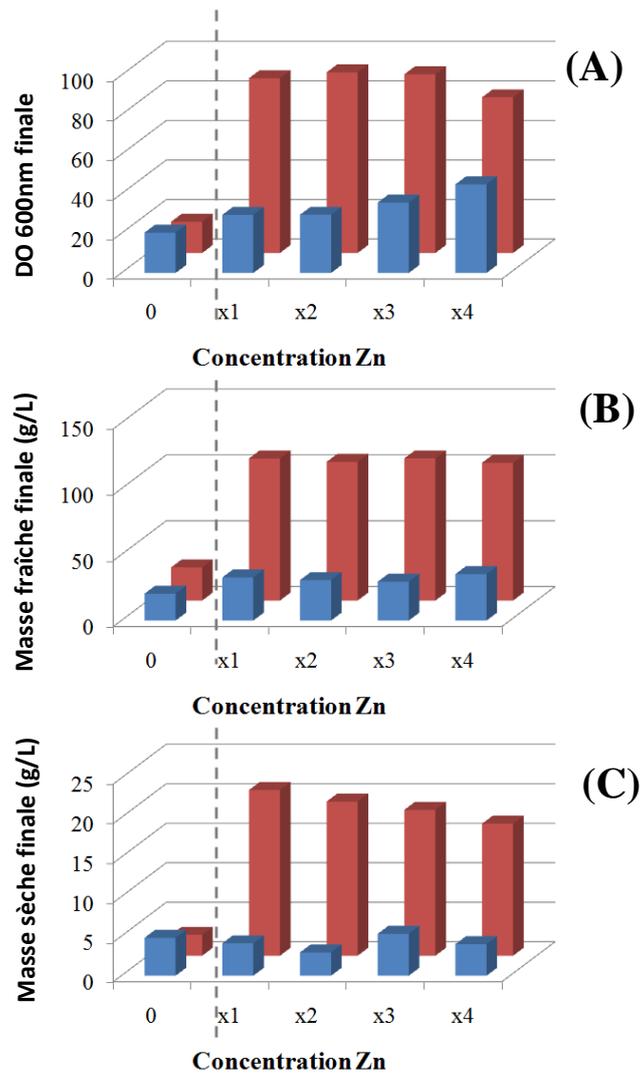


Figure 49. Valeurs de biomasse obtenues au cours de l'évaluation de la concentration en zinc. Densité optique finale à 600nm (A), masse fraîche (B) et masse sèche (C) pour le milieu BSM_{base} supplémenté de zinc (bleu) et pour le milieu BSM_{ref^-} (rouge).

Tableau 23. Comparaison des valeurs obtenues entre le milieu BSM_{pos} et le milieu BSM_{ref^-} .

	DO_{600nm}^f	DO_{600nm}^{exp}	MF (g/L)	MS (g/L)
BSM_{pos}	88,6	29,1	92,6	15,1
BSM_{ref^-}	88,4	31,5	107,8	21,0

Enfin, il est à noter que les valeurs finales de DO_{600nm}^f sont élevées lorsque les éléments traces sont présents, supérieures à 80, même pour la référence (concentration en zinc x1) qui avait présenté une densité optique finale de l'ordre de 30 dans les précédents essais. Les valeurs de pH, de MF et de MS sont en corrélation : plus la valeur de la DO_{600nm} est haute, plus le pH est bas et plus les valeurs de MF/MS sont élevées. Il a été relevé que la méthode de préparation avait changé pour ce test, pouvant expliquer en partie la différence observée (Figure 35). Cette hypothèse a été investiguée et les résultats sont discutés à la fin de ce chapitre.

Puisque les conditions mises en œuvre dans l'expérience ont été préparées selon la même méthode, les résultats obtenus sont comparables entre eux et les conclusions précédemment citées sont recevables.

Afin d'identifier l'interaction, un plan factoriel complet a été établi (Tableau 24).

Tableau 24. Matrice d'expériences pour l'étude des interactions en microplaque. -1 : absence de l'élément, 1 : présence de l'élément. DO_{600nm}^f : densité optique en fin de culture, MF/MS ; masse fraîche/masse sèche.

N° EXP	BSM _{base}	ZnCl ₂	FeSO ₄	MnSO ₄	H ₃ BO ₃	DO_{600nm}^f	MF ^f	MS ^f
40	1	1	-1	1	1	27,15	26,10	4,05
41	1	1	-1	-1	1	26,05	22,80	2,95
42	1	1	1	-1	1	107,30	64,75	11,30
43	1	-1	-1	-1	1	11,26	16,40	1,95
44	1	1	1	1	1	98,15	72,85	14,95
45	1	-1	1	1	1	14,20	8,55	1,20
46	1	1	-1	-1	-1	27,45	22,35	3,00
47	1	-1	-1	-1	-1	12,82	11,65	1,60
48	1	1	-1	1	-1	28,50	24,40	2,50
49	1	-1	1	1	-1	12,85	12,55	1,20
50	1	-1	1	-1	-1	13,97	12,95	2,10
51	1	-1	1	-1	1	11,88	17,65	1,70
52	1	1	1	1	-1	111,50	88,80	15,20
53	1	-1	-1	1	1	17,24	10,20	0,85
54	1	-1	-1	1	-1	16,85	13,65	2,20
55	1	1	1	-1	-1	92,00	66,65	15,00

L'observation des profils de densité optique permet de distinguer trois types de populations (Figure 50A): une première population avec une DO_{600nm}^f supérieure à 80, une deuxième avec une valeur de l'ordre de 30 et enfin une dernière avec une DO avoisinant une valeur de 15. En mettant ces résultats en correspondance avec le plan d'expériences, il apparaît que les valeurs les plus élevées sont retrouvées pour des milieux contenant du fer et du zinc, plus ou moins le bore et/ou le manganèse. La population intermédiaire correspond à un milieu contenant du zinc mais pas de fer et les milieux de la population basse ne contiennent pas de zinc. Ces trois populations sont retrouvées dans les mesures des masses fraîches et sèches (Figure 50B et C).

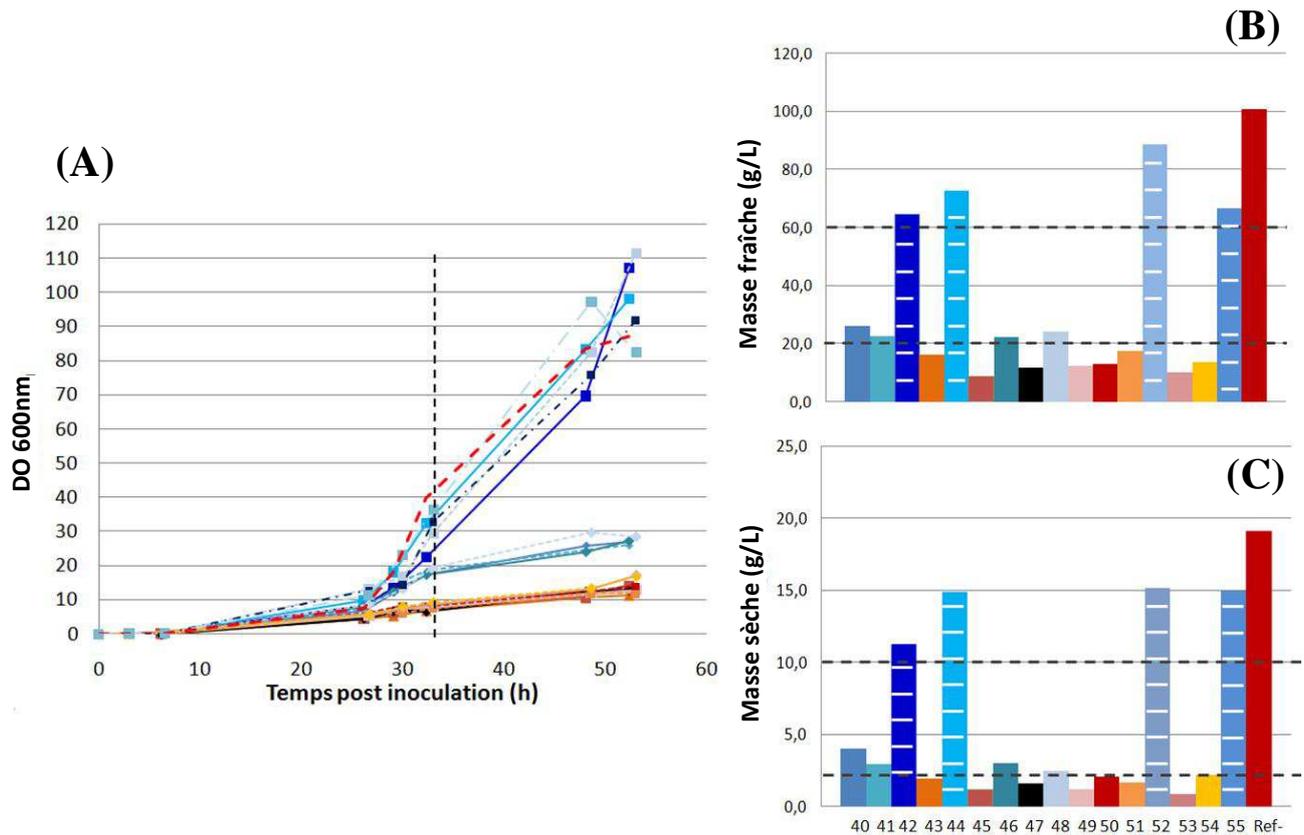


Figure 50. Suivi de la croissance au cours de l'évaluation des interactions potentielles. Profils de densité optique (A) avec les milieux contenant du zinc (bleu), les milieux contenant du fer (-■-) et le milieu BSM_{ref-} (ligne discontinue rouge) ; valeurs finales de MF (B) et de MS (C) avec les milieux contenant du zinc (bleu), les milieux contenant du fer (hachuré) et le milieu BSM_{ref-} (rouge).

Une analyse statistique par le logiciel MiniTab® a permis de calculer les diagrammes des interactions entre les éléments selon différentes réponses (Figure 51). L'analyse ANOVA a mis en évidence une interaction significative entre le fer et le zinc, avec des p-values inférieures à 0,002 quelque soit la réponse considérée (DO_{600nm}^f , DO_{600nm}^{exp} , MF ou MS). Aucune autre interaction significative n'a été trouvée.

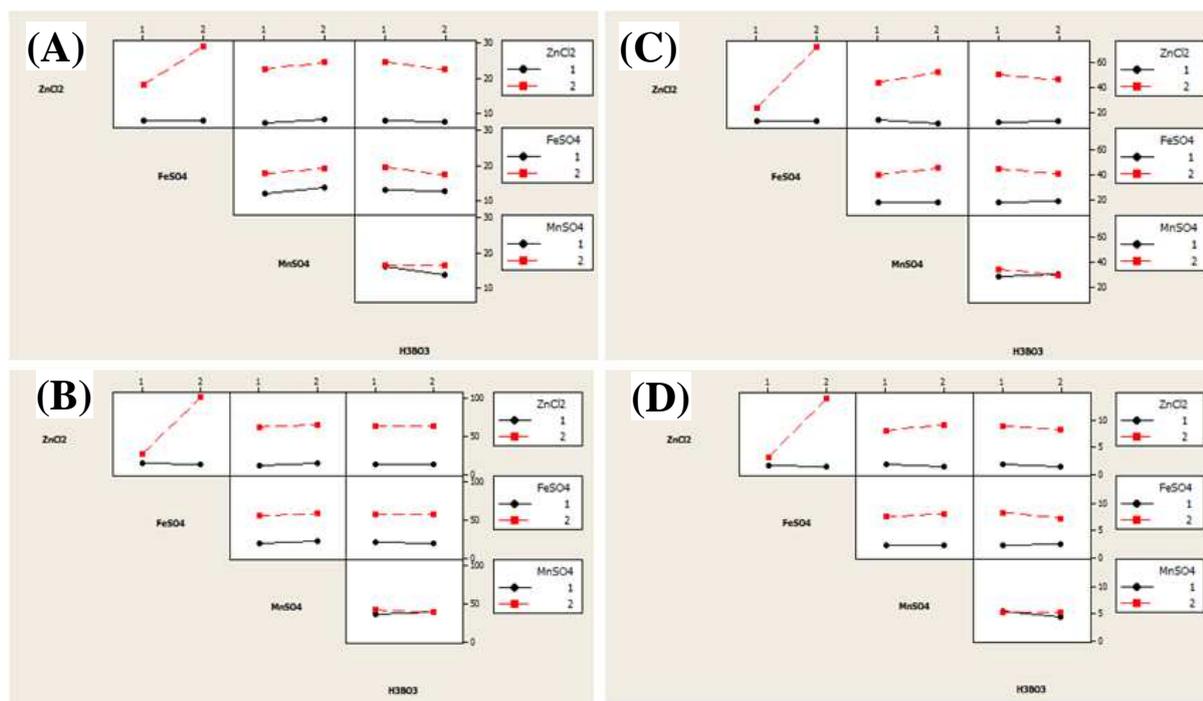


Figure 51. Diagrammes des interactions entre le zinc, le fer, le bore et le manganèse. 1 : absence, 2 : présence. Diagramme selon les différentes réponses envisagées : DO_{600nm}^{exp} (A), DO_{600nm}^f (B), MF^f (C), MS^f (D).

Pour les dernières expériences, des valeurs finales de DO_{600nm} supérieures à 100 ont été mesurées, y compris pour la référence dont la DO finale était de l'ordre de 30 dans les premiers tests. L'une des hypothèses avancées était l'influence de la méthode de préparation du milieu, notamment l'étape de filtration finale du milieu BSM (Figure 35). Afin d'investiguer cette supposition, un essai a été mis en œuvre en FEM pour disposer d'un plus grand volume et ainsi ne pas être limité dans les prélèvements. Les méthodes B et C, impliquant respectivement deux ou une étape de filtration du mélange BSM, ont été évaluées au sein d'une même expérience. Comme en microplaque, une différence significative a été observée : une valeur finale de 85 a été obtenue après 53 heures de culture avec le milieu simplement filtré et seulement de 32 pour le milieu doublement filtré (Figure 52). Les valeurs de masses fraîches et sèches sont cohérentes avec la DO_{600nm} : le milieu simplement filtré présente une MF de 66 g/L et une MS de 18 g/L alors que le milieu doublement filtré présente des valeurs de 37 g/L et de 6 g/L (Figure 53A). En revanche, il n'y a pas de différence significative entre les valeurs d'UFC/mL lues avec les deux méthodes.

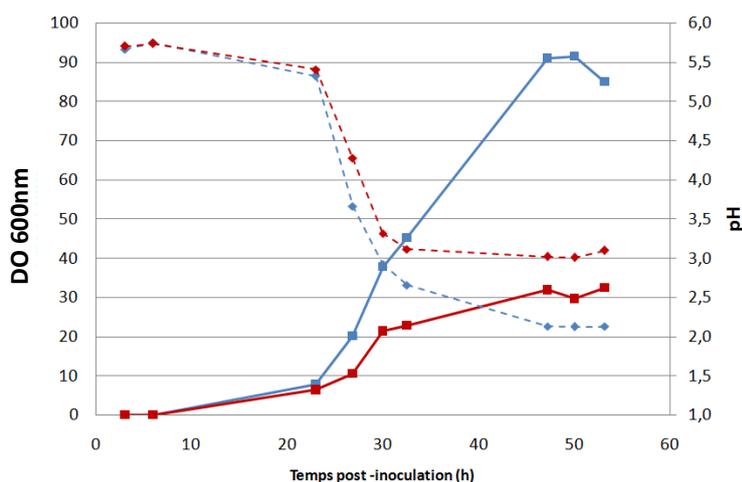


Figure 52. Evaluation de l'influence de la méthode de préparation du milieu BSM sur les profils de croissance. Evolution de la DO à 600nm (■) et du pH (◆) au cours du temps pour le milieu BSM simplement filtré (Figure 35C) (bleu) et le milieu doublement filtré (Figure 35B) (rouge).

En parallèle de ces essais, deux FEM contenant le milieu simplement filtré non inoculé ont été incubés. Le pH de l'un d'eux a été ajusté à 2,7 après 30 heures de culture. Le milieu non inoculé mais ajusté présente un aspect limpide en fin de culture et aucun culot n'est visible après centrifugation contrairement au milieu non ajusté (Figure 53B). La différence de densité optique observée en fin de culture ne peut donc pas s'expliquer par le phénomène de précipitation seul. Par conséquent, à un instant donné, la biomasse totale est plus importante lorsqu'une seule filtration est réalisée au moment de la préparation, mais il y a le même nombre de cellules vivantes et donc potentiellement autant de cellules capables de produire la molécule d'intérêt.

Cette expérience soulève néanmoins un problème d'une éventuelle adsorption d'un élément (non identifié ici) sur la membrane lors de la double filtration du milieu.

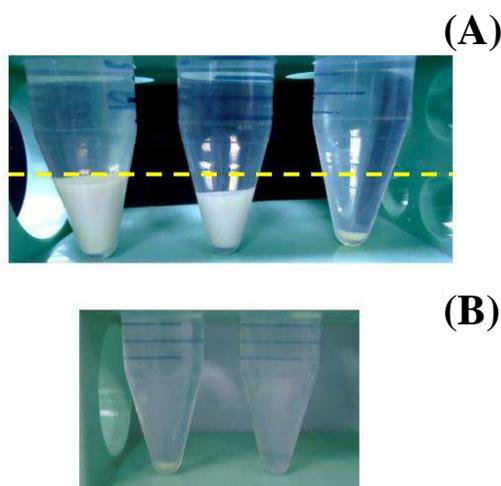


Figure 53. Aspect des culots humides après centrifugation des milieux de culture. De gauche à droite (A) : milieu simplement filtré, milieu doublement filtré, milieu non inoculé et ajusté à pH 5,7. De gauche à droite (B): milieu non inoculé ajusté à pH 5,7 et milieu non inoculé ajusté à pH 2,3.

5.3. Evaluation de la productivité en système régulé

Le développement du milieu s'est axé sur la croissance de *P. pastoris* dans un environnement synthétique. Suite aux étapes de criblage, un milieu minimum (BSM_{pos} , Annexe 2) a été défini. Bien qu'une croissance significative ait été observée avec ce milieu, la capacité de production de la souche n'a pas été prise en compte lors du développement: il a été considéré qu'un milieu favorable à la croissance serait potentiellement favorable à la productivité. La stratégie appliquée en microplaque pour simuler le procédé n'était pas adaptée pour évaluer la productivité de la souche, avec un rendement en protéine d'intérêt de l'ordre du microgramme par litre. Néanmoins, cette expérience a montré qu'une alimentation synthétique simple était suffisante pour maintenir les cellules vivantes. A partir de ces observations, un essai a été réalisé dans des fermenteurs de un litre, permettant une régulation fine des paramètres du procédé, afin d'estimer la productivité. Pour la première fois, le milieu synthétique BSM a été évalué en fermenteur. Ce milieu a été testé sur les différentes phases de culture : l'amplification, le batch et le fed-batch (Tableau 25).

Tableau 25. Plan d'expériences pour l'évaluation de la productivité en DasGip® et valeurs relevées au cours du procédé.

Milieu amplification	Milieu culture	Alimentation	Débit d'alimentation (mL/L/h)	Induction	Durée batch	Durée fed-batch	MF à l'induction (g/L)
YPD	CMP	Complexe	19,6	Méthanol	21h50	16h10	419
BSM_{pos}	CMP	Complexe	19,6	Méthanol	20h10	17h35	381
BSM_{pos}	BSM_{pos}	Synthétique	19,6	Méthanol	Avorté	-	-
BSM_{pos}	BSM_{ref-}	Synthétique	19,6	Méthanol	22h10	16h50	325
BSM_{pos}	BSM_{pos}	Synthétique	23,0	Méthanol	Avorté	-	-
BSM_{pos}	BSM_{ref-}	Synthétique	23,0	Méthanol	22h05	16h55	335

Sur la phase de batch, les profils de densité optique (Figure 54) donnent une indication de la croissance bien que, comme discuté précédemment, cette mesure ne soit pas optimale pour comparer des milieux différents. La robustesse du système est montrée, comme l'indique les profils parfaitement superposables des milieux synthétiques deux à deux. Les cultures en milieux complexes montrent une croissance plus importante en fin de batch avec des valeurs de DO_{600nm} supérieures à 140 après 20 heures de culture alors qu'en milieux synthétiques elles sont de l'ordre de 120 et de 90. Comme en microplaque, l'augmentation de la DO est plus rapide en milieu complexe pour les raisons déjà évoquées concernant les apports nutritifs de chaque milieu.

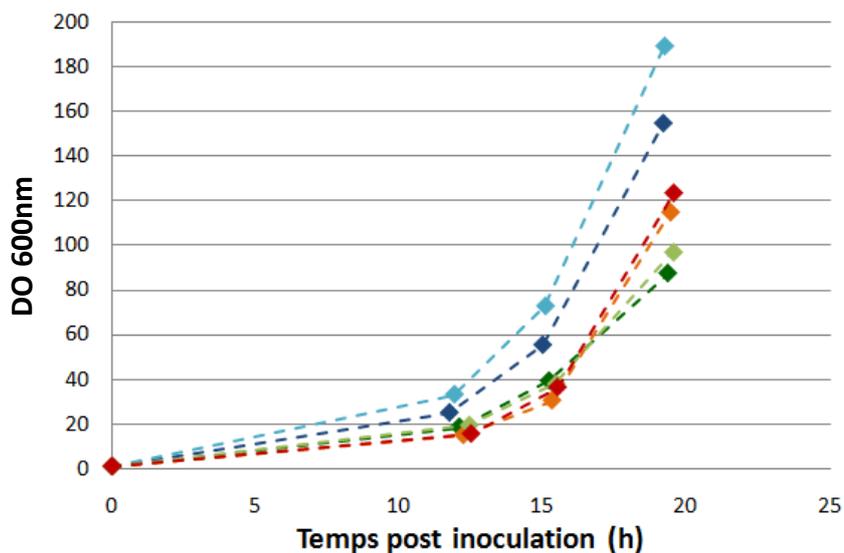


Figure 54. Profils de croissance au cours de la phase de batch en fermenteur de un litre. Densité optique (◆) des différentes unités (Tableau8) : milieu CMP avec amplification YPD (bleu foncé) ou avec amplification en BSM_{pos} (bleu clair) ; milieu BSM_{pos} avec le débit à 19,6mL/L/h (vert clair) ou à 23,0mL/L/h (vert foncé) ; milieu BSM_{ref.} avec le débit à 19,6mL/L/h (orange) ou à 23,0mL/L/h (rouge).

Suite à un problème technique, l'alimentation dans les expériences mettant en œuvre le milieu BSM_{pos} ne s'est pas déclenchée et, après une nuit de culture sur le milieu initial, les fermenteurs ont été avortés. Pour les autres conditions, après un temps de batch compris entre 20h10 et 22h10, l'alimentation s'est déclenchée. Les valeurs de biomasse pour la suite du procédé sont volontairement exprimées en grammes par litre du fait de l'absence de systèmes précis pour le suivi des volumes des différents fermenteurs.

Les cultures en milieux complexes ont présenté des profils similaires, comparés aux précédents essais utilisant le milieu CMP dans le cadre du développement du procédé: l'induction a été déclenchée 38 heures après l'inoculation et les valeurs de masses fraîches ont atteint 381g/L et 419g/L respectivement pour les milieux ayant eu une amplification en milieu YPD et en milieu BSM. En revanche, l'induction avec les milieux synthétiques a été déclenchée avant d'atteindre la valeur cible de 400 ± 20 g/L par contrainte d'aménagement horaire. A noter qu'après 39 heures de culture, la masse fraîche est équivalente dans les deux milieux synthétiques, que le débit soit de 19,6mL/L/h ou de 23,0mL/L/h, avec des valeurs respectives de 325g/L et de 335g/L (Figure 55).

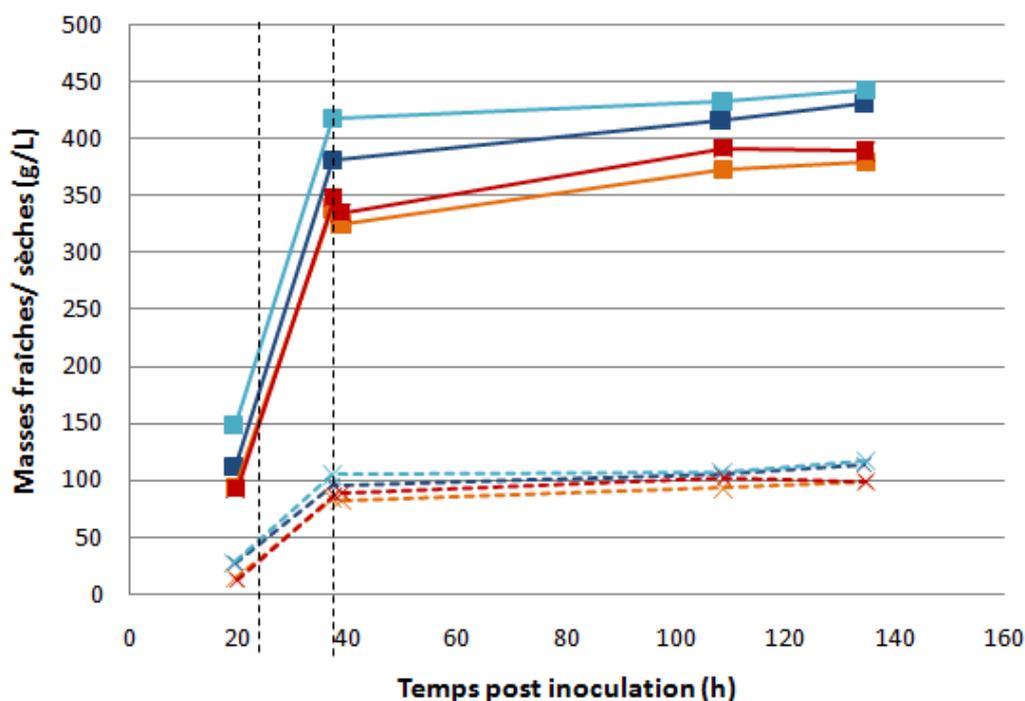


Figure 55. Evolution de la biomasse sur l'ensemble du procédé en fermenteur d'un litre. Masse fraîche en g/L (■) et masse sèche en g/L (×) des différents milieux : milieu CMP avec amplification YPD (bleu foncé) ou avec amplification en BSM_{pos} (bleu clair) ; milieu BSM_{ref.} avec le débit à 19,6mL/L/h (orange) ou à 23,0mL/L/h (rouge).

Après 96 heures d'induction, la quantité de protéine d'intérêt produite a été estimée par une analyse Biacore et les résultats sont reportés dans le Tableau 26. Les valeurs trouvées avec les milieux complexes sont similaires à celles obtenues au cours de précédents essais avec le milieu CMP en DasGip®, qui sont comprises entre 3 et 6 g/L. Le titre protéique est en revanche plus faible avec les milieux synthétiques qui n'atteignent qu'une concentration de 0,7 g/L. Cette valeur plus faible ne peut s'expliquer uniquement par le fait que la culture ait été induite à une valeur de biomasse fraîche plus basse. Les apports nutritifs du milieu synthétique sont peut-être limitants pour la productivité, contrairement aux milieux complexes qui apportent des peptones. Une lyse cellulaire causée par une carence nutritive peut également être suspectée : cette lyse entraînerait la libération de protéases dans le milieu qui pourraient cliver la molécule d'intérêt.

Tableau 26. Résultats de l'analyse Biacore évaluant le titre en protéine d'intérêt dans les surnageants de culture des fermenteurs de 1L après 96 heures d'induction.

Expérience	Titre protéique (g/L)
Référence CMP	5,410
CMP avec amplification BSM	5,040
BSM _{ref.}	0,700
BSM _{ref.} débit +	0,779

6. Conclusion et perspectives

L'objectif de cette étude expérimentale était d'initier la mise en place d'une plateforme générique pour la culture de *Pichia pastoris*. L'intérêt de la plateforme est de réduire la complexité, le coût et le temps du développement des procédés de culture liés à l'arrivée de nouveaux clones.

Afin de cribler à haut débit un grand nombre de milieux, un système de culture en microplaque a été retenu pour miniaturiser le procédé de fermentation. La mise en place du système a été réalisée avec succès et le modèle en microplaque a été validé pour étudier la croissance de la levure au cours d'une phase de batch. Afin de maîtriser le milieu de culture, et dans l'objectif de s'affranchir des matières premières non-définies comme les peptones, c'est un milieu chimiquement défini, le BSM, qui a été développé selon une stratégie de simplification. L'établissement de différents plans d'expériences a permis d'identifier les éléments du milieu BSM essentiels à la croissance de *Pichia pastoris*. Un milieu minimum comprenant du glycérol, du sulfate d'ammonium, un tampon phosphate, du calcium, du magnésium, du zinc, du chlorure de sodium, du fer, du bore, du manganèse et de la biotine a été défini suite au criblage. Le développement du milieu de culture a été approfondi et une interaction significative entre le fer et le zinc a été démontrée. En parallèle, des essais ont cherché à évaluer la productivité de la souche dans un milieu synthétique. En fermenteur régulé de un litre, *Pichia pastoris* a exprimé la protéine d'intérêt mais en quantité largement inférieure comparée au milieu complexe de référence.

Au terme de ce stage, l'aspect générique de la plateforme a été initié : des outils et une méthodologie ont été mis en place pour faciliter la standardisation du procédé quels que soient les clones. Le milieu minimum retenu pourra servir de base à l'élaboration d'un milieu générique pour la croissance de *Pichia pastoris*. La définition de ce milieu générique ne devra pas pour autant exclure la possibilité de retravailler le milieu initial : l'intégration sous forme de multicopies du plasmide au niveau du génome de la levure peut induire l'extinction d'un gène dont le produit intervient dans les voies métaboliques nécessaires à la croissance. Si tel est le cas, la levure devra mettre en place d'autres voies, pouvant nécessiter des éléments nutritionnels différents de ceux retenus dans le milieu générique.

Le développement du milieu s'est basé sur une stratégie de simplification et les résultats obtenus mettent en évidence des pistes pour l'amélioration du milieu. En effet, bien qu'une croissance ait été observée, les valeurs de biomasse sont inférieures aux références obtenues avec

des milieux complexes. Par conséquent, un axe d'étude serait de supplémenter en acides aminés et en vitamines le milieu synthétique retenu, afin d'augmenter la quantité de biomasse et de se rapprocher des résultats obtenus en milieux complexes.

Une piste d'étude similaire pourrait se consacrer au développement d'une alimentation synthétique, qui n'a pas été optimisée dans le cadre de ce projet. En apportant davantage de nutriments, de composition connue, le rendement en molécule d'intérêt pourrait être amélioré. Une étape intermédiaire pour augmenter le titre protéique serait d'incorporer des peptones dans la composition de l'alimentation synthétique afin d'évaluer le potentiel de production de levures après une phase de batch sur milieu synthétique.

Dans le but d'augmenter la productivité de *Pichia pastoris*, une autre piste intéressante serait d'optimiser la stratégie d'induction. Cette optimisation pourrait se faire à l'échelle de la microplaque, en évaluant d'autres méthodes d'alimentation comme la centrifugation de la microplaque pour resuspendre le culot cellulaire dans du milieu frais, ou bien à l'échelle des fermenteurs de un litre, où des procédés plus complexes tels que des stratégies d'alimentation mixtes pourraient être envisagées.

La mise en place du système de culture en microplaque et les différents essais réalisés ont permis de mettre à disposition des outils pour la mise en place de la plateforme générique. A plus long terme, la mise en place de nouvelles technologies, tels qu'un système de culture miniaturisé régulé permettant un ajustement en ligne du pH et offrant la possibilité d'ajouter les solutions d'alimentation directement dans les puits, ou la mise en place d'un analyseur biochimique pour doser les substrats et les produits de la fermentation, devraient permettre de définir une méthode générique applicable quelque soit la souche productrice. Une fois que l'approche générique sera approfondie, la méthodologie définie permettra de tester la plateforme avec d'autres souches de *Pichia pastoris*, et d'affiner le milieu de culture et les stratégies d'alimentation selon la spécificité de chaque clone.

Enfin, il est à noter que le développement de la plateforme en microplaque présente des intérêts en termes d'économies de temps et de ressources ; mais la transition de la méthode générique vers des bioréacteurs de capacités supérieures est soumise à de nombreuses contraintes et devra faire l'objet d'une étude approfondie.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Code de la Santé Publique, France.** Article L5111-1 modifié par la Loi n°2007-248 du 26 février 2007, JORF du 27 février 2007, article 3.
2. **Code de la Santé Publique, France.** Article L5121-1 modifié par la Loi n°2013-1203 du 23 décembre 2013 de financement de la sécurité sociale pour 2017, article 47.
3. **LEEM (Les Entreprises du Médicament).** Biomédicaments en France, état des lieux 2013 [en ligne] 23 septembre 2013. Disponible à partir de l'URL: <http://www.leem.org/biomedicaments-en-france-etat-des-lieux-2013>
4. **La Merie.** Blockbuster Biologics 2012 [en ligne] mai 2013. Disponible sur: <http://www.pipelinereview.com/index.php/2013050850905/FREE-Reports/Blockbuster-Biologics-2012.html>
5. **FDA (Food and Drug Administration).** Approved Drugs (2014, Q1) [en ligne] 2014. Disponible sur: <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/default.htm>
6. **Parlement européen.** Règlement Européen 726/2004 du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004, JOUE n° 136 du 30 avril 2004.
7. **Ministère de l'économie, des finances et de l'industrie, France.** La production des produits de santé d'origine biologique et biotechnologique, état des lieux en France [en ligne] 2010. Disponible sur: <http://archives.entreprises.gouv.fr/2012/www.industrie.gouv.fr/portail/chiffres/produits-sante-bio2010.pdf>
8. **Dossier : "Bioproduction: une mutation salubre".** La France doit investir maintenant. Dossier : Bioproduction: une mutation salubre. IndustriePharma. Mai 2013;72; 31-36.
9. **AFM-Téléthon.** Biothérapies [en ligne] décembre 2014. Disponible sur: <http://www.afm-telethon.fr/guerir/biotherapies-935>
10. **ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament).** Les médicaments biosimilaires, état des lieux [en ligne] 2013. Disponible sur: http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/6187b427efca64d2a15e496ff691158e.pdf
11. **Parlement européen.** Directive Européenne 2004/27/CE du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004, JOUE n° 42 du 30 avril 2004, page 34.
12. **Parlement européen.** Directive Européenne 2011/83/UE du Parlement européen et du Conseil du 25 octobre 2011, JOUE n° 304 du 22 novembre 2011, page 34.
13. **LEEM BIOTECH & GENOPOLE®.** 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/import/presse/communiques/150_Rapport%2Bde%2Bsynth%25C3%25A8se.pdf
14. **Loi de Financement de la Sécurité Sociale pour 2014, France.** Article 47 publié le 23/12/2013.
15. **Académie des sciences.** Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences, [en ligne] 1878, pp. 634-640. Disponible sur: <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/cb343481087/date>
16. **Académie nationale de médecine.** Bulletin de l'Académie nationale de médecine [en ligne] 1951. Disponible sur: <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/cb34348109k/date>
17. **Tsao GT, Lee YH.** Annual Reports on Fermentation Processes [en ligne] 1977, Chapitre 6, pp. 115-149. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120403011500117>
18. **Scriban R,** coordonnateur. Biotechnologie (5^{ème} édition), Editions TEC&DOC, Paris, 1999.
19. **Wegner GH.** Emerging applications of the methylotrophic yeasts. FEMS Microbiol Rev. Décembre 1990;7(3-4):279-283.
20. **Jahic M, Rotticci-Mulder J, Martinelle M, Hult K, Enfors S-O.** Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. Bioprocess Biosyst Eng. Mars 2002;24(6):385-393.

21. **Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ.** Foreign gene expression in yeast: a review. Yeast Chichester Engl. Juin 1992;8(6):423-488.
22. **Christian J.** Production of humanlike recombinant proteins in *Pichia pastoris*. BioProcess Tech. 2006.
23. **Merck Biodevelopment.** Rapport de stage : "Mise en place d'un procédé générique de purification de molécules sécrétées via la levure *Pichia pastoris*". 2013.
24. **Merck.** Rapport financier annuel 2013 [en ligne] 2013. Disponible à partir de l'URL: <http://reports.merckgroup.com/2013/annual-report/servicepages/welcome.html>
25. **Ogata K, Nishikawa H, Ohsugi M.** A Yeast Capable of Utilizing Methanol. Agric Biol Chem. 1969;33(10):1519-1520.
26. **Cereghino JL, Cregg JM.** Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev. Janvier 2000;24(1):45-66.
27. **Jahic M.** Process techniques for production of recombinant proteins with *Pichia pastoris*. Department of Biotechnology, Royal Institute of Technology, S-10691, Stockholm, Sweden. ISBN 91-7283-522-2.
28. **Gellissen G.** Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. Appl Microbiol Biotechnol. Décembre 2000;54(6):741-750.
29. **Zhang W.** Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Biotechnol Bioprocess Eng. Août 2000;5(4):275-287.
30. **Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, Ohda T, Ohyama M, Tomomitsu K.** High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feeding strategy. J Biosci Bioeng. 2000;90(3):280-288.
31. **Cregg JM.** The *Pichia* System [en ligne]. Disponible à partir de l'URL: http://miller-lab.net/MillerLab/wp-content/uploads/pichia_system.pdf
32. **Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM.** Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast Chichester Engl. Mars 2005;22(4):249-270.
33. **Li P, Anumanthan A, Gao X-G, Ilangovan K, Suzara VV, Düzgüneş N, et al.** Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. Appl Biochem Biotechnol. Août 2007;142(2):105-124.
34. **Vijay Chiruvolu JMC.** Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. Enzyme Microb Technol. 1997;(4):277-283.
35. **Tschopp JF, Sverlow G, Kosson R, Craig W, Grinna L.** High-Level Secretion of Glycosylated Invertase in the Methylotrophic Yeast, *Pichia pastoris*. Nat Biotechnol. Décembre 1987;5(12):1305-1308.
36. **Cregg JM.** Heterologous proteins expressed in *Pichia pastoris* [en ligne, consulté le 11 décembre 2013]. Disponible sur : http://www.kgi.edu/documents/faculty/James_Cregg/heterologous_proteins_expressed_in_pichia_pastoris.pdf
37. **Cereghino GPL, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM.** Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. Curr Opin Biotechnol. Août 2002;13(4):329-332.
38. **Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC.** Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. Biotechnol Nat Publ Co. Août 1993;11(8):905-910.
39. **Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP, Sreekrishna K, Romanos MA.** High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. Biotechnol Nat Publ Co. Mai 1991;9(5):455-460.
40. **Katakura Y, Zhang W, Zhuang G, Omasa T, Kishimoto M, Goto Y, et al.** Effect of methanol concentration on the production of human β 2-glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: A simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. J Ferment Bioeng. 86(5):482-487.

41. **Mayson BE, Kilburn DG, Zamost BL, Raymond CK, Lesnicki GJ.** Effects of methanol concentration on expression levels of recombinant protein in fed-batch cultures of *Pichia methanolica*. Biotechnol Bioeng. 2003;81(3):291-8.
42. **Zhang W, Bevins MA, Plantz BA, Smith LA, Meagher MM.** Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. Biotechnol Bioeng. Octobre 2000;70(1):1-8.
43. **Zhang W, Hywood Potter KJ, Plantz BA, Schlegel VL, Smith LA, Meagher MM.** *Pichia pastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: growth kinetics and production improvement. J Ind Microbiol Biotechnol. Avril 2003;30(4):210-215.
44. **D'Anjou MC, Daugulis AJ.** A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. Biotechnol Bioeng. Janvier 2001;72(1):1-11.
45. **Trinh LB, Phue JN, Shiloach J.** Effect of methanol feeding strategies on production and yield of recombinant mouse endostatin from *Pichia pastoris*. Biotechnol Bioeng. Mai 2003;82(4):438-444.
46. **Dietzsch C, Spadiut O, Herwig C.** A dynamic method based on the specific substrate uptake rate to set up a feeding strategy for *Pichia pastoris*. Microb Cell Factories. Mars 2011;10(1):14.
47. **Duetz WA, Witholt B.** Effectiveness of orbital shaking for the aeration of suspended bacterial cultures in square-deepwell microtiter plates. Biochem Eng J. Mars 2001;7(2):113-115.
48. **Duetz WA.** Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation methods. Trends Microbiol. Octobre 2007;15(10):469-475.
49. **EnzyScreen.** Growth in microtiter plates [en ligne, consulté le 11 décembre 2013]. Disponible sur: <http://www.enzyScreen.com/1551010.htm>
50. **Duetz WA, Witholt B.** Oxygen transfer by orbital shaking of square vessels and deepwell microtiter plates of various dimensions. Biochem Eng J. Mars 2004;17(3):181-185.
51. **Duetz WA, Rüedi L, Hermann R, O'Connor K, Büchs J, Witholt B.** Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. Appl Environ Microbiol. Juin 2000;66(6):2641-2646.
52. **LifeTechnologies.** pPICZ α A, B, & C *Pichia* Vectors - Life Technologies [en ligne, consulté le 11 février 2014]. Disponible sur : <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/V19520>
53. **Merck Biodevelopment.** Rapport de stage : "Développement d'un procédé générique de culture en fermentation de la levure *Pichia pastoris*". 2012.
54. **Gupta A, Rao G.** A study of oxygen transfer in shake flasks using a non-invasive oxygen sensor. Biotechnol Bioeng. Novembre 2003;84(3):351-358.
55. **Solà A, Maaheimo H, Ylönen K, Ferrer P, Szyperski T.** Amino acid biosynthesis and metabolic flux profiling of *Pichia pastoris*. Eur J Biochem. 2004;271(12):2462-70.
56. **Boettner M, Prinz B, Holz C, Stahl U, Lang C.** High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. J Biotechnol. Octobre 2002;99(1):51-62.
57. **Ghosalkar A, Sahai V, Srivastava A.** Optimization of chemically defined medium for recombinant *Pichia pastoris* for biomass production. Bioresour Technol. Novembre 2008;99(16):7906-7910.
58. **Plantz BA, Sinha J, Villarete L, Nickerson KW, Schlegel VL.** *Pichia pastoris* fermentation optimization: energy state and testing a growth-associated model. Appl Microbiol Biotechnol. Septembre 2006;72(2):297-305.
59. **KEGG PATHWAY.** Base de données [en ligne, consulté le 10 février 2014]. Disponible sur: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
60. **Wegner EH.** Biochemical conversions by yeast fermentation at high cell densities [en ligne] 1983. Disponible sur: <http://www.freepatentsonline.com/4414329.html>

ANNEXES

Annexe 1. Synthèse des résultats de transfert d'oxygène obtenus suite à l'évaluation des paramètres en microplaque¹⁶.

type of microtiter plate	well volume, dimension in horizontal plane	culture volume	orbital shaking frequency	shaking amplitude	O ₂ -transfer rate (30°C, air, 1 bar)	headspace refreshment rate ^{a)}	evaporation rate per well ^{b)} (at 30°C)	Mixing pattern at 300 rpm				
								ampl. 25 mm	ampl. 50 mm			
24-square deepwell polypropylene, 17x17 mm, depth 40 mm		2500 µl	300 rpm	50 mm	51 mmol O ₂ /L.h ^{a)}	2.5 ml / min (1 VVM)	50% humidity: 50 µl H ₂ O per day					
		2500 µl	300 rpm	25 mm	39 mmol O ₂ /L.h ^{a)}							
		4000 µl	300 rpm	25 mm	24 mmol O ₂ /L.h ^{b)}	2.5 ml / min (0.6 VVM)	75% humidity: 25 µl H ₂ O per day					
		4000 µl	220 rpm	50 mm	24 mmol O ₂ /L.h ^{b)}							
24-round lowwell polystyrene, Ø 16 mm, depth 18 mm		750 µl	300 rpm	50 mm	40 mmol O ₂ /L.h ^{c)}	1.1 ml / min (1.4 VVM)	50% humidity: 30 µl H ₂ O per day					
		1000 µl	300 rpm	50 mm	30 mmol O ₂ /L.h ^{c)}	1.1 ml / min (1.1 VVM)				75% humidity: 15 µl H ₂ O per day		
		1000 µl	300 rpm	25 mm	19 mmol O ₂ /L.h ^{c)}	1 ml / min (2 VVM)	50% humidity: 22 µl H ₂ O per day					
		500 µl	300 rpm	50 mm	38 mmol O ₂ /L.h ^{d)}					1 ml / min (1.3VVM)	75% humidity: 11 µl H ₂ O per day	
96-square deepwell polypropylene, 8x8 mm, depth 40 mm		500 µl	300 rpm	25 mm	12 mmol O ₂ /L.h ^{d)}	1 ml / min (1 VVM)	50% humidity: 6 µl H ₂ O per day					
		750 µl	300 rpm	50 mm	24 mmol O ₂ /L.h ^{d)}	1 ml / min (1.7 VVM)						
		750 µl	300 rpm	25 mm	7 mmol O ₂ /L.h ^{e)}	250 µl / min (2.5 VVM)				75% humidity: 3 µl H ₂ O per day		
		1000 µl	300 rpm	50 mm	18 mmol O ₂ /L.h ^{d)}	250 µl / min (1.3 VVM)						
96-round lowwell polystyrene, Ø 6.5 mm, depth 11.4 mm		100 µl	300 rpm	50 mm	39 mmol O ₂ /L.h ^{e)}	250 µl / min (2.5 VVM)	50% humidity: 6 µl H ₂ O per day					
		100 µl	300 rpm	25 mm	20 mmol O ₂ /L.h ^{e)}	250 µl / min (1.7 VVM)						
		150 µl	300 rpm	50 mm	32 mmol O ₂ /L.h ^{e)}	250 µl / min (1.3 VVM)				75% humidity: 3 µl H ₂ O per day		
		150 µl	300 rpm	25 mm	16 mmol O ₂ /L.h ^{f)}	250 µl / min (1.3 VVM)						
		200 µl	220 rpm	50 mm	12 mmol O ₂ /L.h ^{f)}	250 µl / min (1.3 VVM)						
200 µl	300 rpm	25 mm	12 mmol O ₂ /L.h ^{f)}	250 µl / min (1.3 VVM)								

¹⁶ Source : Référence bibliographique [49] : « EnzyScreen. Growth in microtiter plates ». Disponible sur: <http://www.enzyScreen.com/1551010.htm> [Consulté le 11 décembre 2013]

Annexe 2. Récapitulatif de la composition du milieu BSM et de ses variantes

Élément	Variable ⁽¹⁾	BSM _{ref}	BSM _{ref} ⁻	BSM _{base}	BSM _{CZM}	BSM _{pos}
C₃H₈O₃		x	x	x	x	x
(NH₄)₂SO₄		x	x	x	x	x
KH₂PO₄		x	x	x	x	x
K₂HPO₄		x	x	x	x	x
C₁₀H₁₆N₂O₃S		x	x	x	x	x
CaCl₂		x	x	x	x	x
MgSO₄		x	x	x	x	x
ZnCl₂	X ₁₀	x	x		x	x
FeSO₄	X ₈	x	x			x
H₃BO₃	X ₆	x	x			x
MnSO₄	X ₅	x	x			x
MoNa₂SO₄	X ₁₁	x	x		x	
CuSO₄	X ₉	x	x		x	
NaCl	X ₁	x	x			x
H₂SO₄	X ₇	x	x			
K₂SO₄	X ₃	x	x			
CoCl₂	X ₄	x	x			
KI	X ₂	x				

⁽¹⁾Voir Annexe 3

Annexe 3. Justification des éléments retenus pour le criblage du milieu BSM_{ref}

Elément	Variable	Justification
NaCl	X ₁	Retrouvé uniquement dans le milieu BSM. Dans le BSM, autre source de sodium sous forme de molybdate de sodium. NaCl apporte 0,00435 mol alors que le molybdate de sodium apporte 10 ⁻⁵ mol. Dans les autres milieux, le sodium total est de l'ordre de 10 ⁻⁵ mol.
KI	X ₂	Iode non retrouvé dans la plupart des milieux. Dans le milieu BSM, il y a 10 ⁻³ moles par litre d'iode. L'iode intervient dans le métabolisme de la tyrosine pour synthétiser des hormones thyroïdiennes (non retrouvé chez <i>P. pastoris</i>).
K₂SO₄	X ₃	Il existe déjà une source de potassium (système tampon) et de sulfate (sulfate ammonium) dans le milieu BSM.
CoCl₂.6H₂O	X ₄	Composé CMR. Non retrouvé dans les éléments traces de certains milieux dont le CMP.
MnSO₄.H₂O	X ₅	Composé CMR. Non retrouvé dans les éléments traces du CMP.
H₃BO₃	X ₆	Composé CMR. Non retrouvé dans les éléments traces de certains milieux.
H₂SO₄	X ₇	Uniquement dans les milieux BSM, CMP et FM22
FeSO₄.7H₂O	X ₈	Elément suspecté d'être à l'origine d'une opacité du milieu BSM.

RESUMES

Mise en place et développement d'une plateforme de culture pour la levure *Pichia pastoris*

Résumé

Depuis l'autorisation de mise sur le marché d'une insuline recombinante en 1984, la part des biomédicaments dans le domaine de la santé n'a cessé de croître, atteignant aujourd'hui 25% du marché pharmaceutique total. La montée en puissance des traitements innovants issus des biotechnologies a entraîné une mutation dans le domaine de la santé. De nombreux laboratoires investissent désormais dans la recherche et le développement des médicaments de demain, pour apporter une solution thérapeutique à des pathologies telles que le cancer, le diabète ou les maladies auto-immunes.

Le développement de fragments d'anticorps capables d'atteindre des épitopes inaccessibles aux anticorps conventionnels a renforcé l'intérêt des industriels à utiliser les micro-organismes comme systèmes d'expression. Le site Merck Serono Biodevelopment de Martillac a suivi cette évolution en élargissant son activité au développement et à la production de molécules recombinantes à partir de micro-organismes. Dans le but de réduire la complexité, le coût et le temps du développement des procédés liés à l'arrivée des nouveaux clones, le laboratoire souhaite mettre en place des plateformes génériques de développement.

L'étude expérimentale a consisté à développer l'étape de fermentation de la plateforme de la levure *Pichia pastoris*. Le projet a débuté par la mise en place d'un système de culture en microplaque afin de miniaturiser la fermentation et réaliser un criblage haut débit. La croissance en batch et la simulation de l'ensemble du procédé ont été évalués. Après validation du système pour l'étude de la croissance de *P. pastoris*, l'établissement de plans d'expériences a permis le développement d'un milieu de culture chimiquement défini selon une stratégie de simplification. Le croisement des données issues du criblage et de la simulation du procédé en microplaque ont permis d'évaluer la capacité de *P. pastoris* à produire, en bioréacteurs, la molécule d'intérêt avec le milieu minimum développé.

Mots-clés

Pichia pastoris, protéine recombinante, optimisation de milieu, criblage haut débit, miniaturisation.

Implementation and development of a platform for *Pichia pastoris* culture

Abstract

Since the first marketing authorisation for a recombinant insulin in 1984, the share of biopharmaceuticals has been constantly growing up, reaching now 25% of the total pharmaceutical market. The rise of New Biological Entities has definitely led to changes in the health area : many laboratories are now investing in research and development to provide new therapeutic solutions for diseases such as cancer, diabetes or immune diseases.

The development of antibody fragments, small molecules able to target less reachable epitopes compared to common antibodies, has increased the companies' interest to use microorganisms as expression systems, because of the less complexity required. In this way, Merck Serono Biodevelopment at Martillac has recently extended its activities to the development and the production of recombinant molecules by microorganisms. In order to limit development process costs, complexity and duration linked to new clones implementation, the laboratory aims to set up development generic platforms.

The objective of the experimental study has consisted in developing the fermentation step of the *Pichia pastoris* platform. First, a 24-well plate system has been implemented for fermentation miniaturization and high throughput screening purposes. The growth during batch process, and the evolution of biomass and the protein production from the overall process simulation have been evaluated. Once the system has been validated for growth studies, design of experiments have been shaped to develop a chemically defined medium with minimal compounds. Finally, screening and simulation data have been combined to evaluate *P.pastoris* ability to produce, in bioreactor, the molecule of interest with the previously developed minimal medium.

Key words

Pichia pastoris, recombinant protein, medium optimisation, high-throughput screening, miniaturization.