



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY 1
2009

FACULTÉ DE PHARMACIE

Maîtrise des procédés de culture cellulaire pour la production de vaccins

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 4 mai 2010

pour obtenir :
le Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie

Par
Arnaud Duigou
Né le 11 juin 1985, à Colmar (68)

Membres du jury

Président :

Mme. Chantal FINANCE, Professeur, Faculté de Pharmacie de Nancy

Juges :

Mme Annie MARC, Directeur de Recherche au CNRS

M. Frantz FOURNIER, Maître de Conférences à l'ENSAIA

« LA FACULTÉ N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IM-
PROBATION AUX OPINIONS ÉMISES DANS LES THÈSES, CES OPINIONS
DOIVENT ÊTRE CONSIDÉRÉES COMME PROPRES À LEUR AUTEUR ».

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2009-2010

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Mobilité ERASMUS & Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie

Isabelle LARTAUD & Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du CEPH

(Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier)

Jean-Michel SIMON

Doyens Honoraires

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

Professeurs Émérites

Jeffrey ATKINSON

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

Professeurs Honoraires

Roger BONALY
Thérèse GIRARD
Maurice HOFFMANN Michel JACQUE
Lucien LALLOZ
Pierre LECTARD
Vincent LOPPINET
Marcel MIRJOLET
François MORTIER
Maurice PIERFITTE
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

Maîtres de Conférences Honoraires

Gérald CATAU
Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Andrée IMBS
Marie-Hélène LIVERTOUX
Jean-Louis MONAL
Dominique NOTTER
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

Assistantes Honoraires

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Gilles AULAGNER Pharmacie clinique
Alain BAGREL Biochimie
Jean-Claude BLOCK Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Christophe GANTZER Microbiologie environnementale
Max HENRY Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD Pharmacologie cardiovasculaire
Dominique LAURAIN-MATTAR Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER Biochimie
Pierre LEROY Chimie physique générale
Philippe MAINCENT Pharmacie galénique
Alain MARSURA Chimie thérapeutique
Patrick MENU Physiologie
Jean-Louis MERLIN Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS Chimie thérapeutique

Bertrand RIHN Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON Économie de la santé, Législation pharmaceutique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS Parasitologie
Mariette BEAUD Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT Communication et Santé
Isabelle BERTRAND Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN Chimie thérapeutique
François BONNEAUX Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER Chimie Physique
Cédric BOURA Physiologie
Jean-Claude CHEVIN Chimie générale et minérale
Igor CLAROT Chimie analytique
Joël COULON Biochimie
Sébastien DADE Bio-informatique
Dominique DECOLIN Chimie analytique
Béatrice DEMORE Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Florence DUMARCAY Chimie thérapeutique
François DUPUIS Pharmacologie
Raphaël DUVAL Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE Hématologie
Adel FAIZ Biophysique-accoustique
Luc FERRARI Toxicologie
Stéphane GIBAUD Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT Chimie organique
Frédéric JORAND Santé et Environnement
Olivier JOUBERT Toxicologie, sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT Informatique, Biostatistiques
Faten MEHRI-SOUSSI Hématologie biologique
Christophe MERLIN Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU Pharmacognosie
Maxime MOURER Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUS Informatique
Christine PERDIAKIS Chimie Organique
Caroline PERRIN-SARRADO Pharmacologie
Virginie PICHON Biophysique
Anne SAPIN Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY Santé publique

Gabriel TROCKLE Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIYOU Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIÉ

Anne MAHEUT-BOSSER Sémiologie

PROFESSEUR AGRÉGÉ

Christophe COCHAUD Anglais

Bibliothèque Universitaire Santé-Lionnois (Pharmacie-Odontologie)

Anne-Pascale PARRET Directeur

SERMENT DES APOTHICAIRES

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 instruit 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 de l'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 couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer cette thèse d'exercice.

À mon président de thèse, Madame Chantal Finance, Professeur à la Faculté de pharmacie de Nancy :

Merci à vous qui me faites l'honneur et le plaisir de présider ce jury de thèse ; vous avez toujours su garder un oeil bienveillant sur moi durant mon parcours nancéen, mais aussi japonais.

À mon directeur de thèse, Madame Annie Marc, Directeur de Recherche au CNRS :

Merci pour votre encadrement, vos conseils précieux, ainsi que pour la confiance que vous m'avez apportée dans la réalisation de ce travail.

À mon juge, Monsieur Frantz Fournier, Maître de conférences à l'ENSAIA :

Merci pour votre attention et pour votre éclairage savant pour les parties informatiques de mon travail.

Merci également à Mademoiselle Emma Petiot, Docteur INPL du Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC-GPBA), qui m'a fourni tous les résultats expérimentaux nécessaires à la modélisation et dont le travail bibliographique m'a énormément servi. C'est très clairement grâce au travail d'Emma que ce document existe aujourd'hui.

Par ailleurs, je tiens aussi à remercier mes proches à qui je dédie ce manuscrit.

À Aude,

Toi qui m'a tant apporté par ton soutien et ta présence. Merci de faire route avec moi dans la vie, pour la vie.

À mes parents,

Vous avez été présents lorsque j'en ai eu besoin, merci de m'avoir aidé à réaliser mes ambitions. J'espère que vous serez fiers de cette concrétisation.

À ma famille plus largement,

À Cousin et Cousine, pour ce lien si particulier qui nous unit,

À Babette et Jean, Laurence et François, pour votre générosité,

À mes grands-mères, pour votre profonde affection,

À mes grands-pères, à qui je pense,

À mon parrain,

À ma tatie, auprès de laquelle j'aurais adoré apprendre à soigner les Hommes.

À tous mes amis,

Bastien, Thibaut, Sébastien, Jean-Philippe, Xavier, Amandine, Hélène, Nadine, Carole et Arnaud pour les merveilleux moments passés ensemble et pour votre amitié.



Table des matières

Table des figures

Liste des tableaux

Introduction

Les bioprocédés ont connu un essor considérable dans les industries pharmaceutiques au cours de ces dernières décennies ; les biotechnologies y ont réussi leur pari en passant, en l'espace de quelques années, de la théorie à la réalité. À constater l'évolution forte du marché des biomédicaments, les biotechnologies et l'industrie pharmaceutique sont de plus en plus intimement liées. Cela se concrétise particulièrement bien en ce qui concerne le domaine des vaccins, puisque la production de vaccins est complètement indissociable des techniques de culture de cellules animales.

Sous l'impulsion des autorités de santé et sous l'effet d'une concurrence exacerbée, les industries de santé se doivent de maîtriser de mieux en mieux leurs procédés de production, à fortiori les procédés biotechnologiques. Cette maîtrise passe par une meilleure compréhension des procédés et de leur fonctionnement et par l'utilisation de nouveaux outils tels que les modèles mathématiques. C'est dans cette optique, de compréhension et d'amélioration quantitative et qualitative des connaissances, que s'intègre le travail qui a servi de base à cette thèse d'exercice.

J'ai eu l'occasion de travailler avec les équipes du LSGC-GPBA, dans le cadre de mon projet de fin d'études à l'ENSIC, sur une thématique de modélisation de cultures de cellules Vero. Ces travaux se sont déroulés en alternance sur une période de 18 mois environ. J'ai choisi de poursuivre ce travail à travers la rédaction de ma thèse d'exercice, car cela me permettait de satisfaire deux conditions qui me semblaient importantes :

- développer des thématiques originales, très peu représentées dans le registre des thèses de la Faculté de Pharmacie de Nancy ;

-
- exprimer les diverses facettes de ma double formation, à travers un sujet pouvant être abordé avec différentes sensibilités.

J’ai donc essayé, au sein de ce document, de réunir différents concepts naviguant entre ma formation de pharmacien, ma formation d’ingénieur et mon affinité toute particulière pour le monde de la production pharmaceutique.

Ce document s’articulera autour de trois parties distinctes. En premier lieu, il situera le sujet dans son contexte à travers plusieurs définitions et apportera des éléments bibliographiques indispensables à la poursuite de la lecture.

La seconde section sera dédiée à l’approche de la modélisation et présentera des morceaux choisis réalisés dans le cadre du projet de fin d’études.

Enfin, la dernière partie exposera deux sujets complémentaires : la maîtrise du procédé de culture cellulaire en lui même, ainsi que la maîtrise des biocontaminations dans un environnement de production stérile.

J’ai choisi de rédiger cette thèse à l’aide du programme libre et gratuit $\text{\LaTeX}$. Des renseignements concernant ce programme efficace et peu répandu sont disponibles dans l’annexe ???. Le lecteur trouvera notamment un index, une listes de abréviations, ainsi qu’une nomenclature en fin de document (Annexe ??), afin que la navigation dans ce document soit plus aisée.

Première partie

Revue générale de la littérature sur le sujet traité

Chapitre 1

La classe thérapeutique des vaccins

Du fait de leur empreinte biologique et de leur caractère préventif, les vaccins sont pendant longtemps restés des thérapeutiques à part. Ce document étant dédié aux pharmaciens, mais aussi ouvert à un public plus large, il paraissait doublement important de consacrer un chapitre entier de cet ouvrage pour redéfinir les grandes lignes de la vaccinologie.

Après avoir effectué un bref rappel historique concernant l'évolution de la vaccination à travers les âges et après avoir brossé une esquisse de l'économie et du marché actuel, ce chapitre reviendra sur cette classe thérapeutique, ses spécificités et les technologies associées.

1.1 Définition

La vaccination est un procédé conférant une immunisation active au patient, c'est à dire durable dans le temps, faisant appel à la stimulation immunitaire de l'individu. Le vaccin agit sur le système immunitaire de la même manière qu'un agent pathogène naturel et joue le rôle de la primo-infection sans pour autant déclarer de pathologies. En cas de contact avec le pathogène, l'organisme réagit comme s'il s'agissait d'une réinfection et la réponse du système immunitaire est élevée et très rapide.

1.2 Un bref historique de la vaccination

1.2.1 L'antiquité et la variolisation

Dès l'antiquité, les anciens avaient déjà noté que certaines maladies graves interprétées comme étant des intoxications par des miasmes ambiants, ne pouvaient se contracter successivement à deux reprises. D'où cette idée assez précoce d'imiter la nature en provoquant de façon artificielle des formes atténuées de certaines maladies.

Cependant cette constatation archaïque est longtemps restée non vérifiée. C'est seulement au XI^{ème} siècle, en Chine, que l'on retrouve des traces précises de la pratique de la variolisation ; les chinois utilisaient alors le pus ou les squames broyées d'un patient et les plaçaient dans les narines d'un sujet sain. On doit l'importation occidentale de cette technique de variolisation à Bartholin qui la rapporte en Europe dès 1673 [?].

Bien que la variolisation soit souvent efficace pour prévenir la variole, les résultats des campagnes de variolisation restaient mitigés et irréguliers puisque 2 à 3% des personnes mouraient d'une variole ainsi contractée. En 1760, Daniel Bernouilli, mathématicien, physicien et docteur en médecine démontrera que, malgré les risques, la généralisation de cette technique aurait permis de gagner un peu plus de trois ans d'espérance de vie à la naissance [?], [?].

1.2.2 Fondement du principe de la vaccination par Jenner

Le 14 mai 1796, Edward Jenner inocule dans la peau d'un enfant de paysan de huit ans, du pus de vache souffrant de variole bovine, encore appelée vaccine. Un mois plus tard, il vérifie que le sujet est immunisé en lui inoculant cette fois-ci du pus humain. Le travail de Jenner est sans aucun doute la première approche scientifique de contrôle d'une maladie infectieuse au moyen d'une inoculation délibérée. S'il s'est vraisemblablement inspiré des tentatives empiriques restées dans l'Histoire, il est le premier à avoir situé ses recherches dans une perspective clinique et épidémiologique.

Jenner poursuit ses études et conclut en 1810 que l'immunité conférée ne durait pas toute la vie, sans pour autant en identifier précisément la raison. On peut donc

attribuer à Jenner la découverte du principe de la vaccination par germes atténués ainsi que les concepts de virulence, d'atténuation et de revaccination qui ont vu le jour au début du XIX^{ème} siècle [?].

En 1879, Ernest Chambon crée l'Institut de la vaccine à Paris ; il affine et généralise une technique de préparation de pulpe vaccinale glycinée, plus facilement transportable et utilisable. Par la suite, seront mises au point des techniques de congélation et de préparation de vaccin sec. Grâce aux campagnes menées entre 1967 et 1977 sous l'égide de l'OMS, la variole a pu être définitivement éliminée de la surface du monde, le dernier cas sauvage étant survenu en août 1977 en Somalie [?].

1.2.3 Louis Pasteur et le principe de l'atténuation

Il a fallu attendre près d'un siècle pour pouvoir percevoir de manière plus claire les problématiques relatives à la vaccination, grâce à Louis Pasteur. En effet, Pasteur a démontré l'origine des maladies infectieuses, et a aussi prouvé qu'il était possible de s'en protéger par l'injection de germes atténués, provoquant une maladie d'expression bénigne et permettant de développer une immunité solide et durable. À la fin des années 1870, le travail de Pasteur sur l'atténuation du virus du choléra du poulet fut un pas décisif supplémentaire avec l'utilisation, non pas d'un organisme proche de celui provoquant la maladie, mais de cette même souche ayant perdu de sa virulence [?]. L'étape fondamentale de la vaccination humaine fut franchie le 4 juillet 1885, quand Pasteur appliqua pour la première fois, au petit Joseph Meister, le premier traitement antirabique en post-exposition ; ce dernier vaccin cultivé sur moelle de lapin avait déjà été testé positivement chez le chien [?].

A la fin du XIX^{ème} siècle de nombreux travaux sur les vaccins sont menés de façon indépendante par différents chercheurs. Ainsi, à la fin du siècle, l'humanité disposait de deux vaccins antiviraux vivants : le vaccin antirabique et le vaccin antivariolique, ainsi que de trois vaccins bactériens "tués" contre : la typhoïde, le choléra et la peste [?].

1.2.4 L'ère moderne

En décembre 1908, Albert Calmette et Camille Guérin décrivaient à l'Académie des Sciences une nouvelle souche de bacille tuberculeux, issue d'une souche de *Mycobacterium bovis*. Ils l'appelèrent d'abord bacille tuberculeux bilié, puis bacille de Calmette et Guérin, simplifié ensuite en BCG. Après 13 années de recherche, Calmette et Guérin parvinrent à rendre cette bactérie inoffensive. Depuis la fin de la deuxième guerre mondiale, le BCG reste le vaccin le plus utilisé au monde, et son efficacité sur les formes graves de tuberculose de l'enfant est universellement reconnue [?].

À partir de 1933, la mise au point de techniques de culture de virus sur oeuf de poulet embryonné permet de stopper l'utilisation d'animaux de laboratoire, et ces techniques se sont révélées les plus économiques et les plus sûres jusqu'à l'avènement des cultures cellulaires [?]. Le premier vaccin préparé sur oeuf embryonné est le vaccin contre la fièvre jaune mis au point par Max Theiler en 1937, suivi par le vaccin antigrippal inactivé de Jonas Salk et un vaccin vivant atténué contre les oreillons par Anatol Smorodintsev, en 1949 [?], [?].

L'âge d'or de la vaccination débute après la seconde guerre mondiale, avec la mise au point des techniques de cultures tissulaires par John Enders, en 1949. Le premier vaccin de ce type à être mis sur le marché fut le vaccin antipoliomyélitique inactivé injectable de Jonas Salk, en 1954. De façon contemporaine, en 1957, Albert Sabin développe un vaccin antipoliomyélitique oral [?]. Grâce aux possibilités de reproduire les virus sur cultures cellulaires puis de les atténuer, se sont ensuite développés successivement les vaccins contre la rougeole, contre la rubéole (1962-1970) et les oreillons (1966), à partir de virus cultivé sur embryon de poulet ou de cellules diploïdes humaines [?].

Les vaccins antirabiques ont été considérablement améliorés depuis Pasteur ; ils sont maintenant préparés sur souriceaux nouveau-nés ou, à un coût plus important, sur cellules Vero, et beaucoup mieux tolérés.

À partir de 1968 sont mis au point des vaccins utilisant des fragments de capsule

des bactéries de nature polysaccharidique, à savoir : vaccins contre les méningites dues aux méningocoques A et C (1971), contre l'*Haemophilus influenzae b* (1980), contre la typhoïde dite Vi (1984) et les infections à pneumocoques (1978) [?].

En 1976, est utilisé pour la première fois en France le vaccin contre l'hépatite B élaboré par Philippe Maupas. Ce vaccin nécessitait l'utilisation d'antigènes plasmatiques humains, rendant sa fabrication extrêmement coûteuse et sa disponibilité limitée. Pour ces raisons, la recherche s'est rapidement orientée vers l'élaboration de vaccins recombinants, produits par génie génétique¹.

Une des récentes avancées concerne le cancer du col de l'utérus, qui est une cause majeure de décès chez les femmes dans les pays en développement. Plus de 9% des cancers du col de l'utérus sont associés à une infection génitale par un HPV, l'infection virale la plus fréquente des voies génitales dans le monde, qui touche un nombre de personnes estimé à 660 millions. Deux vaccins anti-HPV expérimentaux, constitués par des pseudoparticules virales recombinantes dépourvues d'ADN sont en cours d'essais pour évaluer leur efficacité vis-à-vis des lésions cervicales précancéreuses de grade modéré et de haut grade chez des femmes de 15 à 25 ans.

Comme nous avons pu le voir, l'histoire de la vaccination est particulièrement riche et intéressante. Cependant, toutes ces avancées de la science ne se sont pas déroulées sans obstacles. Un certain nombre d'incidents inhérents à la vaccination et à sa mise en œuvre ont parfois entraîné un nombre important de morts. Ces malheureux accidents ont parfois contribué à ternir l'image que l'opinion publique peut porter à l'encontre des vaccins. Peut-être ces événements sont-ils responsables des réticences latentes qui peuvent exister encore actuellement ?

1.3 Économie et avenir de la vaccination

Dans les années 1980, les vaccins ont été considérés comme les parents pauvres des spécialités pharmaceutiques. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, les vaccins

1. Ces vaccins, décrits dans la suite de ce chapitre, sont des vaccins produits à partir des technologies de recombinaison de l'ADN, soit par délétion de séquences génétiques pathogènes, soit par assemblage des antigènes seuls.

sont quasi négligeables en terme de valeur ; en effet, ils n'ont longtemps représenté que quelques pour cents des ventes du secteur pharmaceutique. Les vaccins étaient des produits à technologie plutôt bien maîtrisée, à faible marge, vendus sur un marché fortement régulé et qui présentaient peu de perspectives de profit [?].

En l'espace d'une vingtaine d'années, les considérations économiques concernant les vaccins ont beaucoup changé. L'augmentation continue de la demande, l'apparition de nouveaux besoins (grandes pandémies, VIH, bio-terrorisme,...), ainsi que l'émergence de produits innovants et de nouvelles technologies sont à l'origine d'une forte croissance du marché des vaccins (figure 1.1).

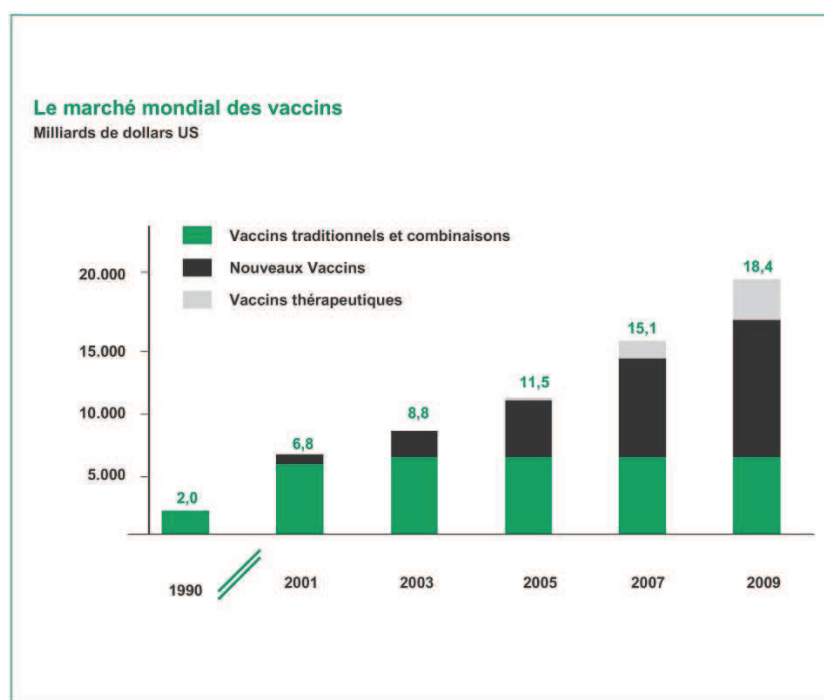


FIGURE 1.1 – Un marché en croissance rapide [?]

Plusieurs raisons justifient cette évolution marquante :

- plusieurs vaccins récemment introduits sur le marché ont généré de très importants bénéfices pour les laboratoires les commercialisant. Certaines spécialités vaccinales se sont même hissées au rang de blockbuster². On peut ainsi citer

2. Médicament générant plus de 1 milliard de dollars de bénéfices

le Prevenar[®] 3 commercialisé par Wyeth qui capitalise plus de 3 milliards de dollars, ou encore le Menactra[®] 4 de Sanofi Pasteur qui avoisine le milliard de dollars ;

- les récentes poussées pandémiques ont rendu les marchés plus stables, plus prédictibles et par conséquent plus exploitables ;
- l'acceptation lente mais croissante de cette classe thérapeutique par l'opinion publique et la croissance économique dans les marchés émergents augmentent l'intérêt économique.

Cet intérêt croissant des laboratoires pour cette classe thérapeutique se manifeste par un accroissement certain des dépenses visant à élaborer de nouveaux vaccins et de nouvelles technologies. En effet, depuis Edward Jenner, les méthodes de développement, de production et les pratiques cliniques associées à la vaccination ont bien changé et les deux dernières décennies ont été parmi les plus prolifiques en terme d'innovation. L'industrie du vaccin investit désormais dans la R&D dans des proportions comparables à celle du reste de l'industrie pharmaceutique.

Les caractéristiques du marché des vaccins

D'un point de vue économique, le marché des vaccins reste un marché à part, répondant à certaines caractéristiques bien précises :

- le marché des vaccins est dominé par un petit nombre de producteurs : en raison de choix stratégiques, le nombre de grandes entreprises produisant des vaccins a fortement diminué. Comme le montre la figure 1.2 un nombre très restreint d'acteurs se partagent la quasi totalité du marché, à savoir : Sanofi-Pasteur, GlaxoSmithKline Biologicals, Wyeth (Pfizer), Merck-Serono et Novartis-Chiron. Les producteurs de vaccins sont peu nombreux car une taille importante est nécessaire pour tirer parti des économies d'échelle. Les barrières à l'entrée sont considérables non seulement à cause des coûts fixes, mais aussi des contraintes réglementaires et du temps nécessaire pour maîtriser tous les aspects du pro-

3. Polyoside pneumococcique contre les infections à pneumocoques

4. Vaccin tétravalent contre la méningite à méningocoques

cessus de production ;

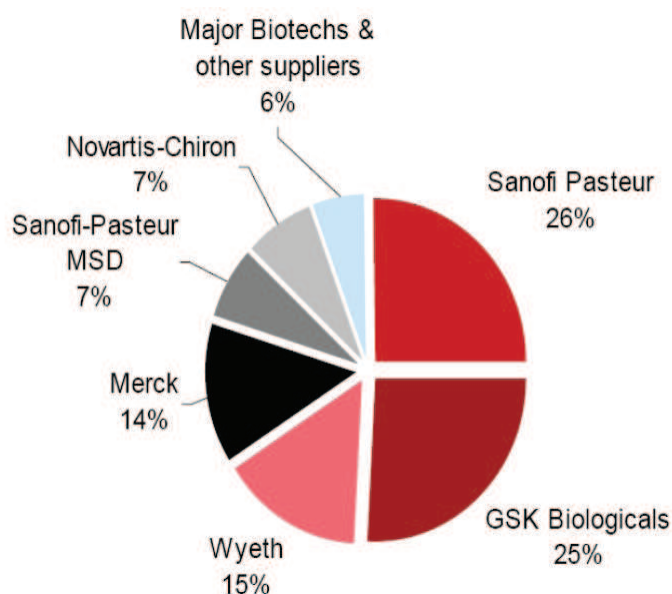


FIGURE 1.2 – Répartition mondiale des parts de marché entre les principaux acteurs pharmaceutiques en vaccinologie, d'après [?]

- le nombre d'acheteurs internationaux est limité : le vaccin est un produit dont la consommation est sous l'impulsion des professionnels de santé publique et des États.
- le marché des vaccins est segmenté et les prix très différenciés : le marché des vaccins subit une double segmentation en fonction du type de vaccin (première génération, seconde génération, vaccins recombinants, ...) et en fonction de l'acheteur (public, privé, riche, en développement).
- l'importance des économies d'échelle en production : les coûts variables (matières premières et composants, emballages,...) ne représentent que 15% des coûts totaux de production. En effet, la majeure partie des coûts est fixe ou semi-fixe (équipements, usines, R&D,...) et ne dépend pas des doses produites. Par conséquent, l'offre des vaccins n'est pas élastique de sorte que les chocs sur l'offre ou la demande peuvent amener, soit à des hausses importantes de prix, soit à des pénuries ou des ruptures de stock [?].

Perspectives futures du marché des vaccins

La recherche sur les vaccins ne cesse de continuer. Le développement du génie génétique et des vaccins recombinants a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives à la vaccination. Au delà des traditionnels vaccins prophylactiques, la recherche s'oriente vers la création de nouveaux vaccins thérapeutiques. Les grands défis et les grands espoirs en ce début de siècle concernent essentiellement le développement de vaccins thérapeutiques contre le SIDA ou contre certains cancers. Il est possible de citer le vaccin anti- β HCG qui est en cours de développement pour contrer les cancers β HCG dépendants comme le cancer des ovaires, le cancer des testicules, le cancer colorectal ou le cancer du sein.

Outre le développement de nouveaux traitements, l'accès à la vaccination est aussi une problématique en vue. L'OMS souhaite que l'accessibilité à la vaccination soit la plus large possible, et ce notamment pour les pays en voie de développement. Pour améliorer l'accessibilité des vaccins, les recherches doivent intégrer la notion du coût du traitement afin de diminuer les dépenses pour les campagnes de vaccination. Les deux paramètres intervenant dans le coût élevé de la vaccination sont : la nécessité d'un encadrement médical pour effectuer la campagne de vaccination (à cause de l'utilisation globale de la voie parentérale pour l'administration de vaccins) et surtout le coût de production des vaccins.

L'OMS souhaite aussi que les recherches s'accroissent pour établir de nouveaux procédés de fabrication de vaccins, notamment à partir de plantes⁵. Cela permettrait peut être de diminuer les coûts de production et d'obtenir des vaccins administrables par voie orale, ou par l'intermédiaire de « véhicules » particuliers tels que les fruits et légumes vaccinants [?].

1.4 Aspects galéniques des vaccins

La forme galénique des vaccins correspond à la rencontre de plusieurs éléments majeurs :

- un ou plusieurs principes actifs immunogènes ;

5. Par mise en culture de cellules d'origine végétale

- des excipients (adjuvants, stabilisants, ...);
- des concepts technologiques permettant la formulation (stérilisation, lyophilisation, séchage, ...).

1.4.1 Le principe actif

Il existe un très grand nombre de principes actifs immunogènes différents allant de la plus simple molécule à la structure la plus complexe. Ces principes actifs se doivent de répondre à certaines propriétés; ils doivent notamment présenter :

- une certaine pureté;
- une certaine stabilité et compatibilité avec le solvant et le conditionnement primaire;
- une propension plus ou moins forte à la stérilisation.

1.4.1.1 Les différents types de principes actifs et les différents vaccins associés

1.4.1.1.1 Les vaccins vivants atténués

Ces vaccins sont composés d'agents pathogènes vivants d'origine virale dont la pathogénicité a été atténuée. L'atténuation s'effectue par sélection de souches du pathogène présentant une faible virulence chez l'homme et ces souches peuvent être obtenues de deux manières différentes. Une des stratégies envisageables consiste à choisir une souche virale spécifique d'une espèce animale présentant des homologues avec la souche virale humaine, mais non infectieuse en raison de la barrière inter-espèces [?]. On peut également atténuer un virus par passages successifs sur animal ou sur culture cellulaire à des températures spécifiques de manière à sélectionner les mutants adéquats [?]. Ce type de vaccin est parfois considéré comme étant le plus efficace; il présente l'avantage d'être actif à faibles doses et est souvent administré en unidose.

A titre d'exemple, les vaccins contre les oreillons, la rougeole ou la rubéole sont typiquement des vaccins appartenant à cette classe. Les vaccins atténués vivants ne

concernent pratiquement que les vaccins viraux car il s'avère difficile d'amoindrir le pouvoir pathogène des bactéries sans faire disparaître totalement leur pouvoir immunogène. Il n'existe en réalité qu'un seul vaccin vivant atténué anti-bactérien : il s'agit du BCG, luttant contre la tuberculose.

1.4.1.1.2 Les vaccins entiers inactivés

Ces vaccins sont composés d'agents pathogènes dans leur intégrité mais qui ont été auparavant inactivés par des procédés physiques ou chimiques⁶ empêchant toute réplication de l'agent pathogène [?]. Ces vaccins apportent également au système immunitaire l'ensemble des antigènes du micro-organisme.

Ils apportent une sécurité supplémentaire pour le patient car il n'y a aucun risque de réapparition de la pathogénicité. En revanche, ils nécessitent généralement une injection à plus forte dose et/ou une administration répétée pour maintenir l'état de protection immunologique à plus long terme.

On peut citer comme représentants de cette classe les vaccins contre la grippe, l'hépatite A, l'encéphalite japonaise, la poliomyélite ou encore la rage, ainsi que les vaccins bactériens contre la coqueluche, le méningocoque, le pneumocoque, ...

1.4.1.1.3 Les vaccins inertes

Les vaccins composés d'anatoxines

La diphtérie et le tétanos sont deux maladies graves qui ne sont pas transmises directement par l'agent pathogène mais par des protéines sécrétées par les micro-organismes, appelées anatoxines. Ces anatoxines ont la propriété de provoquer une réaction immunologique qui protège l'organisme. Tout comme pour les vaccins vivants, ces anatoxines sont fabriquées à partir de sécrétions bactériennes puis sont purifiées et traitées pour leur faire perdre leur toxicité.

Les vaccins recombinants

6. Par procédé d'inactivation physique, on entend essentiellement l'emploi des méthodes thermiques. Les procédés chimiques utilisent quant à eux essentiellement le formol ou la propiolactone

D'immenses progrès ont été réalisés ces dernières années dans l'identification des antigènes des virus, des bactéries et des parasites, et surtout dans l'isolement et le clonage des gènes permettant la fabrication d'antigènes. Il est maintenant possible de créer *de novo* des souches rendues totalement inoffensives par voie génétique. Il s'agit alors d'inactiver ou d'éliminer les gènes responsables de leur pathogénicité et de leur virulence. Il est aussi possible de se servir des micro-organismes manipulés comme vecteurs de gènes codants pour d'autres micro-organismes pathogènes. Ainsi la protection est mixte, à la fois contre le vecteur et contre un gène étranger supplémentaire ; on parle alors de multivalence.

Ces systèmes sont également plus intéressants du point de vue de la sécurité, puisque le risque de réversion de la virulence, possible avec les vaccins vivants atténués classiques, est à exclure [?]. Ces nouveaux vaccins sont communément appelés les vaccins vivants recombinants. Par contre, ils sont faiblement immunogènes d'origine et nécessitent souvent l'administration conjointe d'une substance qui stimule leur pouvoir immunogène.

Les vaccins sous-unités

Grâce aux connaissances acquises en génie génétique, des vaccins appelés vaccins sous-unités peuvent être fabriqués par clonage de la séquence d'ADN antigénique. Les gènes cibles sont introduits dans le micro-organisme servant alors d'« usine cellulaire » pour la production d'antigènes. Ces antigènes recombinants sont ensuite purifiés et peuvent servir de base à des vaccins moléculaires aussi appelés vaccins sous-unités.

L'amélioration des techniques de recombinaison de gènes et l'innocuité des vaccins obtenus font que la plupart des nouveaux vaccins en développement sont des vaccins sous-unités. L'exemple de vaccins sous-unités le plus connu sur le marché est le vaccin contre l'hépatite B, développé par l'institut Pasteur. Il est composé de l'antigène HBs qui est une protéine de surface du virus de l'hépatite B. Lorsque l'antigène est de courte taille, comme c'est le cas pour un antigène de type polysaccharidique, il est nécessaire de conjuguer cet antigène et de le coupler chimiquement à une protéine porteuse.

Les vaccins à ARN nu

Les vaccins à ARN nu correspondent à des séquences d'ADN codant pour l'antigène. L'acide nucléique (ARN) est directement introduit dans les cellules qui fabriquent les molécules antigéniques des micro-organismes ce qui déclenche la réaction immunitaire. Le vaccin est donc produit localement par l'organisme à immuniser.

Le tableau 1.1 se propose de reprendre un certain nombre des informations présentées précédemment et de résumer cette classification.

1.4.2 Les adjuvants

En 1916, Le Moignie et Pinoy montrent que des émulsions d'huiles minérales augmentent la réponse immunitaire contre un antigène et proposent ainsi une première version d'adjuvant [?].

On appelle adjuvant en vaccinologie toute substance capable d'augmenter l'intensité de la réponse immune dirigée contre un antigène. Les vaccins inertes et sous-unités stimulent faiblement et pendant un laps de temps court le système immunitaire de l'organisme. Administrés seuls, ces vaccins seraient insuffisants pour développer une immunité correcte. L'activité d'un vaccin inerte dépend donc en grande partie du choix de l'adjuvant ; ils permettent désormais, en plus d'augmenter la réponse immunitaire, de cibler le type de réponse.

On distingue parmi les adjuvants, les agents immunostimulants et les véhicules. Les premiers activent directement les cellules de l'immunité en se liant spécifiquement à différents récepteurs. Les seconds diffusent l'antigène et déterminent la façon dont il sera présenté au système immunitaire. Ces véhicules possèdent eux-mêmes des propriétés immunostimulantes, ne serait ce que parce qu'ils constituent des corps étrangers à l'organisme.

En plus de l'antigène, les vaccins renferment des molécules destinées à augmenter et améliorer la réponse immunitaire générée suite à l'injection. Ces adjuvants majorent et potentialisent la réponse immunitaire à travers plusieurs mécanismes :

- ils assurent la liaison des antigènes ;

	Catégorie	Type	Définition	Exemples
Vaccins traditionnels	Première génération	Vaccins atténués Vaccins inactivés Toxoïdes	Fabriqués à partir d'organismes ayant perdu leur virulence par dénaturation ou sélection Fabriqués à partir de virus de bactéries tués Toxine inactivée ou détruite utilisée pour immuniser contre certaines bactéries spécifiques	vaccins contre rubéole, fièvre jaune et oreillons Vaccins contre choléra ou hépatite A Vaccins contre tétanos ou diphtérie
	Deuxième génération	Vaccins de sous-unités Vaccins conjugués Vaccins par délétion génique	Contiennent un ou plusieurs composants d'un micro-organisme responsable de la maladie Contiennent des protéines membranaires d'organismes pathogènes Identification et ablation par manipulations génétiques des gènes responsables de la virulence, de la colonisation, de la réplication	Vaccin contre méningocoque, hépatite B ou paludisme Vaccin contre <i>Haemophilus influenzae</i> ou méningite de type B Vaccin contre herpès ou choléra
Vaccins recombinants	Génie génétique	Vaccins recombinants Vaccins thérapeutiques Vaccins à ADN	Fabriqués via la technologie de l'ADN recombinant Développés principalement pour les patients atteints de cancer Morceaux principaux d'ADN qui codent plusieurs protéines. Les protéines produites agissent comme des antigènes	Cervarix [®] , Pediatix [®] , Twinrix [®] , Gardasil [®] , Lymerix [®] , Engerix [®] vaccins en développement clinique vaccins en développement clinique

TABLE 1.1 – Description des différents types de vaccins [?]

- ils libèrent l'antigène dans les ganglions lymphatiques, un des compartiments essentiels de la réponse immunitaire ;
- ils retiennent le vaccin au niveau du point d'injection ;
- ils activent le phénomène inflammatoire et attirent les macrophages qui présentent l'antigène au lymphocyte.

Parmi les principaux adjuvants utilisés, actuellement ou dans le passé, on peut isoler 4 grandes familles d'adjuvants plus particulièrement [?] :

- les gels et sels d'aluminium (oxyhydroxyde, hydroxyphosphate) ;
- les phosphates de calcium ;
- les émulsions et liposomes, tels que le squalène ;
- les virosomes.

Un certain nombre de ces adjuvants sont maintenant interdits ou, du moins, déconseillés.

1.4.3 Les autres excipients

Un certain nombre d'autres composants sont aussi présents dans les vaccins ; il peut s'agir d'anti-bactériens, de stabilisants thermiques ou de tampons chimiques. Selon les formes et selon les modes d'administration, on trouvera :

- des solvants permettant de former des solutions ou suspensions tels que l'eau PPI ou des isotonisants (NaCl) ;
- des tampons, notamment tampons phosphates permettant d'élever le pH à des valeurs usuelles de 7,35 à 7,4 ;
- des solubilisants ;
- des agents antimicrobiens (sulfates de néomycine, kanamycine, ...) ;
- des conservateurs, dans le cas où le médicament ne supporterait pas la stérilisation.

Les conservateurs permettent au vaccin de conserver son intégrité et sa stérilité à travers le temps et le préservent de conditions extérieures trop agressives. Ces conservateurs sont particulièrement importants lorsqu'il s'agit d'un conditionnement multidose, ce qui majore évidemment les risques microbiens associés. Parmi les plus

courants, on trouve ceux présentés dans le tableau 1.2.

Conservateurs	Exemples
Thiomersal	Vaccin diphtérie/tétanos Anatoxine tétanique
2-phénoxyéthanol et formaldéhyde	Vaccin inactivé contre la polio
Phénol	Polysaccharide contre typhoïde et pneumocoque
Chloride de benzethonium	Anthrax
2-phénoxyéthanol	Diphtérie/tétanos/coqueluche

TABLE 1.2 – Conservateurs et stabilisants utilisés dans les vaccins sous licence U.S. [?]

Un petit nombre seulement de ces conservateurs est approuvé par les autorités de santé et l'innocuité de ces molécules secondaires est particulièrement surveillée, comme le montre le récent abandon du thiomersal, composé organo-mercurien potentiellement dangereux.

1.4.4 Les présentations galéniques et les modes d'administration

Deux présentations galéniques privilégiées sont choisies pour mettre en forme les vaccins :

- soit à l'état liquide simple, avec des solutions ou suspensions ;
- soit en lyophilisats, ce qui permet l'utilisation immédiate après reconstitution.

Les vaccins sont actuellement administrés par injection par voie sous-cutanée ou par voie intramusculaire car ce sont les voies d'administration qui sont les plus immunogènes. La voie intra-veineuse est faiblement immunogène et la voie orale est tolérrogène⁷. Cependant beaucoup d'efforts sont faits pour développer de nouveaux vaccins pouvant être administrés par voie orale ou nasale car l'administration serait plus aisée et ne nécessiterait plus un milieu médicalisé, d'où une diminution du coût des campagnes. En fonction des types d'infection, le vaccin est administré une

7. Par opposition au terme immunogène, une substance tolérrogène sera supportée par l'organisme sans générer de réponse immunitaire

première fois et est potentiellement suivi au bout de quelques mois de 1 ou 2 rappels pour assurer une immunisation correcte du patient. Des rappels peuvent aussi être effectués tous les 5 à 10 ans pour pouvoir conserver l'immunité acquise lors des premières vaccinations.

1.5 La production de vaccins

Il existe différentes technologies de procédés qui permettent d'obtenir des vaccins viraux :

- la production par ovoculture, qui correspond à la culture de virus sur des oeufs embryonnés. Une des particularité de cette technique de culture consiste en la présence de traces de protéines d'oeuf⁸ dans le produit fini, même après extraction. Les personnes allergiques aux oeufs sont donc exposées à un risque supplémentaire et potentiellement très dangereux lors de la vaccination.
- la production en monocouche, dite en « Monolayer », qui correspond à la mise en culture dans des flacons de culture « roulants », les cellules se fixant aux parois du flacon. La figure 1.3 rend un aperçu général du procédé de production en monocouche.
- la production en biogénérateurs, qui correspond à la culture de micro-organismes dans des fermenteurs de grands volumes. Le second chapitre de ce manuscrit sera consacré à reformuler les fondements précis de cette dernière technologie.

Le dénominateur commun de ces différentes alternatives est que chacune utilise l'« usine cellulaire » afin de produire les vaccins. Deux types de lignées cellulaires peuvent être utilisées :

- les cellules de lignée : cellules sélectionnées pour leurs caractéristiques et notamment pour leur capacité à recevoir le virus inoculé et pour leur aptitude à se multiplier dans des conditions de culture classique. Conservées dans de l'azote liquide à une température de -196 °C, ces cellules sont congelées précautionneusement dans un cryoprotecteur tel que le DMSO. Après un court passage de décongélation dans un bain-marie chauffé, les cellules sont diluées lentement

8. albumine et ovalbumine

dans le milieu de culture contenant l'ensemble des composants favorables à leur croissance.

- les cellules primaires : cellules d'oeufs embryonnés âgés de quelques jours, originaires d'oeufs de canes ou de poules, conventionnels ou exempts d'organismes pathogènes spécifiques. Une fois prélevés, les embryons subissent un traitement enzymatique protéolytique.

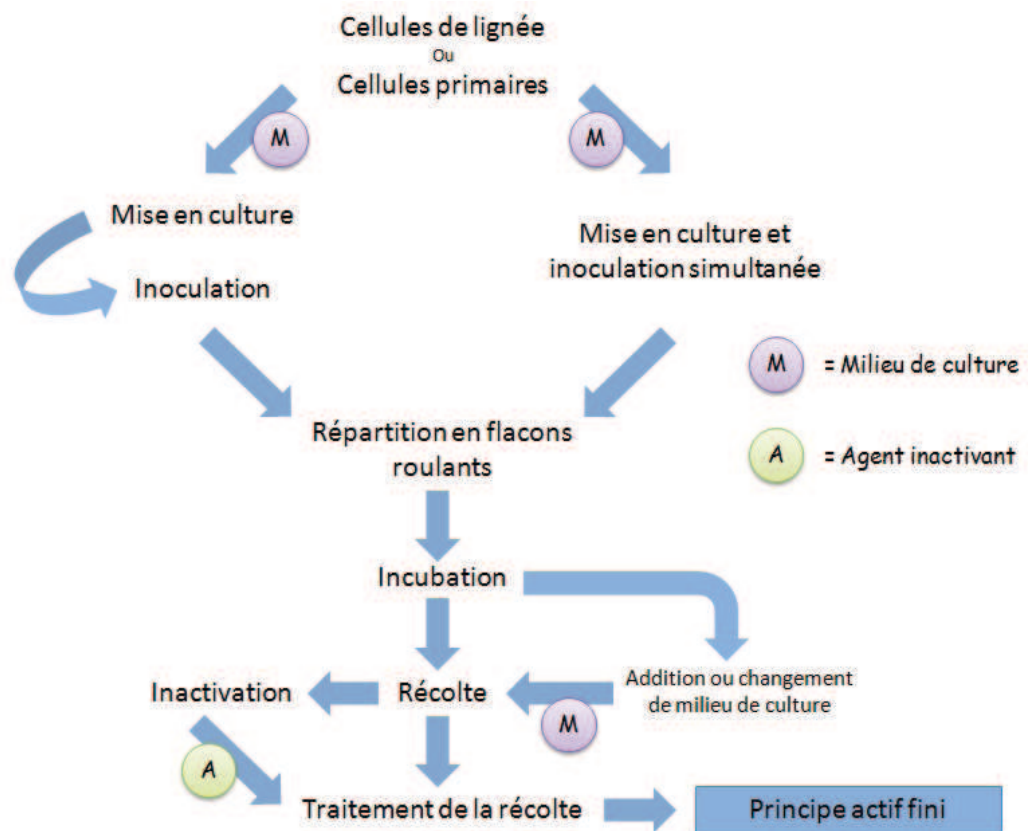


FIGURE 1.3 – Aperçu général du procédé de production de vaccins en monocouche [?]

Chapitre 2

La cellule Vero et sa mise en culture

Après avoir fait une revue très générale des différents types de vaccins et de leurs modes de production associés, ce chapitre se propose de recentrer la discussion sur un contexte plus précis.

La première partie de ce chapitre sera consacrée aux spécificités de la lignée cellulaire Vero, particulièrement utilisée en bioproduction, notamment de vaccins ; la seconde partie s'intéressera plus particulièrement à la technologie de la culture cellulaire en bioréacteurs.

2.1 Description de la lignée cellulaire Vero

Historiquement, la cellule Vero a été isolée et décrite pour la première fois en mars 1962 par Y.Yasumura et Y.Kawakita à l'université de Chiba au Japon. Cette cellule est issue de rein de singe vert adulte d'Afrique (*Certopithecus aethiops*) [?]. Son nom "Vero" résulte de l'abréviation du terme "Verda Reno", qui signifie lui-même "rein vert" en espéranto.

La lignée Vero a été caractérisée comme substrat pour la production de vaccins viraux par les équipes de l'Institut Mérieux dans les années 1980. La caractérisation initiale de cette lignée cellulaire a facilité l'obtention des molécules biologiques à usage

thérapeutique tout en s'affranchissant de l'utilisation d'animaux et des nombreux agents infectieux potentiellement présents dans les cultures primaires extraites de reins de singes verts [?]. Les principales caractéristiques de cette lignée cellulaire sont présentées dans le tableau 2.1.

Origine	Rein de singes verts d'Afrique
Transformation	Naturelle ; au cours des passages successifs
Tumorigénicité	Non tumorigène (d'après la définition du WHO) pas de nodules dont la taille augmente avec le temps (>21j) pas de métastases
Caryotype	Aneuploïde : 58 chromosomes dans 66 % des cellules
Culture	Adhérente
Référence ATCC	CCL81, 124 ^e passage
Traçabilité	Suivie depuis son origine, traçabilité complète (milieu, sérum ¹)
Permissivité	SV-40, SV-5, rougeole, arbovirus, réovirus, rubéole, adeno-virus simien, poliovirus, grippe, virus respiratoire syncytial, virus vaccinia
Caractéristiques	Ne produit pas d'interféron

TABLE 2.1 – Caractéristiques de la lignée cellulaire Vero [?]

Dans le souci de revenir sur ce vocable assez spécifique, une lignée continue peut être théoriquement répliquée à plusieurs reprises sans pour autant devenir sénescence. La transformation correspond au passage des cellules d'un état différencié, vers un état dédifférencié. Enfin, la lignée cellulaire Vero est continue et aneuploïde.

L'aneuploïdie correspond quant à elle à la propriété de présenter un nombre anormal de chromosomes. Contrairement à d'autres cellules mammaliennes, les cellules Vero ne sécrètent pas d'interféron de type 1 lors de l'infection par un virus ; elles possèdent par contre toujours des récepteurs aux interférons α et β et répondent donc correctement aux sources d'interféron extérieures.

2.2 Les procédés de culture de cellules Vero

Les cellules Vero ont été utilisées pour la première fois en 1984 pour la production de vaccins viraux contre les poliovirus [?]. Ces cellules peuvent être cultivées en flacons, ou encore sur microporteurs (figure 2.1).

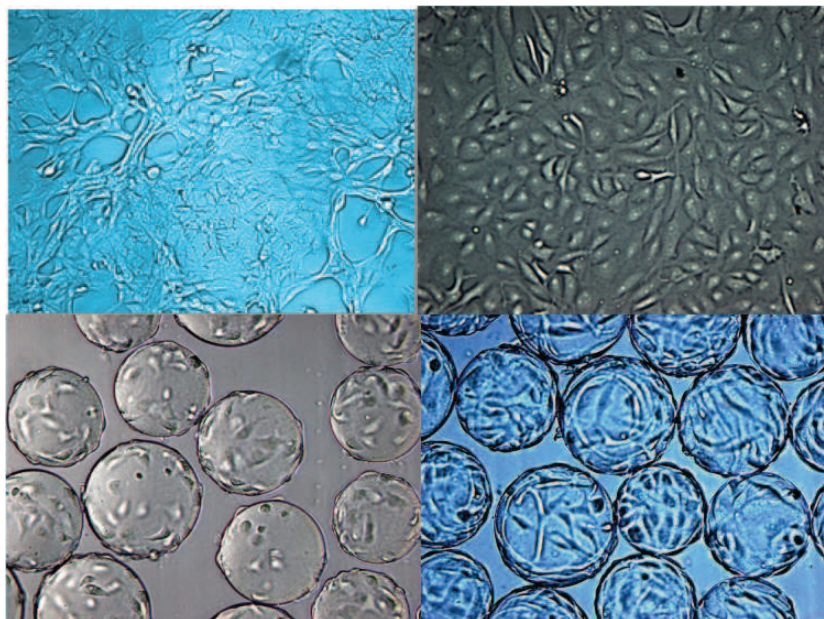


FIGURE 2.1 – Cellules Vero cultivées en flacon de culture cellulaire (en haut après 2 et 3 jours de culture) et sur microporteurs (en bas après 1 et 3 jours de culture) [?]

Depuis, de nombreux autres procédés de production ont été développés. En effet, de part sa capacité à se développer sur microporteurs, la lignée des cellules Vero a été une des principales lignées cellulaires à être utilisée pour des productions industrielles à grande échelle. Par conséquent, l'utilisation de cellules Vero s'est largement diffusée; elles servent maintenant de « substrat » pour la production de multiples vaccins. Le tableau 2.2 se propose de faire la synthèse des principaux vaccins viraux vivants ou inactivés, produits à l'aide de cellules Vero.

Dans ce type de procédés de production, une des préoccupations majeures est d'augmenter la densité cellulaire afin d'augmenter au maximum le titre viral final et les quantités produites. L'impact de l'aération, de l'agitation, de la concentration en

Genre	Virus	Type de vaccin	Produit	Société productrice	Stade
<i>Poliovirus</i>	poliomyélite	inactivé	Imovax polio [®]	Sanofi Pasteur [®]	1982
		vivant atténué	OPV-Mérieux [®]	Sanofi Pasteur [®]	1988
<i>Lyssavirus</i>	rage	inactivé	Verorab [®]	Sanofi Pasteur [®]	1985
<i>Rotavirus</i>	rotavirus humain et bovin	pentavalent vivant	RotaTeq [®]	Merck [®]	2006
	rotavirus	monovalant atténué	Rotarix [®]	GlaxoSmithKline [®]	2007
<i>Flavivirus</i>	encéphalite japonaise	inactivé atténué	Ixiaro [®]	Intercell [®]	2009
		inactivé atténué	JE-PIV	Walter red army Institute of research	Phase II
		vivant atténué chimérique	ChimeriVax [®] -JE	Acambis [®]	Phase III
	dengue	vivant atténué chimérique à partir du sérotype DEN-4		Blomberg School of Public Health / NIH	
		vivant atténué chimérique	ChimeriVax [®] -Dengue	Acambis [®] Sanofi Pasteur [®]	Phase III
		tétravalent basé sur la plateforme ChimeriVax			
	encéphalite West Nile	vivant atténué chimérique basé sur la plateforme ChimeriVax	ChimeriVax [®] -WN02	Acambis [®]	Phase II
<i>Lyssavirus</i>	ross river virus RRV	inactivé		Baxter [®]	Phase I/II
	chikungunya	inactivé		Baxter [®]	tests précliniques
		inactivé		Baxter [®]	tests précliniques
	SARS	inactivé		Baxter [®]	Phase I/II
<i>Smallpox virus</i>	Smallpox virus		ACAM2000	Acambis [®]	Phase III
<i>Influenza</i>	grippe saisonnière	inactivé		Baxter [®]	Phase III
	grippe A H5N1	inactivé	Celvapan [®]	Baxter [®]	2009

TABLE 2.2 – Synthèse des vaccins viraux produits à partir de la culture de cellules Vero [?], [?]

microporteurs, du type de surface d'adhésion ou de la concentration à l'ensemencement sont autant de paramètres primordiaux étudiés afin d'optimiser le procédé.

Un autre paramètre apparaît comme crucial dans le bon déroulement de la culture cellulaire ainsi que dans la production virale : il s'agit de la composition du milieu de culture.

2.3 Les milieux de culture

Les cellules animales, plus que les autres lignées cellulaires utilisées en bioproduction, sont particulièrement difficiles à cultiver car elles exigent des besoins en éléments nutritifs particulièrement complexes. Pendant de très nombreuses années, le sérum de veau fœtal (SVF) a été le complément nutritif de choix qui permettait d'améliorer au mieux la croissance et le maintien cellulaire. En effet, les milieux de base sont riches en éléments nutritifs simples², mais sont totalement dépourvus d'autres molécules pourtant essentielles, telles que des facteurs de croissance, des facteurs d'adhésion, des agents détoxifiants, des co-facteurs, ...

L'origine animale du SVF induit cependant quelques inconvénients de taille [?] :

- un problème de sécurité virale manifeste et de biocontaminations à la source, qui a pris une importance prépondérante depuis les questionnements concernant la présence de prions dans le vaccin de la polio au Royaume-Uni ;
- un problème de qualité des produits, puisque la composition du SVF est sujette à variation ;
- des difficultés d'extraction et de purification après production virale ;
- un problème de traçabilité.

Une des nouvelles tendances consiste donc à cultiver les cellules dans des milieux sans sérum. Plusieurs lignées cellulaires, telles que les CHO ou les hybridomes, s'adaptent plutôt bien à cet environnement sans sérum. En revanche, il est beaucoup plus délicat d'adapter les cellules adhérentes, aux besoins encore plus spécifiques, à ces nouveaux milieux [?],[?]. Quelques milieux ont cependant été développés en ce sens pour les lignées cellulaires Vero (tableau 2.3).

2. sucres, acides aminés, vitamines, ions, ...

Milieu	Composition	Origine	Lignée cellulaire	Publication
Ex-cell medium	Contient des hydrolysats de plantes et a un faible contenu en protéines recombinantes	JRH biosciences	Vero	Kalell et <i>al.</i> , 2007
MDSS2		Axcell Biotechnologies	Vero / BHK	Merten et <i>al.</i> , 1994
M-VSFM	Addition de 10 % à un milieu DMEM	Department of Microbiology, University of Manitoba	Vero / MDCK / BHK	Butler et <i>al.</i> , 2000
VP-SFM		Invitrogen	Vero	Frazatti-Gallina et <i>al.</i> , 2004
SFM	1 :1 volume VP-SFM / William's E	Invitrogen / Sigma	Vero	Quesney et <i>al.</i> , 2003

TABLE 2.3 – Milieux sans sérum dédiés à la culture de cellules Vero

La culture en milieu sans sérum implique cependant un inconvénient : la croissance des cellules est clairement diminuée et la productivité s'en retrouve impactée [?]. C'est la raison pour laquelle la plupart des cultures en milieu sans sérum se font sur microporteurs. En effet, les lignées cellulaires cultivées sur microporteurs présentent généralement des rendements antigéniques plus importants que les lignées cultivées en suspension, ce qui compense en partie la perte de croissance. Les volumes moyens des bioréacteurs sont par contre plus faibles dans le cas des cultures sur microporteurs.

2.4 La culture cellulaire en bioréacteur

Les bioréacteurs sont des unités technologiques permettant la multiplication maîtrisée de micro-organismes. L'objectif visé peut être soit la production de biomasse en tant que telle, ou encore la production d'un métabolite particulier par ces micro-organismes.

Ces cuves sont le plus souvent en verre pour les petits contenants (figure 2.2) ou en inox pour les plus gros volumes (figure 2.3, 2.4). Elles sont munies d'un dispositif d'agitation, d'un système d'aération et de balayage en différents gaz (O_2 , N_2 , CO_2 , air...), ainsi que de voies permettant l'apport et l'extraction des substrats et produits. Contrairement aux fioles ou aux spinners³, les bioréacteurs sont munis de systèmes de contrôle et permettent de maîtriser plus précisément les paramètres physiques de culture (agitation, température,...) et chimiques (pH, oxygène, nutriments,...) à partir de mesures réalisées en ligne par des sondes. Les systèmes à grande échelle sont également munis de dispositifs de nettoyage et de stérilisation en place.

2.4.1 Les différents modes d'alimentation et les cinétiques associées

La figure 2.5 présente les différents modes d'alimentation des cultures en milieu nutritif :

3. Un spinner est un type de bioréacteur, de taille modérée, qui met en place un système d'agitation du milieu de culture, direct ou indirect. voir figure 6.1, 73



FIGURE 2.2 – Bioréacteur en verre 5L, BIOSTAT B-DCU® Single version [?]



FIGURE 2.3 – Bioréacteur de culture cellulaire 300L, BioFlo Pro® [?]

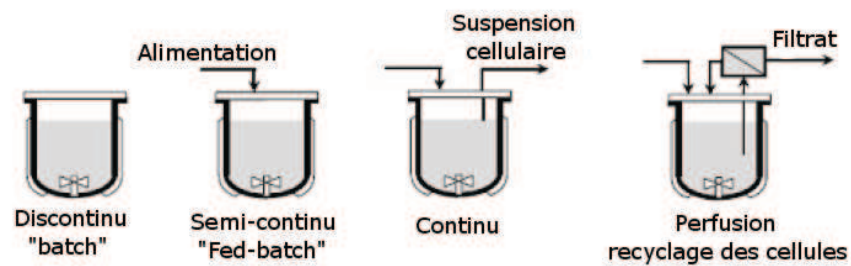


FIGURE 2.5 – Les différents modes de culture [?]



FIGURE 2.4 – Bioréacteur inox de 60 L photographié chez Amgen [?]

Chacune de ces différentes configurations induit une cinétique qui lui est propre (figure 2.6).



FIGURE 2.6 – Cinétiques de croissance, de consommation et de production en fonction du mode d'alimentation du bioréacteur [?]

Le choix du mode d'alimentation du bioréacteur dépend du comportement de la lignée cellulaire, de la stabilité du produit, de la productivité envisagée, des contraintes techniques et économiques.

2.4.1.1 Les cinétiques de culture en réacteur fermé

La figure 2.7 représente une cinétique de culture cellulaire classique en mode discontinu.

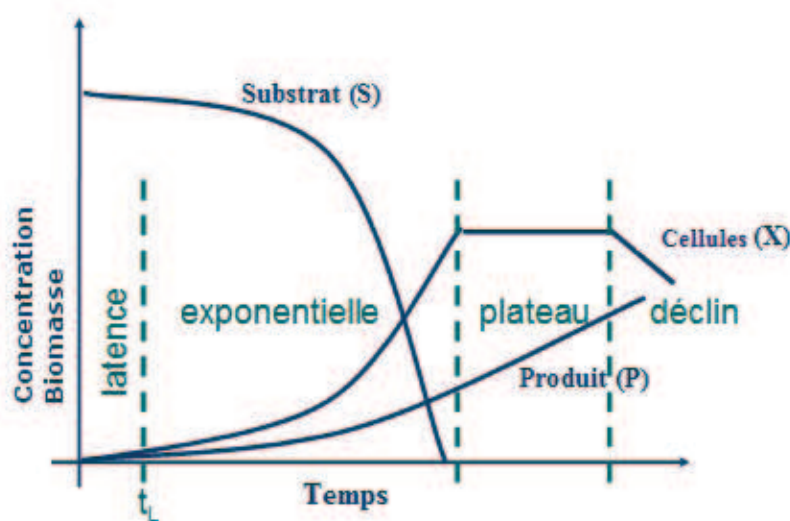


FIGURE 2.7 – Représentation schématique d'une cinétique cellulaire classique

Elle se compose :

- d'une phase de latence, correspondant entre autre à la phase d'adhérence des cellules sur leur support ;
- d'une phase de croissance exponentielle, caractérisée par une pente fortement positive ;
- d'une phase de ralentissement de la croissance cellulaire ;
- d'une phase stationnaire, pour laquelle on note un équilibre entre le taux de croissance réel et le taux de décès entraînant un taux de croissance apparent nul ;
- d'une phase de mort cellulaire, le phénomène de mort cellulaire étant principalement dû à l'accumulation de métabolites toxiques tels que le lactate.

Dans le cas du mode discontinu, encore appelé « batch », le système est dit fermé et le milieu n'est pas renouvelé. La concentration en substrat diminue tandis que celle du produit augmente avec la croissance cellulaire. Le milieu, une fois épuisé en éléments nutritifs et enrichi en métabolites, n'assure plus son rôle nutritif. Dans le cas de production à usage pharmaceutique, c'est le plus souvent ce mode de culture qui est choisi puisqu'il est en entière adéquation avec la démarche de lot.

2.4.1.2 Les autres modes de culture

En plus du mode discontinu, le schéma 2.6 présente un certain nombre d'autres modes de culture.

À titre informatif, le mode semi-continu, ou « fed-batch », correspond à l'ajout de milieu frais, sans aucun soutirage; il permet de maintenir la concentration en substrat et de prolonger la phase de production des cellules. Le mode continu consiste en l'alimentation en milieu frais et au soutirage du même volume de milieu usagé avec les cellules. Ce mode permet de maintenir un équilibre dans les concentrations en substrats, produits et cellules. Quant au mode perfusé, il permet le renouvellement du milieu en parallèle d'un soutirage sans cellule⁴.

Ces différents modes de culture sont aujourd'hui minoritaires dans l'ensemble des procédés biotechnologiques à destination pharmaceutiques; cependant ils se développent de plus en plus, notamment le mode semi-continu.

2.4.2 Les différentes technologies de bioréacteurs dédiés à la culture cellulaire

Les bioréacteurs à agitation mécanique et les bioréacteurs à bulles sont couramment utilisés depuis plusieurs dizaines d'années pour les fermentations microbiennes et les cultures de cellules animales [?]. Les critères de sélection d'un bioréacteur pour un procédé donné dépendront essentiellement du produit final que l'on souhaite récupérer et des caractéristiques des cellules hôtes cultivées. Les transferts massiques en oxygène ou en nutriments, ainsi que les forces de cisaillement mises en jeu seront aussi des paramètres à considérer.

2.4.2.1 Les bioréacteurs à agitation mécanique

Le réacteur agité (figure 2.8), ou « continuous stirred-tank bioreactor » (CSTBR), est le réacteur le plus simple qui peut être mis en œuvre en production.

Les principaux avantages de ce type de bioréacteur sont sa flexibilité, sa capacité

4. Les systèmes de rétention possibles sont des méthodes séparatives telles que la centrifugation, l'ultrafiltration, la décantation,...

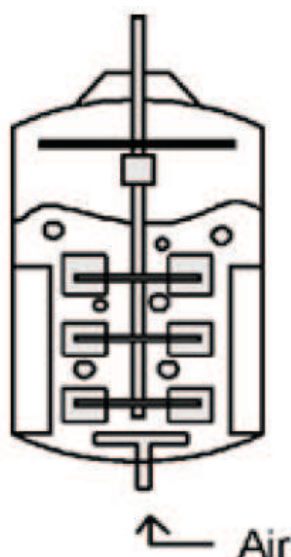


FIGURE 2.8 – Schématisation d'un bioréacteur à agitation mécanique [?]

à assurer un transfert massique important ainsi qu'un mélange efficace assurant une bonne homogénéisation du milieu de culture, ce qui favorise le contrôle du process. En contrepartie, ce mélange efficace induit une contrainte mécanique sur les cellules ; ce phénomène peut être particulièrement agressif vis-à-vis des cellules [?]. Les caractéristiques d'agitation et le type de mélangeur sont donc des paramètres majeurs à optimiser lors de la mise en place et de la transposition industrielle (« scale-up », ou extrapolation d'échelle) de cette technologie de réacteur.

2.4.2.2 Les bioréacteurs pneumatiques

Les bioréacteurs pneumatiques (colonnes à bulles ou à ascension d'air)(figure 2.9) sont des types de réacteur à dispersion gaz-liquide constitué d'une enceinte cylindrique à travers laquelle circule verticalement des bulles d'air par ascension. C'est uniquement le mouvement de l'air qui assure l'aération, le mélange et la circulation du fluide, sans l'aide d'aucune pièce mécanique. A l'inverse du bioréacteur précédent, le risque est de voir apparaître des hétérogénéités locales au sein du réacteur ainsi que des phénomènes de floculation. Les cultures cellulaires de haute densité, et par conséquent de viscosité importante, ne sont pas compatibles avec ce type de réacteur

[?].

Ils présentent cependant l'avantage d'être plus économiques en coût de fonctionnement, plus propices aux procédés aseptiques et relativement faciles à dimensionner.

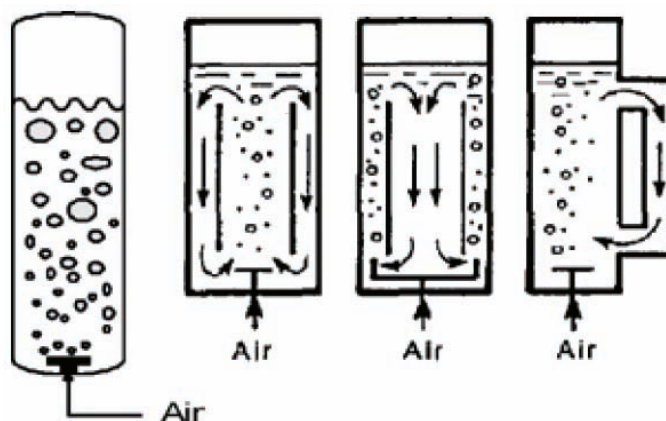


FIGURE 2.9 – Schématisation d'un bioréacteur pneumatique [?]

2.4.2.3 Les bioréacteurs à basculement

Les bioréacteurs à basculement (figure 2.10) consistent en une poche de polyéthylène contenant le milieu de culture ; cette poche est animée d'un mouvement de vague alternative assurant le mélange des milieux de culture en suspension. Ils présentent l'avantage d'être des réacteurs à usage unique ; par conséquent ils sont assez peu coûteux et assurent des conditions de stérilité optimales. Les transferts de masse et de chaleur sont maîtrisés par la vitesse et l'angle de basculement [?]. L'oxygénation du milieu se fait naturellement par diffusion dans le milieu de culture exposé à l'air.

A titre comparatif, un bioréacteur de 50L tel que celui décrit en figure 2.11 contient une biomasse équivalente à celle contenue dans 1000 à 1200 fois plus importante que celle contenue dans des flacons de 250 mL.

Ces réacteurs sont le plus souvent utilisés pour des productions de petite échelle, ou encore pour certaines étapes intermédiaires d'un procédé de production.

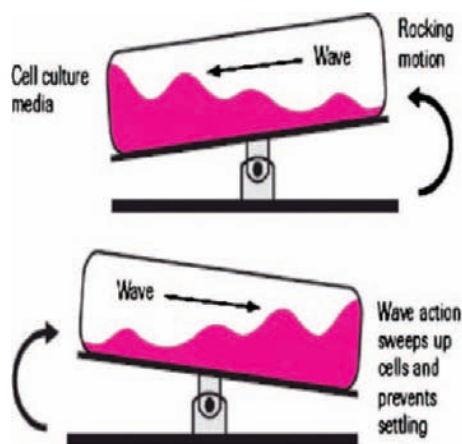


FIGURE 2.10 – Schématisation d'un bioréacteur à basculement [?]

FIGURE 2.11 – Photographie d'un réacteur « à usage unique » de 50L équipé d'une sonde de pH, de température et de pO₂ [?]

2.4.2.4 Les bioréacteurs à membrane

Les bioréacteurs à membrane (figure 2.12), ou « bioréacteurs compartimentés », mettent en jeu des membranes spécifiques permettant de filtrer les espèces en fonction de leur masse moléculaire. La biomasse est retenue à l'intérieur du bioréacteur alors que l'aération, l'apport en nutriments et l'extraction des produits se font *in situ*.

Ce type assez spécifique de technologie est utilisé en première intention pour les procédés d'échelle réduite ; l'extrapolation d'échelle à de grands volumes est particu-

lièrement délicate à mettre en œuvre.

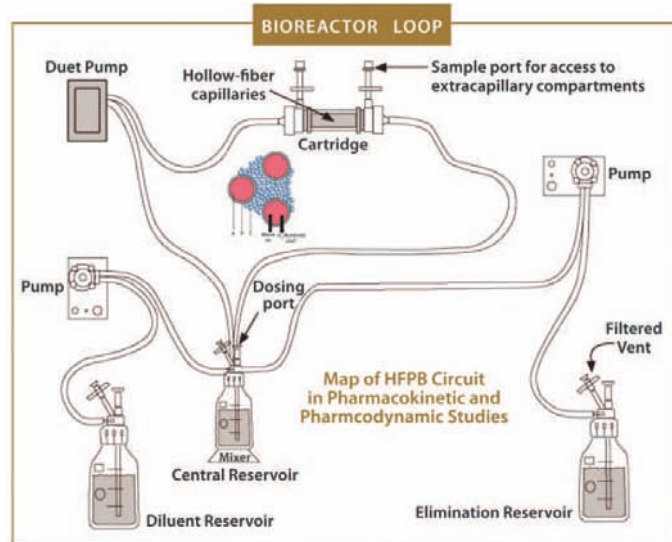


FIGURE 2.12 – Schématisation d'un bioréacteur à membrane [?]

Chapitre 3

Quelques notions sur le métabolisme des cellules animales

L'optimisation des milieux de culture dénués de matériaux d'origine animale nécessite obligatoirement une bonne compréhension des phénomènes de croissance, de mort cellulaire et du métabolisme usuel des cellules animales. Contrairement au métabolisme cellulaire des hybridomes, des CHO et des BHK, le métabolisme des cellules Vero reste peu documenté. Par conséquent, les paragraphes suivants se proposent de reprendre un certain nombre de concepts théoriques indispensables pour l'élaboration et l'interprétation d'un modèle cinétique. On admettra que le lecteur possède déjà un minimum de connaissances dans le domaine de la prolifération cellulaire et des cycles de division cellulaire ; de plus, ces généralités ne seront pas directement étudiées dans le cadre de notre travail de modélisation.

3.1 Le phénomène de mort cellulaire

Dans le souci d'optimiser la production virale, on cherchera à maximiser la croissance cellulaire tout en réduisant au minimum le phénomène de mort cellulaire. Bien évidemment, ce phénomène de mort cellulaire impacte de manière importante les rendements de culture ainsi que la qualité de la production. La mort cellulaire s'exprime à travers deux mécanismes bien différenciés : la nécrose et l'apoptose.

3.1.1 La nécrose

La nécrose est une mort cellulaire qualifiée « d'accidentelle » qui survient suite à une agression du milieu extérieur. On pourrait encore la définir comme : « un arrêt pathologique, autrement dit anormal, du fonctionnement d'une cellule ». Elle n'est pas déterminée par des facteurs intrinsèques, mais est généralement la résultante de conditions extrêmes et d'un environnement stressant (température, contraintes mécaniques, physico-chimie du milieu, ...).

Les cellules sont endommagées physiquement ce qui provoque un gonflement et une rupture de leur membrane cytoplasmique, et, par conséquent, la libération de leur contenu cellulaire dans l'environnement extérieur. La libération du contenu intracellulaire dans le milieu environnant induit généralement une réponse inflammatoire des tissus proches [?] (figure 3.1).

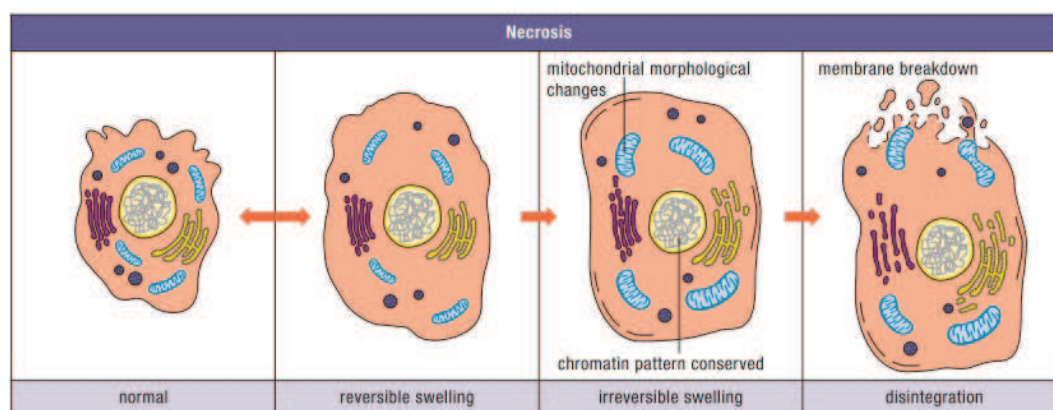


FIGURE 3.1 – Les modifications morphologiques de la nécrose [?]

3.1.2 L'apoptose

L'apoptose correspond à un processus de mort cellulaire programmée, ou suicide cellulaire. Ce mécanisme, hautement régulé, a été introduit en 1972 [?]; ce concept veut que les cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à différents signaux internes ou externes. Ce mécanisme est une réponse physiologique de la cellule induisant l'activation d'une cascade d'évènements qui conduisent à la mort cellulaire en quelques heures. Cette cascade correspond à l'activation successive d'enzymes

3. Quelques notions sur le métabolisme des cellules animales

3.1. Le phénomène de mort cellulaire

protéolytiques appelées caspases.

L'apoptose se caractérise par une condensation et un flétrissement du noyau et du cytoplasme, puis par la fragmentation des matériaux cellulaires en corps apoptotiques. Les cellules sont ainsi détruites de manière « propre » et n'entraînent pas de réponse inflammatoire localisée [?] (figure 3.2).

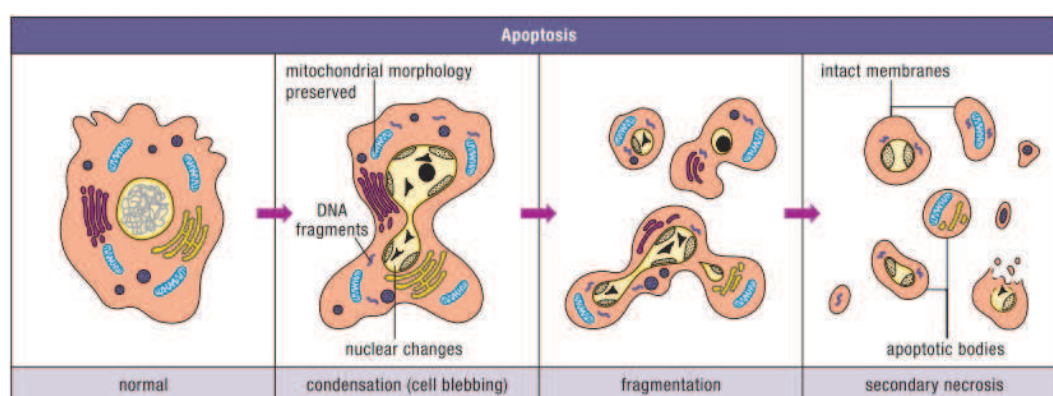


FIGURE 3.2 – Les modifications morphologiques de l'apoptose [?]

Paradoxalement, cette mort cellulaire programmée est aussi un mécanisme de survie pour les organismes multicellulaires, puisqu'elle participe à la régénération des populations cellulaires et au renouvellement des cellules dysfonctionnelles. Dans le cas des organismes multicellulaires, l'apoptose est une stratégie essentielle au développement morphologique des individus. Les principales différences entre nécrose et apoptose sont résumées dans le tableau 3.1 et la figure 3.3.

Si l'on transpose cette problématique aux cultures en bioréacteurs, le phénomène de mort cellulaire est principalement dû à trois facteurs :

- l'agitation et l'aération du milieu de culture ; en effet, le cisaillement et les contraintes hydrodynamiques appliquées sur les cellules peuvent provoquer la lyse des cellules cultivées ;
- un apport insuffisant en oxygène ou des limitations nutritives, qui peuvent engendrer des dérèglements métaboliques internes provoquant, une fois les voies de secours épuisées, la destruction de la cellule ;

3. Quelques notions sur le métabolisme des cellules animales

3.1. Le phénomène de mort cellulaire

Nécrose	Apoptose
Mort anormale des cellules	Mort cellulaire programmée
Caractère spontané, pas d'apport énergétique	Caractère contrôlé, nécessite de l'énergie sous forme d'ATP
Bourgeoisement cellulaire	Bourgeoisement par corps apoptotiques
Fragments d'ADN de tailles aléatoires	Condensation de la chromatine puis fragmentation de l'ADN par des endonucléases (tailles multiples)
Perte de l'intégrité membranaire	Dissolution de l'enveloppe nucléaire
Libération du contenu cellulaire	Rétrécissement de la cellule
Déclenchement d'une réaction inflammatoire	Contenu cellulaire encapsulé
Phagocytose des débris cellulaires chez les organismes multicellulaires	Phagocytose des corps apoptotiques chez les organismes multicellulaires

TABLE 3.1 – Comparatif entre nécrose et apoptose [?]

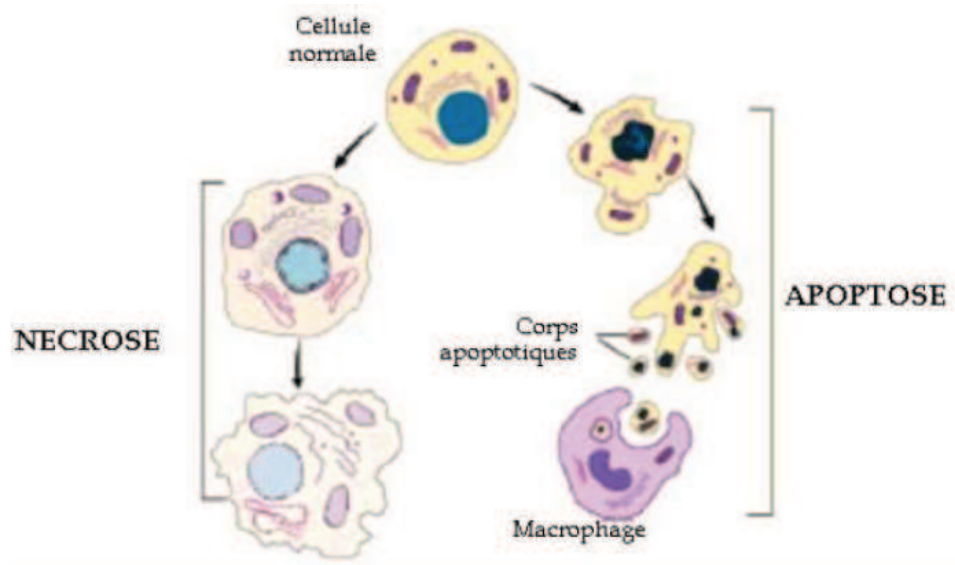


FIGURE 3.3 – Comparaison morphologique de la nécrose et de l'apoptose [?]

- des agents infectieux, tels que des virus, bactéries, champignons ou parasites non désirés.

3.2 Le métabolisme des substrats

3.2.1 Le métabolisme du glucose

Les cellules immortalisées et cultivées *in vitro* présentent la caractéristique commune d'un métabolisme du glucose très actif mais cependant très peu efficace. La métabolisation de ce substrat entraîne la formation d'un métabolite secondaire potentiellement inhibiteur de la croissance cellulaire, le lactate. Pour ces raisons, le métabolisme du glucose a donc été largement étudié dans le cas des cellules animales.

Le glucose est le principal nutriment consommé par les cellules animales. Compte tenu de sa structure, il ne peut pas diffuser seul à travers la membrane cytoplasmique et nécessite l'aide de transporteurs spécialisés pour la franchir¹ ; cette étape de transport est relativement rapide.

Une fois incorporé dans le cytoplasme, le glucose s'intègre dans deux voies métaboliques principales : la glycolyse et le cycle des pentoses phosphates [?], [?].

La voie majoritaire est celle de la glycolyse qui convertit le glucose en pyruvate en générant de nombreux intermédiaires de biosynthèse, 2 ATP et 2 NADH. Le pyruvate est ensuite intégré dans le métabolisme énergétique de la cellule via le cycle TCA. Tout le pyruvate provenant du glucose n'est pas assimilé pour autant dans le cycle TCA, une partie sera en effet dégradée ; c'est de cette dégradation que résulte le lactate [?]. Les proportions rentrant en jeu dans chacun de ces cycles sont fortement liées aux concentrations en glucose dans le milieu. Ainsi, pour de fortes concentrations, on note une augmentation de la proportion de glucose dégradé en lactate et inversement.

Pour la majorité des lignées cellulaires continues, le métabolisme carboné central présente une forte dérégulation. En effet, si l'on expose la cellule à de fortes concentrations en glucose, la majorité du pyruvate formé sera métabolisée en lactate, de

1. Les mécanismes de transport sont au nombre de deux : un transport actif par des protéines de transport actif (SLGT-1 et SLGT-2), un transport passif par l'intermédiaires d'hexokinases membranaires (famille SLC-2 : Glut 1, glut 2, ...)

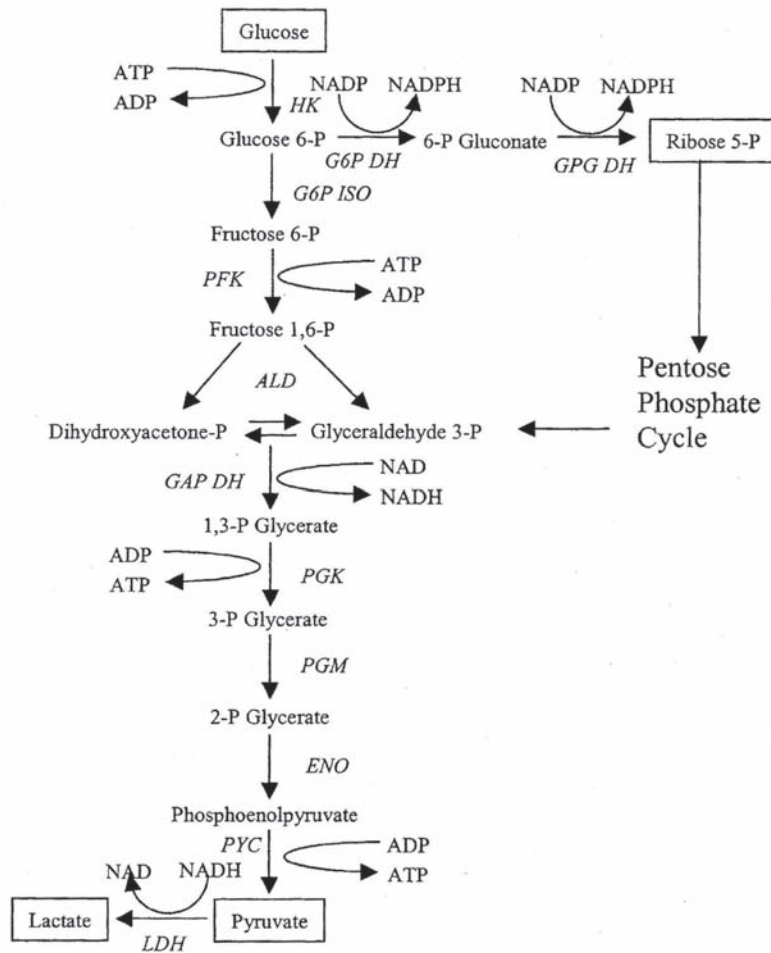


FIGURE 3.4 – Le mécanisme de la glycolyse dans les cellules animales

manière à régénérer le co-facteur NADH (figure 3.5), alors qu’une faible partie entrera dans le TCA, voie métabolique impliquée dans la production d’énergie cellulaire. Ce mécanisme constaté est fortement délétère pour la cellule pour une double raison :

- il produit une espèce potentiellement inhibitrice de la croissance, le lactate ;
- la voie métabolique privilégiée ne produit que 2 ATP, contre 36 ATP pour le cycle de Krebs.

Le métabolisme cellulaire carboné semble être plus efficace et mieux adapté à des concentrations en glucose faibles, contrôlées par exemple pour une alimentation progressive.

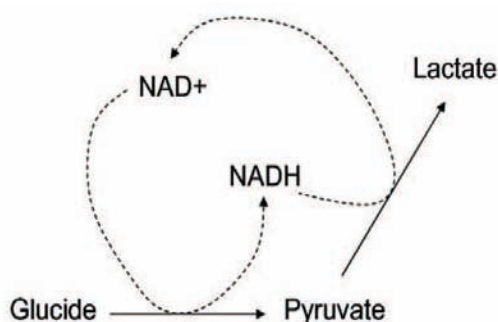


FIGURE 3.5 – Place du co-facteur NAD^+ dans la métabolisation du glucose en lactate [?]

La voie des pentoses phosphates, plus minoritaire, permet quant à elle la régénération du NADPH.

3.2.2 Le métabolisme de la glutamine

La glutamine est décrite dans la littérature comme étant le second substrat majeur des milieux de culture. De part son rôle prépondérant dans le métabolisme carboné central des cellules, ce second substrat a été largement étudié ces dernières décennies.

Contrairement au glucose, la glutamine ne possède pas de systèmes de transport qui lui soit propres et pénètre la cellule de manière non-spécifique, notamment à l'aide de systèmes de transport peptidiques. Une fois à l'intérieur de la cellule, la glutamine subit la glutaminolyse et participe à la formation de glutamate et d'aspartate [?].

La glutamine joue donc un double rôle au sein de la cellule [?] :

- elle sert de précurseur à la synthèse de molécules indispensables telles que les bases azotées (purines, pyrimidines) et de certains acides aminés par transamination (proline, ornithine,...).
- elle assure aussi un rôle important dans l'approvisionnement énergétique de la cellule à travers le cycle TCA. Via la synthèse de glutamate par désamination (formation d'une molécule de NH_4^+), la glutamine entre dans le cycle TCA au niveau de l' α -cétoglutarate (αKG). Elle entretient alors le cycle TCA et

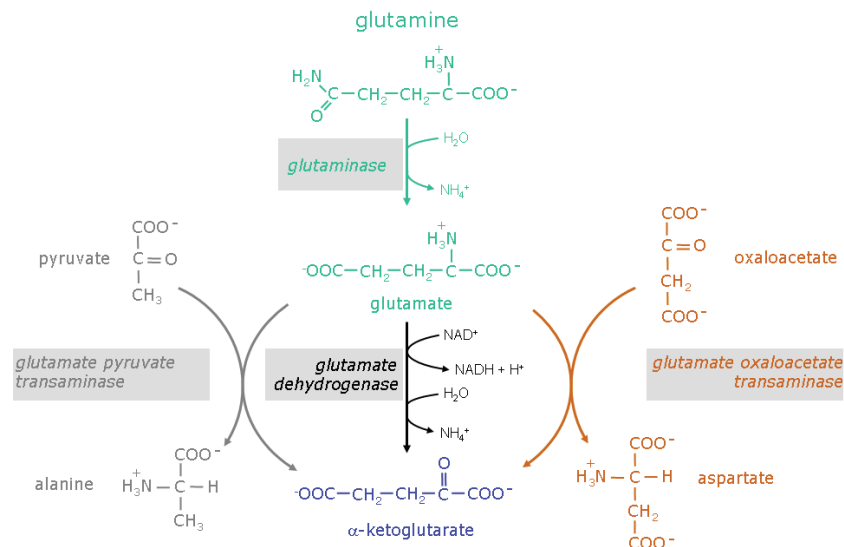


FIGURE 3.6 – Métabolisme de la glutamine (glutaminolyse)

permet la formation de molécules centrales telles que le malate, l'oxaloacétate, l'acétyl-coenzyme A, ...[?]. Le glutamate étant une des espèces principales approvisionnant le cycle TCA, le métabolisme de la glutamine et celui du glucose sont donc interdépendants (figure 3.7).

Bien que le glucose constitue le principal flux de carbone vers la cellule, il semble que ce dernier, une fois entré dans le cycle TCA, soit majoritairement exporté de la mitochondrie avec pour finalité la synthèse lipidique. Il est donc nécessaire de disposer d'un apport de carbone supplémentaire tel que la glutamine pour produire les différents intermédiaires du cycle TCA.

La métabolisation de la glutamine met en jeu un grand nombre de voies métaboliques et d'intermédiaires différents. Ces voies métaboliques sont à la fois mitochondriales et cytosoliques et peuvent interagir les unes avec les autres. La glutaminolyse est donc un phénomène particulièrement complexe qui, en contrepartie, manifeste une grande souplesse et une grande capacité d'adaptation aux conditions de culture.

De la même façon que le glucose, la glutamine est généralement consommée très rapidement ; cette consommation excessive traduit une certaine dérégulation de la

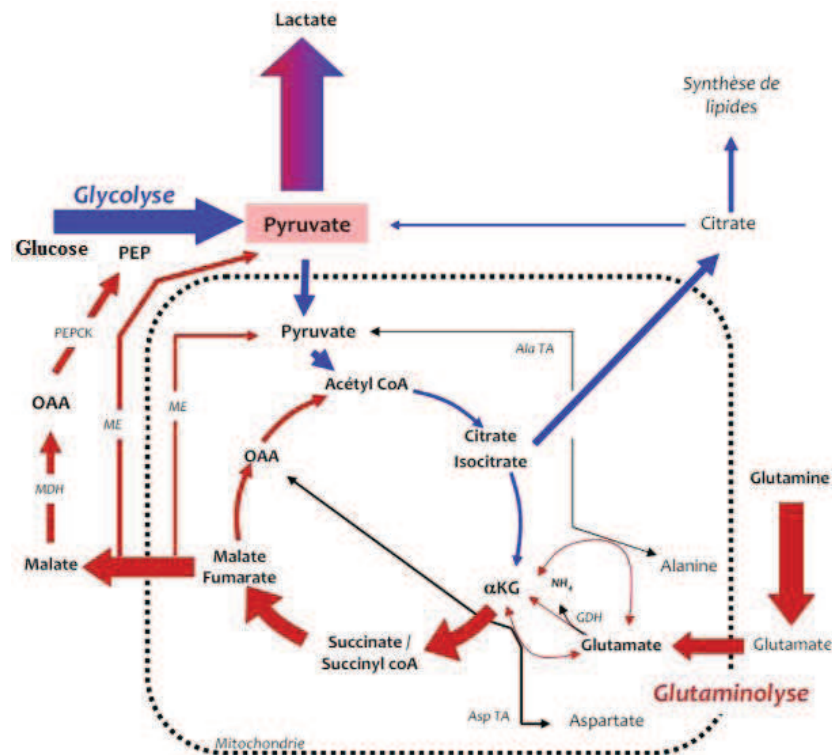


FIGURE 3.7 – Interdépendance du métabolisme du glucose et de la glutamine [?]

cellule. Ceci s'explique par le fort excès de nutriments présents dans les milieux de culture classiques. Tout comme le glucose, elle est aussi, en partie, responsable de l'apparition d'une espèce délétère pour la cellule, puisqu'elle est la principale source de production d'ions ammonium. La littérature montre que dans des milieux de culture faiblement concentrés en glutamine, la vitesse de consommation en glutamine est réduite sans pour autant modifier la croissance cellulaire. Cette dérégulation est généralement accompagnée par l'accumulation importante d'ions ammonium dans le milieu de culture.

3.2.3 Le métabolisme des acides aminés

A l'inverse des procaryotes, les cellules animales ne peuvent synthétiser toutes les branches carbonées ou cycles constitutifs des acides aminés. Certains acides aminés devront donc être présents nécessairement dans le milieu de culture pour permettre

aux cellules mammaliennes de mener à bien leurs fonctions métaboliques. Ces acides aminés essentiels sont l'arginine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane et la valine. Si ces acides aminés ne sont pas apportés directement ou indirectement par le milieu de culture, cela induira le phénomène de mort cellulaire.

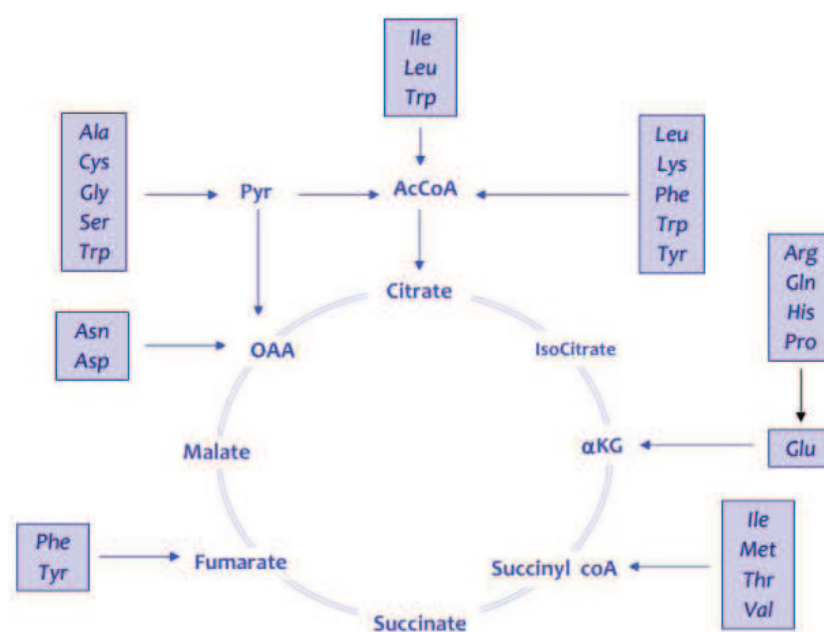


FIGURE 3.8 – Métabolisme des acides aminés [?]

Le schéma suivant (figure 3.8) retrace les interactions principales et clairement identifiées de la majorité des acides aminés avec le métabolisme central de la cellule.

3.3 Le métabolisme des produits

3.3.1 Le métabolisme du lactate

Le lactate est un co-produit du métabolisme du glucose défavorable à la croissance cellulaire. Le lactate présente un caractère néfaste pour trois raisons principales [?] :

- l'effet inhibiteur direct que présente le lactate sur le métabolisme cellulaire ;
- la production de lactate dans les cultures cellulaires est accompagnée d'une acidification du milieu de culture. Ceci implique en pratique une régulation du

- pH du bioréacteur sous peine de ralentir la croissance cellulaire ;
- l’accumulation de lactate induit aussi une augmentation de l’osmolarité du milieu.

Les cellules Vero utilisées dans le cadre de ces expériences sont sensibles à des concentrations de lactate comprises entre 10 et 20 mM [?], alors que d’autres lignées telles que les CHO sont sensibles à des gammes de concentrations supérieures : 40 à 50 mM. Cependant, on constate une grande variation entre cette valeur théorique et les valeurs usuelles en lactate ; cette concentration très élevée n’est quasiment jamais rencontrée dans la pratique.

Les cellules animales semblent aussi présenter en fin de culture un comportement singulier de consommation du lactate initialement produit. Ce phénomène dépend de la concentration et de la nature du glucide présent dans le milieu de culture ; il semblerait aussi qu’il existe une interconnexion possible entre les mécanismes d’apoptose et le métabolisme cellulaire [?].

3.3.2 Le métabolisme des ions ammonium

Tout comme le lactate, les ions ammonium sont des métabolites secondaires issus de la métabolisation, ou encore en moindre proportion de la dégradation spontanée, de la glutamine. Les ions ammonium participent avec le pyruvate, par une réaction de transamination, à la formation de l’alanine [?] ; cette réaction participe ainsi à la détoxification du milieu de culture.

Les effets délétères de l’ammonium sur le métabolisme cellulaire apparaissent à des concentrations bien plus faibles que celles de lactate ; en effet, on commence à voir ses effets inhibiteurs sur une culture de CHO en réacteur fermé à partir de seulement 2 à 4 mM. Les cellules cultivées en continu semblent beaucoup moins sensibles, à concentration en ammonium équivalente, que leurs homologues en réacteur fermé. Une des explications possibles serait qu’une augmentation de la diffusion de NH_3 et qu’une modification de l’équilibre $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ provoquent une modification des pH intracellulaire et extracellulaire [?].

En plus de réduire la prolifération cellulaire, de fortes concentrations d'ions ammonium perturbent aussi le phénomène de production virale. En effet, il a été prouvé que les ions ammonium présentent un effet inhibiteur sur la multiplication du HSV à une concentration supérieure à 50 mM.

Tout comme pour le lactate, un certain nombre de travaux ont contribué à limiter la production d'ions ammonium à travers différentes stratégies présentées dans le paragraphe suivant.

3.4 Une vision d'ensemble du métabolisme cellulaire

Le schéma suivant (figure 3.9) proposé par Emma Petiot [?], résume un certain nombre des informations développées précédemment. Il permet de se rendre compte des voies métaboliques clés ; un tel schéma est un document de travail essentiel si l'on cherche à modéliser les voies métaboliques intracellulaires.

3.5 Amélioration des performances par le contrôle du métabolisme cellulaire

Le fait de placer les cellules dans des milieux de culture pléthoriques, trop riches en substrats carbonés induit une accumulation de produits néfastes situés en fin de chaîne métabolique tels que le lactate et l'ammonium. Pour optimiser les performances en culture cellulaire, il faudra alors veiller à apporter la bonne quantité, le juste équilibre de substrat aux cellules, sans pécher par excès ou par défaut.

Les stratégies de rééquilibrage du métabolisme cellulaire sont diverses :

- optimiser les apports en substrats vers la cellule. Une solution possible, dans le cas des cultures en continu et en semi-continu, est ainsi de veiller à conserver à chaque instant de faibles concentrations de glucose et de glutamine dans le milieu de culture, de manière à réduire les flux d'entrée.
- substituer le glucose et la glutamine par d'autres substrats carbonés dont le transfert et/ou la consommation sont plus lents. Ainsi remplacer la glutamine

3. Quelques notions sur le métabolisme des cellules animales

3.5. Amélioration des performances par le contrôle du métabolisme cellulaire

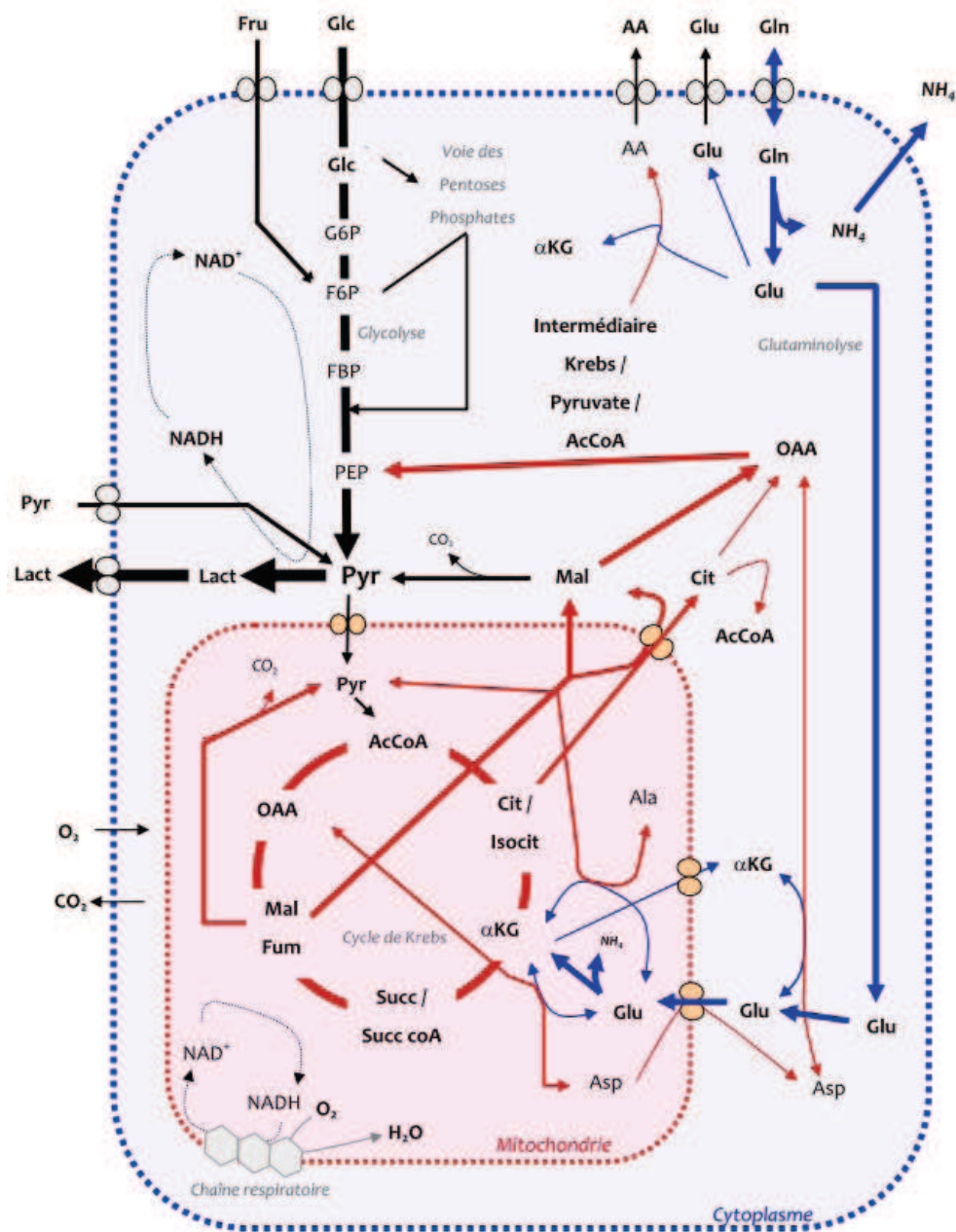


FIGURE 3.9 – Aperçu schématique du métabolisme de la cellule Vero [?]

par de l'asparagine ou du glutamax et le glucose par du galactose ou du fructose permet de limiter et contrôler dans le temps les apports de la cellule [?]. Parmi les principaux substrats de substitution du glucose, on trouve : le thrélose, le

3. Quelques notions sur le métabolisme des cellules animales

3.5. Amélioration des performances par le contrôle du métabolisme cellulaire

turanose, le D-glucose-6-Phosphate, le D-glucose-1-Phosphate, le D-fructose², le D-galactose, le D-mannose, le cellobiose, le mélibiose, le sorbitol, le D-talose, le D-xylose, le D-ribose, ... Concernant la glutamine, on trouve : le glutamate, l'asparagine, le glutamax[®]³, le pyruvate, d'autres peptides, ... Ces 2 alternatives permettent, en réduisant la vitesse d'approvisionnement en nutriments, de nourrir la cellule par « perfusion ».

- une modification du métabolisme à la source en jouant notamment sur les activités enzymatiques. Des lignées cellulaires déficientes en lactate déshydrogénase ou en protéines de transport, générant par conséquent moins de lactate, devraient en théorie présenter un intérêt pratique en ayant une phase de croissance prolongée. Bien que cette approche soit conceptuellement intéressante, les cellules ayant subi des modifications génétiques souffrent parfois d'un inconvénient de taille, à savoir, leur manque de stabilité.

2. Le fructose par exemple traverse beaucoup moins vite la membrane cellulaire que le glucose

3. Le glutamax est un dipeptide qui subit une hydrolyse pour redonner de l'alanine et de la glutamine, avec une cinétique d'hydrolyse qui lui est propre

Deuxième partie

Élaboration d'un modèle cinétique de croissance

Chapitre 4

Quelques éléments de cinétique biologique

Il est possible d'exprimer les cinétiques de culture de manière simplifiée à l'aide de quelques équations simplifiées et de quelques paramètres choisis. Ce chapitre se propose de revenir sur les définitions des principales variables et sur les variations que l'on peut envisager dans les expressions mathématiques en fonction des hypothèses choisies.

4.1 Paramètres cinétiques et relations de base

4.1.1 Quelques définitions

On définit respectivement X_T , X_V et X_M comme étant les concentrations en cellules totales, viables et mortes.

On peut aisément, à partir de ces trois termes, accéder aux vitesses de croissance et de décès cellulaire, en écrivant les bilans de matière en réacteur fermé (eq. 4.1, 4.2) :

$$Fluxd'entree + Production = Fluxdesortie + Accumulation + degradation \quad (4.1)$$

4. Quelques éléments de cinétique biologique

4.1. Paramètres cinétiques et relations de base

Soit en réacteur fermé (par définition) :

$$Production = Accumulation \quad (4.2)$$

Et appliqué à notre problématique précise (eq. 4.3, 4.4) :

$$r_X = \frac{dX_V}{dt} \quad (4.3)$$

$$r_M = \frac{dX_M}{dt} \quad (4.4)$$

avec :

X_V et X_M , les concentrations cellulaires en cellules viables et mortes, en 10^5 cellules.mL⁻¹
 dt , un intervalle de temps, en h

r_X et r_M , les vitesses volumiques de croissance et de décès cellulaire, en 10^5 cellules.mL⁻¹.h⁻¹

Les vitesses spécifiques de croissance et de décès cellulaires peuvent être définies par les équations 4.5 et 4.6 :

$$\mu_{reel} = \frac{r_X}{X_V} \quad (4.5)$$

$$k_M = \frac{r_M}{X_V} \quad (4.6)$$

avec :

μ_{reel} et k_M , les vitesses spécifiques de croissance et de décès, en h^{-1}

En pratique il est aussi possible de réunir ces 2 derniers termes et de travailler avec un μ apparent. La vitesse spécifique de croissance apparente, μ_{app} , correspondant à la vitesse spécifique de croissance vraie (eq. 4.5), de laquelle vient se déduire la vitesse spécifique de décès (eq. 4.6) :

$$\mu_{app} = \mu_{reel} - k_M = \frac{dX_V}{dt} \frac{1}{X_V} \quad (4.7)$$

4. Quelques éléments de cinétique biologique

4.1. Paramètres cinétiques et relations de base

avec :

X_T , la concentration cellulaire totale, en 10^5 cellules.mL⁻¹

μ_{app} , le taux de croissance apparent, lui aussi exprimé en h^{-1}

Dans le cadre de notre étude, nous n'avons pas quantifié le phénomène de mort cellulaire, par conséquent il sera impossible d'accéder aux valeurs chiffrées de k_M . C'est donc cette dernière variable globale μ_{app} que nous utiliserons pour caractériser la croissance de nos cellules.

Initialement, on définit un rendement instantané (eq. 4.8) :

$$Y_{X/Z} = \frac{r_X}{r_Z} \quad (4.8)$$

Puis sous l'hypothèse d'un rendement $Y_{X/Z}$ constant, on estime ce rendement :

– soit à partir d'une mesure locale (eq. 4.9) :

$$Y_{X/Z} \approx \frac{\frac{dX}{dt}}{\frac{dZ}{dt}} \quad (4.9)$$

– soit à partir d'une mesure globale.

En admettant que la consommation de substrats est dépendante de la concentration cellulaire, il est possible de définir des rendements cellules / substrats :

Rendement cellule / glucose globaux :

$$Y_{X_V/Glc} = \frac{X_V - X_{V_0}}{Glc_0 - Glc} \quad (4.10)$$

Rendement cellule / glutamine :

$$Y_{X_V/Gln} = \frac{X_V - X_{V_0}}{Gln_0 - Gln} \quad (4.11)$$

De la même manière, il est aussi possible de relier les concentrations en produits formés aux concentrations de substrats consommés, sous l'hypothèse que les produits ne proviennent que des substrats :

4. Quelques éléments de cinétique biologique

4.1. Paramètres cinétiques et relations de base

Rendement ammonium / glutamine :

$$Y_{Ammo/Gln} = \frac{Ammo - Ammo_0}{Gln_0 - Gln} \quad (4.12)$$

Rendement lactate / glucose :

$$Y_{Lact/Glc} = \frac{Lact - Lact_0}{Glc_0 - Glc} \quad (4.13)$$

avec :

$[S]$ et $[P]$, les concentrations en substrats et produits, en g.L^{-1}

$[S]_0$ et $[P]_0$, les concentrations initiales en substrats et produits, en g.L^{-1}

$Y_{X/S}$ et $Y_{P/S}$, les constantes de rendement¹

Bien que l'on utilise le terme de « rendement », il convient de garder à l'esprit que ces valeurs ne sont pas des rendements *stricto sensu*. En effet, dans le cas où le substrat ne compte que pour une fraction minime de la biomasse, ces rendements dépasseront les 100%.

L'utilisation de ces rendements pour quantifier la croissance de nos cellules implique d'accepter une hypothèse fondamentale, à savoir la constance des rendements durant la culture. Cette hypothèse du rendement constant suppose que la biomasse produite est proportionnelle au substrat consommé. L'hypothèse du rendement constant suppose qu'une fraction constante de substrat limitant est convertie en biomasse au cours de la croissance ; dans le cas inverse, on ne peut qu'accéder à des rendements instantanés. La traduction graphique de cette hypothèse est représentée en figure 4.1 : l'évolution de l'état du système se fait en suivant une droite.

4.1.2 Système d'équations final

A partir des bilans (eq. 4.1, 4.2), des modèles de croissance (eq. 4.3, 4.4, 4.7) et des rendements précédents (eq. 4.10, 4.11, 4.12, 4.13), il est possible de formuler les

1. Les unités des rendements sont variables en fonction du type de rendement : en $10^5 \text{cellules.mL}^{-1}.\text{g}_S^{-1}$, ou en $\text{g}_P.\text{g}_S^{-1}$

4. Quelques éléments de cinétique biologique

4.1. Paramètres cinétiques et relations de base

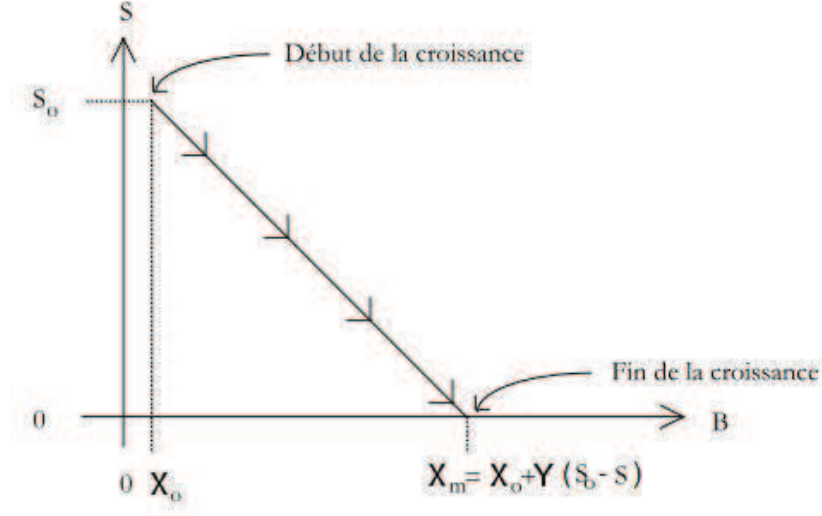


FIGURE 4.1 – L'hypothèse du rendement constant [?]

vitesses de consommation et de production sous la forme d'un système d'équations différentielles (eq. 4.17 à 4.21).

$$\frac{dX_V}{dt} = +r_{X_V} \quad \text{avec} \quad r_{X_V} = \mu_{app} X_V \quad (4.14)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -r_S \quad \text{avec} \quad r_S = \frac{1}{Y_{X_V/S}} r_{X_V} \quad (4.15)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = r_P \quad \text{avec} \quad r_S = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X_V/S}} r_{X_V} \quad (4.16)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dX_V}{dt} = \mu_{app} X_V \end{array} \right. \quad (4.17)$$

$$\frac{d[Glc]}{dt} = -\frac{1}{Y_{X_V/Glc}} \mu_{app} X_V \quad (4.18)$$

$$\frac{d[Gln]}{dt} = -\frac{1}{Y_{X_V/Gln}} \mu_{app} X_V \quad (4.19)$$

$$\frac{d[Ammo]}{dt} = \frac{Y_{Ammo/Gln}}{Y_{X_V/Gln}} \mu_{app} X_V \quad (4.20)$$

$$\frac{d[Lact]}{dt} = \frac{Y_{Lact/Glc}}{Y_{X_V/Glc}} \mu_{app} X_V \quad (4.21)$$

C'est ce système d'équations différentielles qui servira de base constitutive aux travaux de modélisation ; comme nous allons le voir par la suite, il est possible d'envisager des variations permettant d'ajuster *in fine* la pertinence du modèle.

4.2 Les variations autour du taux de croissance

Parmi les solutions les plus courantes pour exprimer un taux de croissance, on trouve deux alternatives principales, à savoir l'expression de Monod et l'expression de Andrews.

4.2.1 L'expression de Monod

Le modèle a été proposé par Monod pour la première fois en 1941 pour rendre compte de la croissance des micro-organismes. Il s'agissait, à l'origine, de modéliser cette croissance en mode de croissance discontinu, à partir du trouble créé par le développement bactérien.

Cette expression de base est la plus connue pour proposer une première approche simplifiée de la croissance cellulaire ; cette relation se propose de lier la vitesse spécifique de croissance cellulaire aux concentrations en substrats dans une expression qui contient deux paramètres : μ_{max} et K_S . Cette équation n'est pas sans rappeler, dans son formalisme, l'équation de Michaelis-Menten. Ainsi, en supposant les rendements constants par rapport aux substrats, la loi de Monod s'écrit de la manière suivante (eq. 4.22) :

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{[S]}{[S] + K_S} \right) \quad (4.22)$$

avec :

μ la vitesse spécifique de croissance ($[\text{temps}]^{-1}$)

μ_{max} la vitesse spécifique maximale de la période étudiée ($[\text{temps}]^{-1}$)

$[S]$ la concentration en substrat (mmol.L^{-1})

K_S la concentration en substrat à demie-saturation (mmol.L^{-1})

La vitesse spécifique de croissance pouvant être dépendante simultanément de plusieurs substrats, il est tout à fait possible de proposer un terme de Monod dit "double" (eq. 4.23), proposé initialement par *McGee et al.* [?], selon :

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{[S_1]}{[S_1] + K_{S_1}} \right) \left(\frac{[S_2]}{[S_2] + K_{S_2}} \right) \quad (4.23)$$

où S_1 et S_2 sont 2 substrats présents dans le milieu.

4.2.2 L'expression de Andrews/Haldane

Il existe un grand nombre d'autres modèles, se situant dans la continuité du modèle de Monod, et censés représenter des phénomènes biologiques plus complexes, tels que des phénomènes d'inhibition (compétitive, non compétitive) ou de synergie. Un des plus connus pour représenter un effet inhibiteur de l'un des substrats à l'égard de la croissance est l'équation de Haldane proposée par Andrews (eq. 4.24) :

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{[S]}{K_S + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}} \right) \quad (4.24)$$

avec :

K_S la concentration de substrat à demie-saturation (mmol.L⁻¹)

et K_I la constante d'inhibition (mmol.L⁻¹)

Une constante d'inhibition élevée rapprochera les résultats fournis par ce modèle à ceux du modèle de Monod.

4.2.3 Autres possibilités

Outre Monod, Andrews, beaucoup d'autres modèles existent et peuvent s'appliquer à la culture cellulaire². Ces modèles utilisés pour des applications variées (action enzymatique, dépollution,...) peuvent potentiellement constituer de bonnes sources d'inspiration. Un certain nombre de ces modèles sont conçus spécifiquement pour décrire des phénomènes de synergie et d'inhibition bien particuliers. Le tableau

2. Le modèle de Contois est un notamment un autre modèle assez fréquemment utilisé en culture de cellules animales

4. Quelques éléments de cinétique biologique

4.2. Les variations autour du taux de croissance

4.2 suivant décrit de manière non exhaustive quelques unes de ces formulations envisageables pour la modélisation.

No.	$\frac{dx}{dt}$	$\frac{dP}{dt}$	$\frac{dS}{dt}$	Model
1	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{s,s} + S} \right) x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{s,p} + S} \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/s}} \frac{dx}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$	Monod
2	$\mu_{\max} \left(\frac{S^n}{K_{s,s} + S^n} \right) x$	$q_{\max} \left(\frac{S_p}{K_{s,p} + S_p} \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/s}} \frac{dx}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$	Moser
3	$\mu_{\max} \left(1 - \exp \left(-\frac{S}{K_{s,s}} \right) \right) x$	$q_{\max} \left(1 - \exp \left(-\frac{S}{K_{s,p}} \right) \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/s}} \frac{dx}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$	Teissier
4	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{1 + \frac{K_{s,s}}{S} + \frac{S}{K_{L,S}}} \right) x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{1 + \frac{K_{s,p}}{S} + \frac{S}{K_{L,P}}} \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/s}} \frac{dx}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$	Andrews and Noack
5	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{s,s} + S} \right) \exp \left(-\frac{S}{K_{L,S}} \right) x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{s,p} + S} \right) \exp \left(-\frac{S}{K_{L,P}} \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/s}} \frac{dx}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$	Aiba
6	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{s,s} + S} \right) \left(1 - \frac{S}{S_{s,\max}} \right)^n x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{s,p} + S} \right) \left(1 - \frac{S}{S_{p,\max}} \right)^n x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/s}} \frac{dx}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$	Luong
7	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{s,s} + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{s,\max}} \right)^n x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{s,p} + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{p,\max}} \right)^n x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/s}} \frac{dx}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$	Levenspiel
8	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{s,s} + S} \right) \exp(-K_{p,s} P) x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{s,p} + S} \right) \exp(-K_{p,p} P) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/s}} \frac{dx}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$	Aiba
9	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{s,s} + S} \right) \left(\frac{K_{L,P}}{K_{L,P} + P} \right) x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{s,p} + S} \right) \left(\frac{K_{L,P}}{K_{L,P} + P} \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/s}} \frac{dx}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$	Jerusalimsky
10	$\mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_{s,\max}} \right) x$	$q_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_{p,\max}} \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/s}} \frac{dx}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$	Ghose and Tyagi
11	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{s,s} + S} \right) (1 - K_{p,s} P) x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{s,p} + S} \right) (1 - K_{p,p} P) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/s}} \frac{dx}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$	Hinshelwood

FIGURE 4.2 – Tableau récapitulatif de différentes variations autour du taux de croissance [?]

Il faut cependant prendre ces publications avec précaution ; en effet, depuis Monod, on assiste à une prolifération impressionnante de modèles. Mais, dans le domaine des avatars du modèle de Monod, et à l'exception de Contois (1959) et Andrews (1968) qui ont connu un succès certain, il existe de nombreuses généralisations gratuites restées sans lendemain avec un impact négligeable sur la communauté scienti-

4. Quelques éléments de cinétique biologique

4.3. Variations autour des vitesses spécifiques de consommation ou de production

fique [?].

4.3 Variations autour des vitesses spécifiques de consommation ou de production

Les vitesses de consommation et de production correspondent aux bilans de matière formulés précédemment. Beaucoup d'articles de la littérature, affinent ces termes de consommation et de production en y ajoutant notamment un terme de maintenance cellulaire (eq. 4.18 à 4.21).

$$\left\{ \begin{array}{l} \Delta S = \Delta S(\text{croissance}) + \Delta S(\text{maintenance}) \end{array} \right. \quad (4.25)$$

$$r_S = \frac{1}{Y_{Glc/X_V}} r_X + m X_V \quad (4.26)$$

$$q_S = \frac{1}{Y_{Glc/X_V}} \mu + m \quad (4.27)$$

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{q_S}{\mu} = \frac{1}{Y_G} + \frac{m}{\mu} \quad (4.28)$$

avec :

r_S , la vitesse de consommation en substrat, en mM.h^{-1} ³

q_S , la vitesse spécifique de consommation, en $\text{g}_S \cdot \text{g}_{\text{biomasse}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

Y_{Glc/X_V} , le rendement de croissance, en $10^5 \text{cellules.mL}^{-1}$

m , le terme de maintenance cellulaire

Il est aussi possible d'associer une expression spécifique à la production cellulaire. La plus connue est celle de Luedeking-Piret (eq. 4.22 à 4.23). Elle se décompose en 2 termes principaux : un associé à la croissance (facteur α) et un second indépendant de la croissance (facteur β). La plupart du temps, la production est couplée à la croissance en début de culture, puis devient indépendante de la croissance dans un

3. ou équivalent

4. Quelques éléments de cinétique biologique

4.3. Variations autour des vitesses spécifiques de consommation ou de production

second temps.

$$\begin{cases} r_P = \alpha r_X + \beta X_V & (4.29) \\ q_P = \alpha \mu + \beta & (4.30) \end{cases}$$

avec :

r_P , la vitesse de production, en mM.h^{-1}

q_P , la vitesse spécifique de production, en $\text{g}_P \cdot \text{g}_{\text{biomasse}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

α et β , des constantes

Par ailleurs, plusieurs publications présentent ces vitesses spécifiques sous une forme polynômiale en déterminant les coefficients via une régression. Cette approche, bien qu'offrant de bons résultats mathématiquement parlant, réduit la validité du modèle par une perte d'informations significative et va ainsi à l'encontre de la logique mise en place dans nos travaux.

Dans notre étude, nous nous sommes concentrés sur les variations concernant l'expression de la vitesse spécifique de croissance et non sur celles concernant les vitesses de consommation ou de production.

Chapitre 5

La phase de modélisation expérimentale

Ce chapitre est consacré à une discussion générale sur la modélisation mathématique des bioprocédés. Il permet, d'une part, d'introduire un certain nombre de concepts qui serviront plus précisément dans le chapitre suivant et d'autre part, d'esquisser le contexte général dans lequel ce travail de modélisation s'opère.

Ce chapitre se veut sensibilisant et informatif, mais en aucun cas exhaustif, vis-à-vis d'une thématique relativement éloignée de la formation de pharmacien.

5.1 Les modèles mathématiques

5.1.1 Définition

Dans son sens scientifique général, un modèle est une représentation ou une description d'un aspect du monde réel auquel on s'intéresse. Le modèle permet d'appréhender de manière simplifiée les principes généraux des phénomènes physiques ou biologiques étudiés. Dans la mesure où un modèle permet, en plus de qualifier un phénomène, de le quantifier, on utilise l'expression de "modèle mathématique".

Dans notre cas, le modèle sera un modèle cinétique s'exprimant par un ensemble de fonctions mathématiques qui rendent compte du mieux possible de la croissance, du décès, du métabolisme cellulaires, ainsi que de l'évolution de la composition du

milieu de culture.

5.1.2 Pourquoi utiliser un modèle mathématique ?

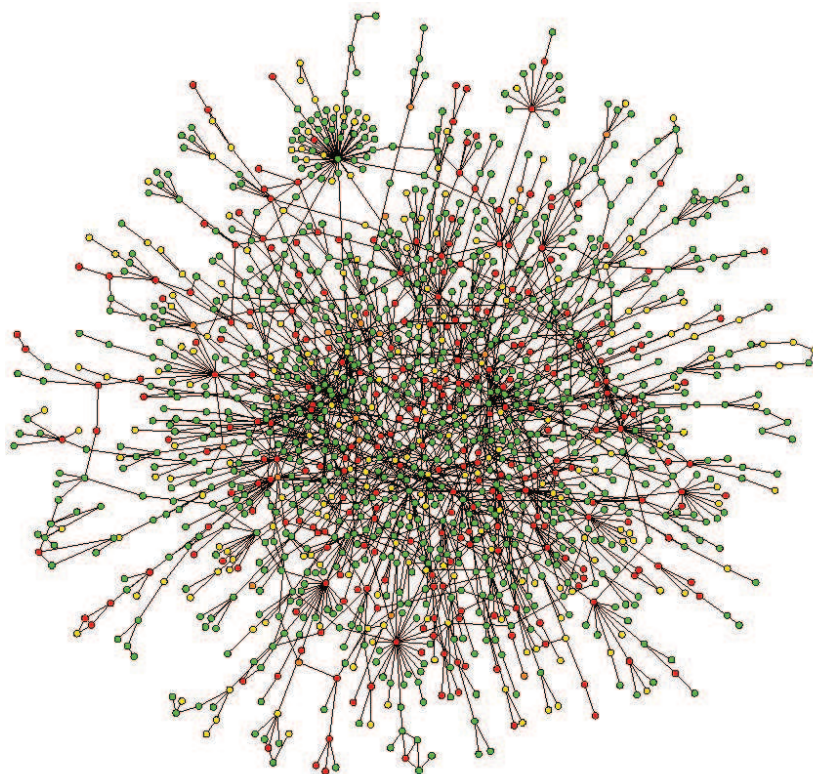


FIGURE 5.1 – Cartographie du réseau de régulation protéine-protéine chez la levure [?]

La figure 5.1 propose une cartographie des interactions protéine-protéine chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae* ; cette cartographie, qui ne présente que la partie visible du réseau de régulations d'un organisme unicellulaire, est déjà d'une rare complexité. Bien évidemment, cette complexité sera d'autant plus importante pour les cellules animales. On comprend aisément que, face à des systèmes biologiques aussi complexes, il est indispensable de posséder des outils permettant de simplifier les raisonnements.

Ces outils conduisent à une première compréhension de systèmes très complexes et deviennent le moyen de jeter un pont entre les niveaux d'organisation cellulaire et

les niveaux macroscopiques. Ces modèles, qui placent la cellule en position centrale, permettront ainsi de modéliser le procédé de culture.

Outre l'intérêt schématisé et descriptif que propose le modèle, la modélisation d'un procédé de production de produits pharmaceutiques présente plusieurs autres objectifs plus pratiques. Ils permettent aussi [?] :

- d'aider l'utilisateur à la prise de décision grâce aux vertus prédictives du modèle ;
- d'optimiser et d'améliorer les performances du procédé ;
- de contrôler les variations du système en anticipant les dysfonctionnements trop importants ;
- de tester, puis de valider ou d'infirmer certaines hypothèses.

Ce dernier point est particulièrement intéressant ; en effet, dans le cadre de modèles reposant sur des hypothèses, le fait qu'un modèle traduise bien la réalité permet de valider les hypothèses préalablement formulées¹.

5.1.3 Qualités et limites de la modélisation

Il est important de comprendre que la complexité mathématique n'est pas un critère suffisant en soi pour juger de la pertinence d'un modèle. À résultat comparable, on préférera bien sûr le modèle dont le formalisme est le plus simple.

Un modèle sera jugé comme pertinent, notamment :

- s'il couvre bien le champ du problème réel et s'il est capable de s'adapter aux variations expérimentales ;
- s'il permet d'obtenir le résultat escompté (description du phénomène avec le niveau de précision souhaité ou prévisions se révélant justes à posteriori).

La précision et l'adaptabilité du modèle sont deux notions en opposition. Il faudra veiller à définir au plus juste le champ d'application du modèle pour atteindre le meilleur résultat, compromis entre précision et capacité d'adaptation [?].

Il faut néanmoins rester conscient que les modèles sont des vues de l'esprit, don-

1. Ou tout du moins de supposer que ces hypothèses sont partiellement vraies

nant seulement un aperçu de la réalité. Selon le statisticien George Box : « Tous les modèles sont faux, certains sont utiles ».

5.2 Les différents types de modèles

Avant d'aborder les grandes classes de modèles mentionnés dans la littérature concernant spécifiquement les bioprocédés, il apparaît utile de citer quelques caractéristiques de base des modèles, au sens tout à fait général de la théorie des systèmes [?].

5.2.1 Modèles de type « boîte noire » ou modèles phénoménologiques

On caractérise de « boîte noire » les modèles dépourvus de toute interprétation physique ou biologique. Le principe est alors de calquer sur un système une expression purement mathématique dénuée de signification, telle qu'un polynôme de degré n ou un réseau de neurones. A l'inverse les modèles phénoménologiques, qualifiés par opposition de « boîte blanche », sont des modèles dans lesquels les équations traduisent les phénomènes physiques, chimiques ou biologiques dans le système. La figure 5.2 illustre l'opposition, tant dans la démarche, que dans la finalité, qui peut exister entre ces deux types de modèles.

5.2.2 Modèles comportementaux et modèles fonctionnels

Alors que les modèles comportementaux s'attachent à identifier les liens remarquables entre les variables d'entrée et de sortie à la façon d'un modèle boîte noire, les modèles fonctionnels tentent de décrire le fonctionnement intrinsèque du système ; ils s'appuient donc sur une description bien plus détaillée de la cellule. Ainsi des modèles tendant à décrire le comportement « macroscopique » des cellules à l'aide d'expressions de Monod ne tenant pas compte du métabolisme seront des modèles strictement comportementaux. A l'inverse, des modèles basés sur une description, même simplifiée, du métabolisme interne de la cellule seront classés comme étant

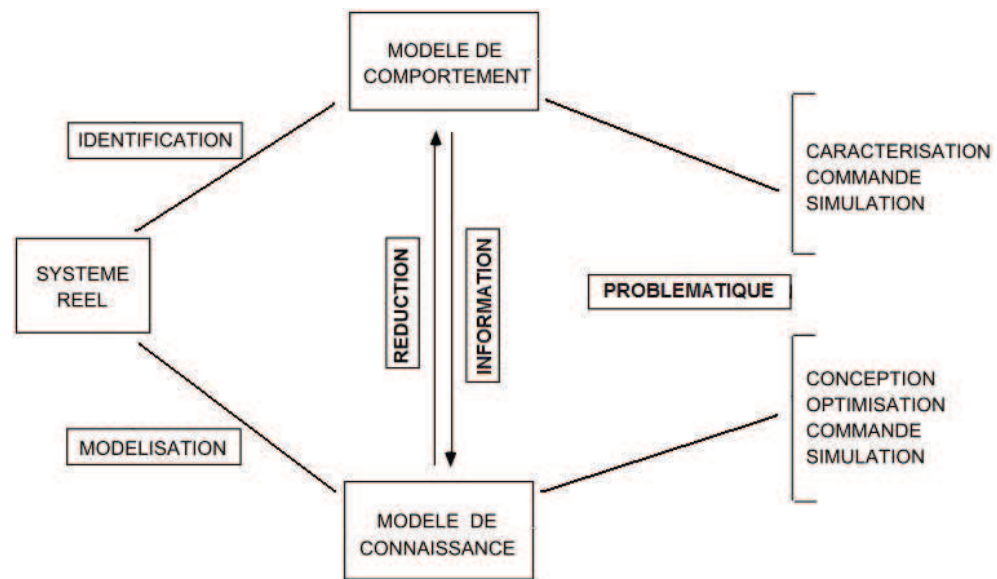


FIGURE 5.2 – Schématisation des divergences entre modèles comportementaux et fonctionnels [?]

des modèles fonctionnels ; on parle aussi de modèles « structurés ». Cette distinction est à rapprocher de celle présentée précédemment entre « boîte noire » et « boîte blanche ».

5.2.3 Modèles globaux et modèles locaux

Les modèles locaux s'attachent à décrire une application particulière, alors que les modèles globaux tentent de représenter structurellement un champ d'application le plus large possible. Un modèle sera d'autant plus général qu'il sera capable de reproduire le comportement des cultures d'un champ expérimental étendu. Il est évident que plus un modèle détaille de façon précise le métabolisme cellulaire et les conditions opératoires, plus il risque d'être spécifique à une lignée cellulaire et à une situation expérimentale donnée.

Après avoir passé en revue les caractéristiques générales des modèles mathématiques de manière générale, le paragraphe suivant s'intéresse aux qualificatifs typiquement destinés à la culture cellulaire.

5.3 La modélisation appliquée à la culture cellulaire

La modélisation de culture cellulaire existe maintenant depuis plusieurs dizaines d'années ; par conséquent, il s'est développé un vocabulaire propre concernant la modélisation des bioprocédés. Un modèle est dit structuré lorsqu'il prend en compte les paramètres intérieurs à la cellule et non structuré s'il considère la cellule comme un compartiment unique, comme une entité, sans se soucier de sa structure interne.

Par ailleurs un modèle est dit ségrégué s'il tient compte des hétérogénéités au sein de la population cellulaire (ex : position dans le cycle cellulaire, taille des cellules, ...) et non ségrégué s'il considère la population parfaitement homogène.

Cette classification, proposée en 1966 par *Tsuchiya et al.* [?], aboutit au tableau 5.1 ; malgré son âge, elle est encore relativement utilisée dans la littérature aussi bien pour des supports bactériens, que pour des levures ou des cellules animales [?].

Modèles	Non ségrégués	Ségrégués
Non structurés	Population cellulaire homogène ; cellule mono-composant	Population cellulaire hétérogène ; cellule mono-composant
Structurés	Population cellulaire homogène ; cellule multi-composants	Population cellulaire hétérogène ; cellule multi-composants

TABLE 5.1 – La classification de Fredrickson [?]

Nous avons mis en pratique deux types différents de modèles dans le cadre de ce travail.

5.3.1 Les modèles non structurés, non ségrégués

Les modèles non structurés, non ségrégués sont les plus simples à imaginer. Dans ces modèles, la cellule est considérée comme un compartiment (figure 5.3), et l'on essaye de relier les facteurs entrants et sortants entre eux.

Ce type de modèle offre généralement une bonne souplesse et permet l'obtention d'un modèle assez robuste, reflet très simplifié du procédé, qui peut être extrapolé

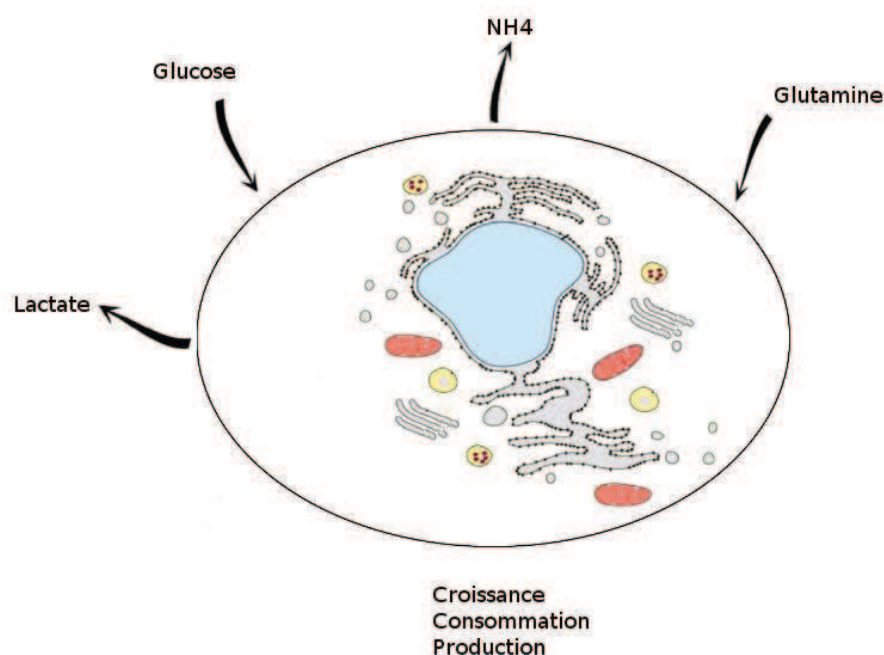


FIGURE 5.3 – Les différentes espèces entrant en jeu dans l’approche de modélisation non structurée

et transposé à des systèmes de plus grande taille. Un des défis de ces modèles est d’arriver à prédire à l’aide d’un seul jeu de paramètres l’ensemble des phases et des phénomènes de nature complexe. Un certain nombre de phénomènes connexes basés sur des connaissances peuvent être intégrés dans ce système pour affiner le modèle : il s’agit par exemple du phénomène de mort cellulaire, de maintenance cellulaire ou encore de la production de métabolites secondaires.

5.3.2 Les modèles structurés, non ségrégés

Devant les erreurs de prédiction constatées dans le cadre des modèles non structurés, l’idée de modéliser le fonctionnement interne de la cellule peut être une alternative intéressante. Ces modèles passent par une ébauche simplifiée des mécanismes intracellulaires. Cela permettra d’introduire dans le modèle de nouveaux concepts permettant peut être d’affiner ce dernier.

Suite aux recherches bibliographiques menées sur les cellules mammaliennes, on

s'aperçoit qu'une espèce possède un rôle central dans le métabolisme cellulaire ; il s'agit du pyruvate. Effectivement, comme le précise le paragraphe 3.2.1, le pyruvate fait le lien entre le substrat principal (glucose), l'espèce que l'on suppose inhibitrice de croissance (lactate) et le système énergétique de la cellule (cycle de Krebs) ; par ailleurs, il se trouve à la jonction des voies métaboliques des substrats carbonés et azotés. C'est aussi le "dénominateur commun" entre les différents substituts hydrocarbonés que l'on peut administrer à la cellule en alternative au glucose (figure 5.4).

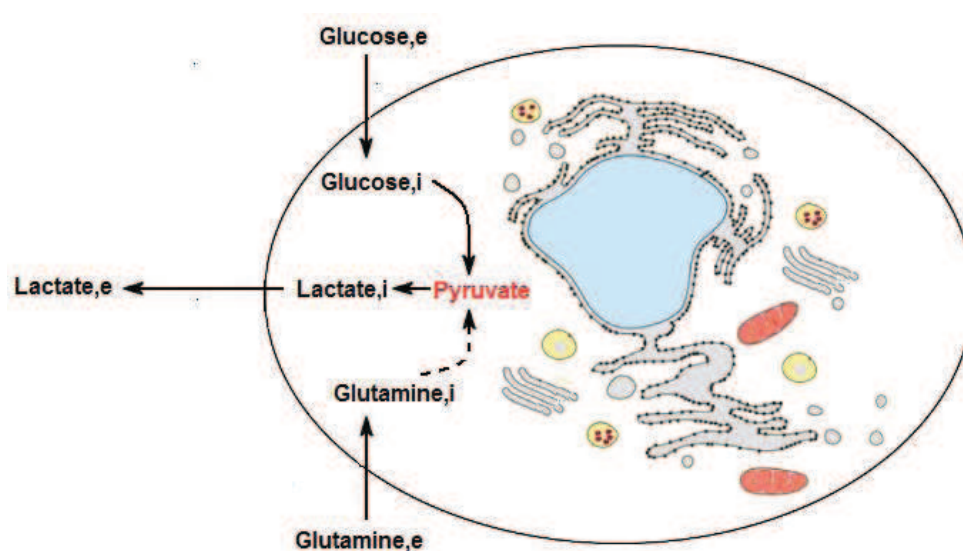


FIGURE 5.4 – Représentation simplifiée du métabolisme intracellulaire [?]

Le principe de ce modèle est simple ; on divise la cellule en deux compartiments intracellulaire et extracellulaire, lesquels sont reliés par des bilans sur les différentes espèces. Par conséquent, le glucose, la glutamine et le lactate feront l'objet de deux phénomènes différents :

- le transport des nutriments d'un compartiment vers un autre, parfois exprimé à l'aide de la loi de Michaelis-Menten ;
- la transformation des substrats en produits, à nouveau exprimée à l'aide des rendements Y ;
- la participation à la croissance cellulaire ;
- le transport des produits en sens inverse des substrats.

Plus le niveau de détail est élevé, plus on quitte le domaine des modèles comportementaux pour se diriger vers celui des modèles fonctionnels. Ces modèles complexes font ainsi intervenir un certain nombre de paramètres à optimiser dans les bilans de matière. Il existe plusieurs grands courants de modélisation structurée : la théorie des systèmes biochimiques de Savageau, l'analyse du contrôle métabolique de Westerhoff ou encore les modèles cybernétiques de Ramkrishna.

5.4 La démarche de modélisation pas à pas

La mise en place d'un modèle cinétique est une réalisation longue qui s'intègre du début à la fin de la démarche expérimentale ; les différentes étapes de réalisation d'un modèle peuvent être résumées de la manière suivante [?], [?] :

- la définition des objectifs de la modélisation² ;
- le choix de la nature du modèle à établir ;
- une réflexion sur les paramètres d'intérêt à intégrer dans le modèle ;
- la formulation d'un plan d'expérience adapté ;
- le traitement des résultats expérimentaux ;
- la formulation des hypothèses et la proposition des différentes équations du modèle (expression du taux de croissance, du taux de décès et des bilans de matière) ;
- l'identification paramétrique, qui correspond à « l'optimisation » et au calcul des paramètres ;
- de nombreux "aller-retours" entre le modèle et les expressions théoriques, avec l'acquisition d'informations expérimentales et, en parallèle, une discussion des hypothèses ;
- la validation du modèle par un test des capacités prédictives du modèle sur de nouvelles valeurs expérimentales.

2. En effet, la construction du modèle sera fonction des objectifs visés

5.5 La mise en œuvre de la modélisation et l'utilisation de l'outil informatique

Dans le but d'obtenir la meilleure adéquation possible entre notre modèle et la réalité, il convient de déterminer les paramètres de fonctionnement de notre modèle qui minimisent l'erreur entre les grandeurs prédites et observées. Pour ce faire, on utilise un programme d'optimisation basé sur un algorithme évolutionniste. Le principe de ces algorithmes, conceptuellement intéressant, sera détaillé dans l'annexe ??.

Sans rentrer dans les détails, l'objectif de cet algorithme informatique est d'obtenir un jeu de coefficients optimaux permettant de rapprocher au mieux la courbe théorique du modèle, des points expérimentaux. De la même manière que pour une régression linéaire, cet algorithme évalue la somme des écarts quadratiques (eq. 5.1) et tend à minimiser cette valeur.

$$J = \sum_{\text{especes}} \left(\sum_{\text{nbpts}} \left(\frac{(X_{theo} - X_{exp})^2}{X_{exp}} \right) \right) \quad (5.1)$$

Cette méthode est particulièrement efficace et permet, si les paramètres de fonctionnement sont judicieusement choisis, de converger vers l'optimum global.

C'est Matlab[®] qui a été choisi pour développer cet algorithme. Matlab[®] est à la fois un environnement de développement ainsi qu'un langage de programmation indépendant. Matlab[®] possède un grand nombre de boîtes à outils permettant d'utiliser des fonctions utiles pour le traitement et l'analyse des informations.

Chapitre 6

Un exemple illustré de la démarche de modélisation

Ce chapitre se propose de montrer pas à pas et à travers des graphiques la démarche de modélisation présentée précédemment. Pour ce faire, il se focalise sur les modèles non structurés et montre comment, à partir de cinq modèles construits sur des hypothèses différentes, on peut identifier le modèle le meilleur et le plus pertinent.

L'accent sera mis plus particulièrement sur la démarche globale et son esprit, plus que sur les résultats expérimentaux eux-mêmes.

6.1 Description des données brutes

Les résultats présentés dans cette thèse sont les résultats expérimentaux obtenus par Mademoiselle Emma Petiot dans le cadre de sa thèse réalisée au LSGC [?]. Les cultures cellulaires en question étaient des cultures de cellules Vero en spinner (figure 6.1) ; ces cellules étaient cultivées en milieu sans sérum, sur microporteurs¹, à 37 °C et pour une vitesse de rotation de 45 rpm. La concentration initiale en milieu de référence est de $2,75.10^5$ cellules.mL⁻¹, de 4 g.L⁻¹ de glucose et de 0,6 g.L⁻¹ de glutamine.

Les conditions de culture des différents spinners sont rappelées dans le tableau

1. type Cytodex®



FIGURE 6.1 – Photographie de spinners

6.1.

Spinner 1	Milieu de référence
Spinner 2	
Spinner 3	
Spinner 4	
Spinner 5	Culture en milieu de référence avec $[Glc] = 1\text{ g.L}^{-1}$
Spinner 6	Culture en milieu de référence avec $[Glc] = 2\text{ g.L}^{-1}$

TABLE 6.1 – Comparaison des conditions expérimentales des différents spinners

6.2 Traitement et interprétation des données expérimentales

Cette première étape de traitement des données expérimentales brutes est importante, aussi basique soit-elle ; elle présente un double intérêt :

- elle permet notamment de s’imprégner des allures et tendances des courbes de chacune des espèces et éventuellement d’éliminer certains points expérimentaux apparaissant comme aberrants ;
- elle permet aussi de dégager des expériences des valeurs approchées des constan-

tes à insérer dans le modèle. En effet, pour que l'algorithme d'optimisation fonctionne, il convient de lui fournir au préalable un encadrement de valeurs cohérentes.

6.2.1 Visualisation de l'évolution des différentes espèces en fonction du temps

Les profils types des espèces d'intérêt sont tracés ci-dessous ; ils représentent, pour un spinner donné, l'évolution de la concentration d'une espèce en fonction du temps. L'encadré apparaissant sur chacune de ces figures correspond au(x) coefficient(s) de lissage appliqué(s)². L'heure à laquelle le premier dosage est réalisé variant en fonction du spinner considéré et la première mesure étant parfois absente, il est à noter que ces courbes ne démarrent pas toutes au même moment.

On retrouve ainsi les courbes types caractérisant l'évolution de la concentration de cellules vivantes (figure 6.2), du glucose (figure 6.3), de la glutamine (figure 6.4), des ions ammonium (figure 6.5) et du lactate (figure 6.6), en fonction du temps.

Le principal objectif concernant cette partie du travail est d'obtenir un lissage qui présente le moins possible d'artefacts et de bruits de fond, tout en conservant le maximum d'informations sur le système. Plutôt que d'utiliser une interpolation polynômiale qui aurait peut être été difficilement transposable d'une expérience à l'autre, notre choix s'est tourné vers les fonctions « splines ». Le travail mené autour des fonctions « splines » a permis d'apporter des solutions aux problématiques récurrentes de l'interpolation en permettant à l'expérimentateur de choisir de découper les courbes en deux parties distinctes possédant chacune un lissage qui leur est propre. Les différents résultats sont donc traités différemment soit par une simple, soit par une double interpolation et avec des coefficients de lissage différents.

Il faut aussi retenir de ce travail que l'interpolation des valeurs expérimentales d'un spinner à l'autre ne peut pas être complètement automatisée et c'est à l'opérateur d'effectuer le choix entre les différentes approches et d'apprécier au mieux la

2. En mathématique, le lissage d'une courbe correspond simplement à l'obtention d'une courbe lisse (sans singularité), par interpolation, entre différents points expérimentaux. Les fonctions dites « splines » sont une solution intéressante, car contrairement aux polynômes de haut degré, on n'observera peu d'artefacts d'interpolation

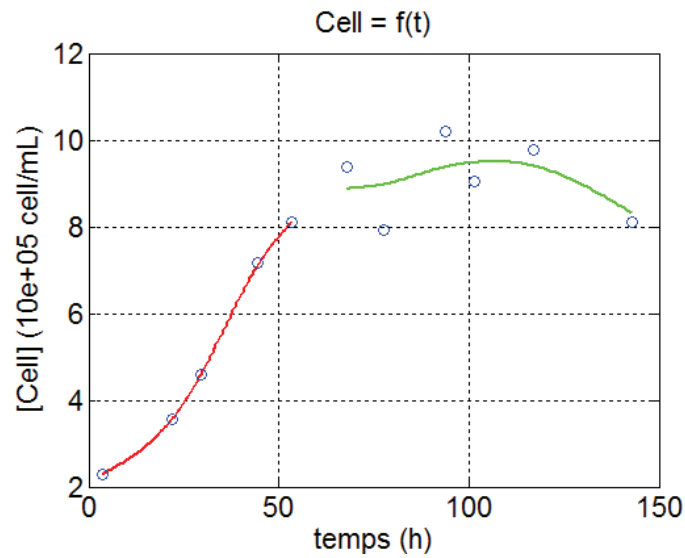


FIGURE 6.2 – Évolution de la concentration cellulaire en fonction du temps - spinner 1

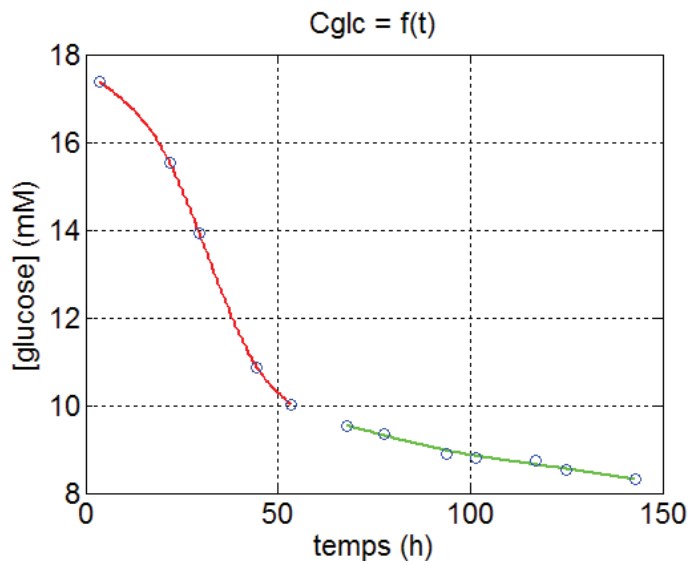


FIGURE 6.3 – Évolution de la concentration de glucose en fonction du temps - spinner 1

cohérence des résultats finaux.

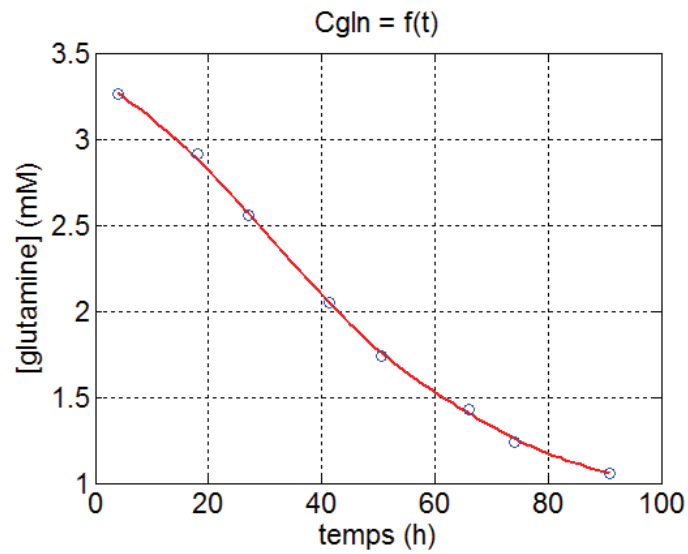


FIGURE 6.4 – Évolution de la concentration de glutamine en fonction du temps - spinner 5

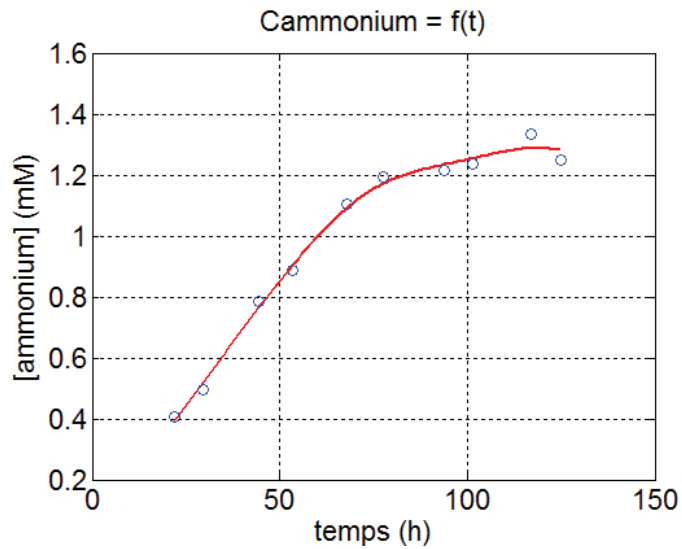


FIGURE 6.5 – Évolution de la concentration d'ions ammonium en fonction du temps - spinner 5

6.2.2 L'extraction des valeurs caractéristiques

En dérivant les courbes présentées précédemment, il est possible d'extraire et d'estimer un certain nombre de paramètres impliqués dans le modèle.

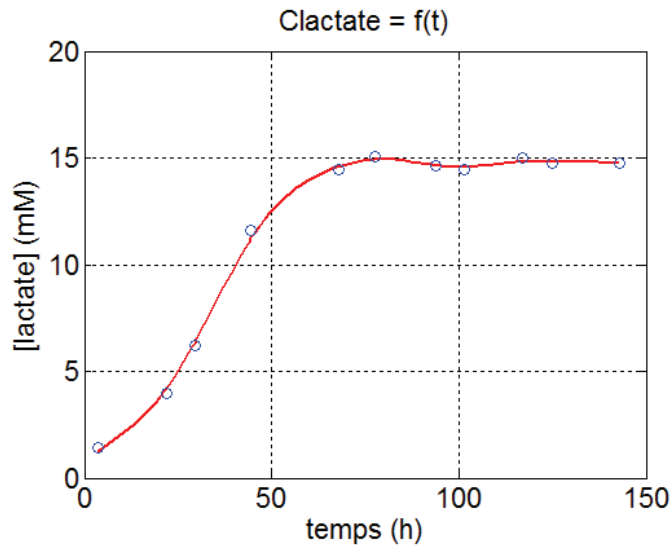


FIGURE 6.6 – Évolution de la concentration de lactate en fonction du temps - spinner 1

6.2.2.1 μ_{max} , X_{max} et t_{max}

La figure 6.7 présente l'évolution de la vitesse spécifique en fonction du temps.

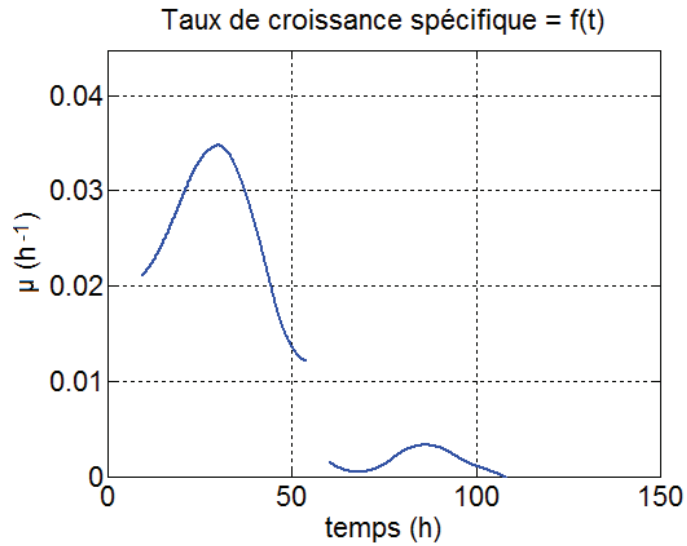


FIGURE 6.7 – Évolution de la vitesse spécifique en fonction du temps - spinner 1

L'outil informatique permet alors de déterminer la valeur maximale de la vitesse spécifique de croissance, le nombre maximal de cellules ainsi que, par interpolation,

6. Un exemple illustré de la démarche de modélisation

6.2. Traitement et interprétation des données expérimentales

la valeur de temps associée. A noter que ces estimations sont très dépendantes des choix faits précédemment durant l'étape de lissage, d'où son intérêt. Les valeurs de vitesses de croissance des spinners étudiés sont présentées dans le tableau 6.2.

	Spin. 1	Spin. 2	Spin. 3	Spin. 4	Spin. 5	Spin. 6
μ_{appmax} (h^{-1})	0,035	0,037	0,025	0,031	0,035	0,027
X_{max} ($10^5 \text{ cell.mL}^{-1}$)	9,50	8,10	9,55	10,41	7,54	8,91
t_{max} (h)	99	91	112	109	47	71

TABLE 6.2 – Tableau de résultats des paramètres cinétiques de chaque spinner

6.2.2.2 Les vitesses spécifiques de consommation, de production et les K_S associés

Une simple dérivation des lissages précédents permet aussi d'accéder aux variations spécifiques de consommation et de production du glucose/lactate, q_{Glc}/q_{Lact} (figure 6.8), et de l'ammonium/glutamine, q_{Gln}/q_{Ammo} (figure 6.9)

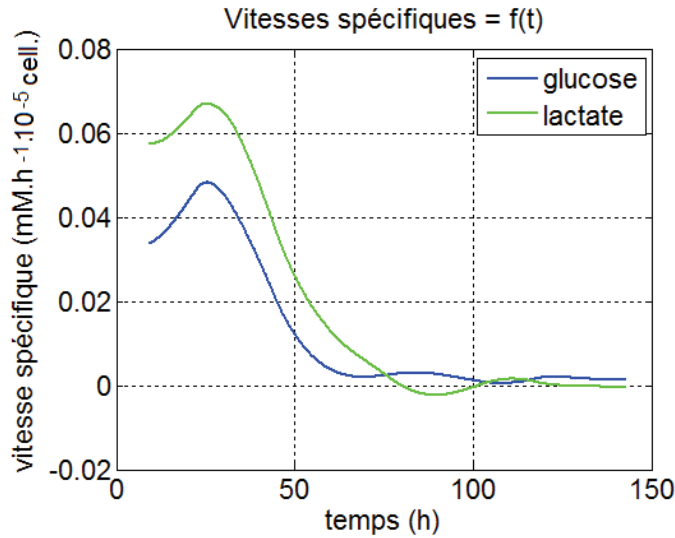


FIGURE 6.8 – Évolution des vitesses spécifiques de consommation/production de glucose et de lactate - spinner 1

Les K_S et K_P de chacune des espèces étudiées peuvent être déterminés de manière approximative en traçant les courbes : $\mu = f(\text{Espèces})$. Comme le montre l'exemple

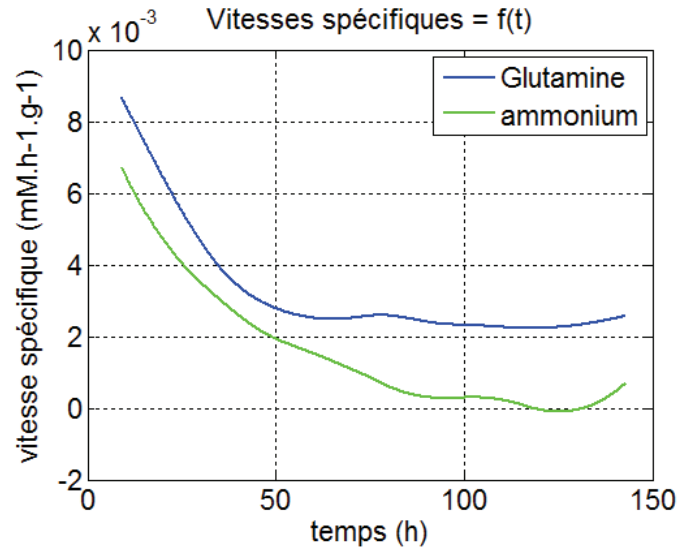


FIGURE 6.9 – Évolution des vitesses spécifiques de consommation/production de glutamine et d’ammonium - spinner 1

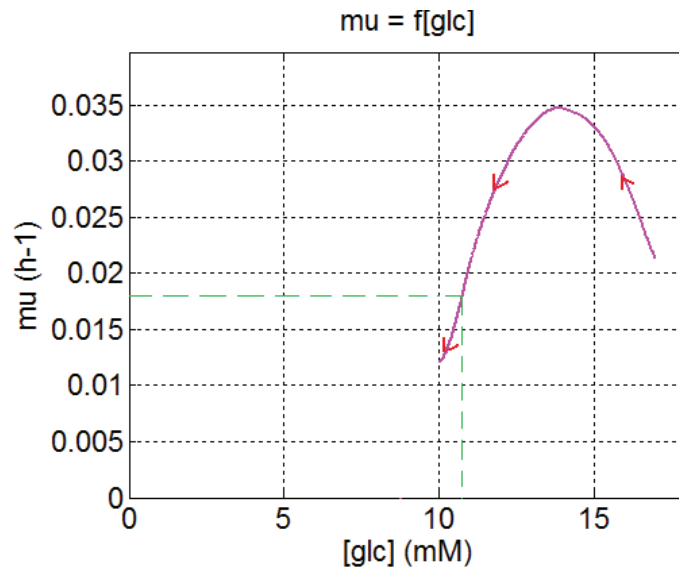


FIGURE 6.10 – Détermination du K_S du glucose - spinner 1

suivant (figure 6.10), le K_S et K_P correspondent alors à la concentration de l’espèce pour une vitesse de croissance de $\mu_{max}/2$. Les K_S des différentes espèces sont présentés dans le tableau 6.3.

Les points expérimentaux des spinners 3 et 4 étant particulièrement dispersés, il

6. Un exemple illustré de la démarche de modélisation

6.2. Traitement et interprétation des données expérimentales

Y	Spin. 1	Spin. 2	Spin. 3	Spin. 4	Spin. 5	Spin. 6
$K_{Glucose}$ (mM)	10,68	11,08	-	-	-	6,59
$K_{Glutamine}$ (mM)	1,78	2,60	-	-	1,91	2,68
$K_{Ammonium}$ (mM)	0,81	0,87	-	-	1,60	0,78
$K_{Lactate}$ (mM)	12,16	14,87	-	-	10,19	5,36

TABLE 6.3 – Tableau de résultat des constantes K_S et K_P de chaque spinner, évaluées à partir des données expérimentales

a été impossible d’obtenir un lissage suffisamment fiable pour en extraire la valeur des paramètres K_S et K_P . En fonction du degré de confiance que l’on accorde à ces résultats, nous sommes alors en mesure de fixer des bornes, réalistes, du domaine de recherche des paramètres du modèle.

6.2.2.3 Les rendements

Le calcul des rendements s’effectue par une régression linéaire durant la phase de croissance exponentielle ; c’est en effet durant cette période que les phénomènes sont les plus intenses, et par conséquent les mieux observables. malgré les légères variations en cours d’expérimentation, on considérera ces rendements comme étant constants durant toute la durée de l’expérience (figure 6.11, 6.12, 6.13, 6.14). Comme précisé dans le paragraphe 4.1.1, ces rendements sont en fait des rapports de vitesses de conversion ; ainsi $Y_{Lactate/Glucose}$ représente le taux de conversion molaire du glucose en lactate. En connaissant le taux maximal de conversion du glucose en lactate, qui est théoriquement de 2 mmoles de lactate pour 1 mmole de glucose, on peut par soustraction déduire la proportion de glucose rentrant dans le cycle.

Les valeurs des rendements des spinners étudiés sont résumées dans le tableau 6.4.

Les rapports de conversion molaire laissent apparaître que le glucose est un substrat plus nutritif que la glutamine ; en effet, il participe de façon plus efficace à la formation de biomasse. Le rendement lactate/glucose, compris entre 0,44 et 1,05 selon les spinners, est inférieur à la valeur théorique présentée précédemment de 2 g.g^{-1} . De la même manière, le rendement ammonium/glutamine, compris entre 1,41

6. Un exemple illustré de la démarche de modélisation

6.2. Traitement et interprétation des données expérimentales

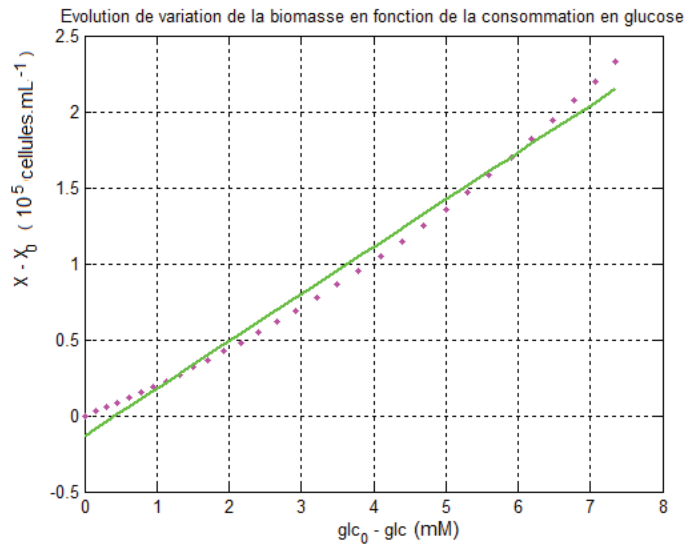


FIGURE 6.11 – Calcul du rendement $Y_{X/Glucose}$ - spinner 2

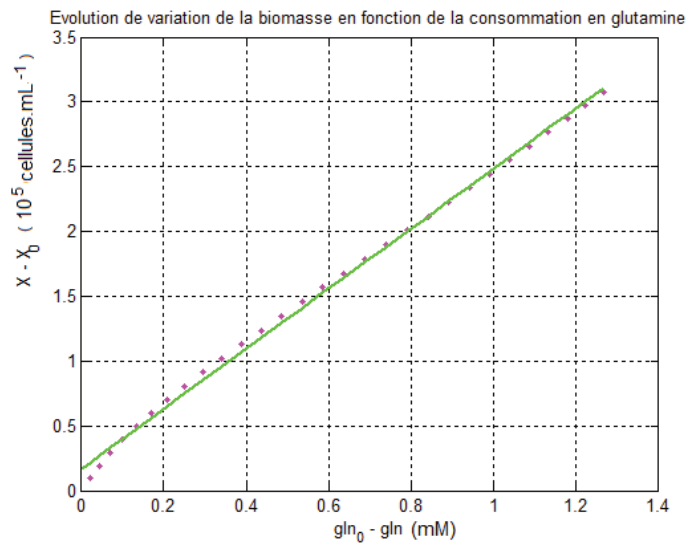


FIGURE 6.12 – Calcul du rendement $Y_{X/Glutamine}$ - spinner 2

et 2,34, est proche de la valeur théorique, à laquelle on pourrait à première vue s'attendre, de 2 g.g $^{-1}$ ³.

3. Car la molécule de glutamine contient deux groupements « amine »

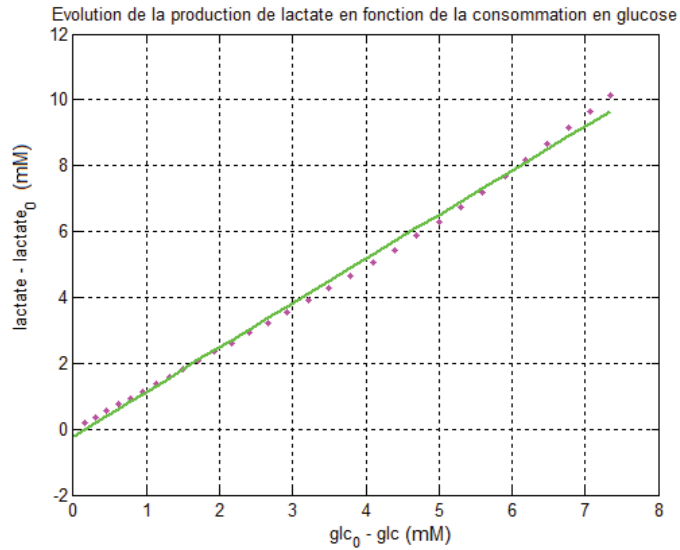


FIGURE 6.13 – Calcul du rendement $Y_{Lactate/Glucose}$ - spinner 2

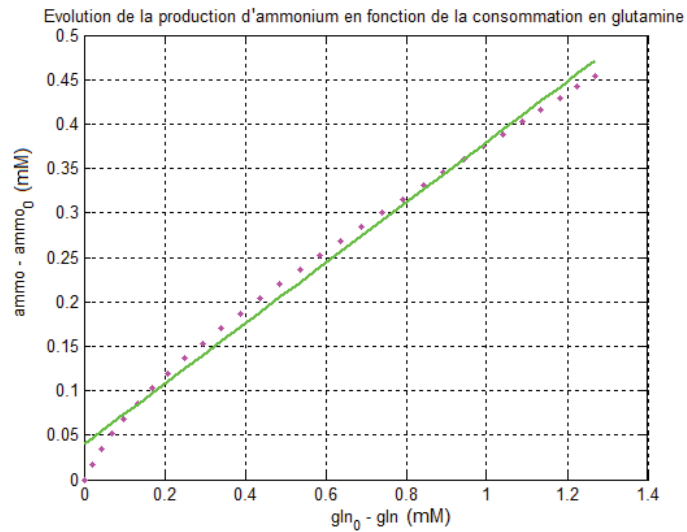


FIGURE 6.14 – Calcul du rendement $Y_{Ammonium/Glutamine}$ - spinner 2

6.3 Présentation des modèles et des résultats obtenus

Pour statuer sur la qualité d'un modèle, il convient de comparer les coefficients optimisés de différents spinners entre eux, ainsi qu'aux ordres de grandeur provenant des lissages des courbes expérimentales. Sur chacune des figures présentées par la

6. Un exemple illustré de la démarche de modélisation

6.3. Présentation des modèles et des résultats obtenus

	Spinner 1	Spinner 2	Spinner 3	Spinner 4	Spinner 5	Spinner 6
$Y_{Cellule/Glucose}$	0,74	0,40	-	-	1,19	0,74
$Y_{Cellule/Glutamine}$	5,63	2,86	-	-	3,41	3,35
$Y_{Lactate/Glucose}$	0,63	0,44	-	-	1,05	1,03
$Y_{Ammonium/Glutamine}$	1,60	1,41	-	-	2,34	2,21

TABLE 6.4 – Tableau de résultats des rendements de chaque spinner

suite, un trait plein représente la courbe théorique fournie par le modèle, les points correspondent aux points expérimentaux.

6.3.1 Modèle de Monod simple sur le glucose

Tout en sachant que ce modèle, basique dans sa formulation (eq. 6.1), ne serait sûrement pas représentatif du métabolisme cellulaire, il paraissait intéressant de tester cette approche particulièrement simple. La figure 6.15 présente l'évolution des différentes espèces (cellules, substrats, produits) en fonction du temps ; l'ensemble des coefficients utilisés pour obtenir ces courbes d'évolution sont listés dans le tableau 6.5).

$$\mu = \mu_{max} \frac{[Glc]}{[Glc] + K_{Glc}} \quad (6.1)$$

Paramètre	Valeur
μ_{max}	0,025 h ⁻¹
K_{Glc}	12,98 mM
$Y_{X/Glc}$	0,33 10 ⁵ cellules.mL ⁻¹ .g ⁻¹
$Y_{X/Gln}$	1,36 10 ⁵ cellules.mL ⁻¹ .g ⁻¹
$Y_{Lact/Glc}$	0,32 g _P .g ⁻¹
$Y_{Ammo/Gln}$	1,08 g _P .g ⁻¹
Critère J ⁴	30,37

TABLE 6.5 – Coefficients optimisés du Modèle de Monod simple - spinner 2

On observe que ces résultats ne sont pas cohérents avec les variations réelles et que le déclin de la croissance menant à la phase stationnaire est bien trop tardif. La valeur élevée du facteur J témoigne du fait que les courbes théoriques du modèle ne suivent pas bien les variations expérimentales. Exprimer la vitesse spécifique de

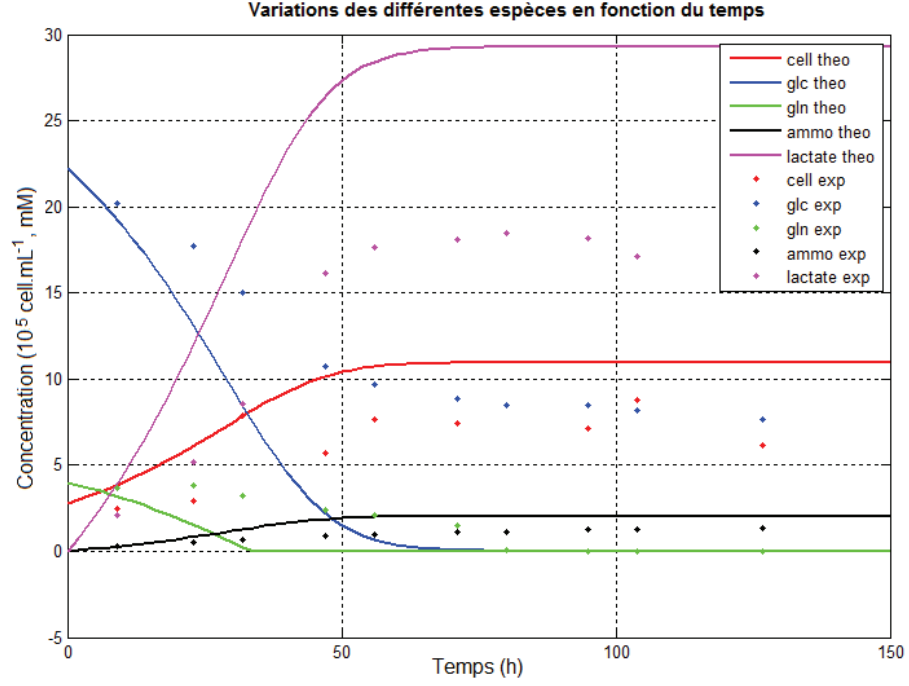


FIGURE 6.15 – Modèle de Monod simple sur le glucose uniquement - spinner 2

croissance en fonction du glucose seul ne suffit donc pas pour obtenir un modèle satisfaisant.

6.3.2 Modèle de Monod double

En réponse au constat fait sur le modèle de Monod simple, nous avons ensuite testé un modèle de Monod double (eq. 6.2), tel que celui décrit dans le paragraphe 4.2.1. Les résultats graphiques et numériques sont présentés dans la figure 6.16 et dans le tableau 6.6

$$\mu = \mu_{max} \frac{[Glc]}{[Glc] + K_{Glc}} \frac{[Gln]}{[Gln] + K_{Gln}} \quad (6.2)$$

Cette fois ci, l'adéquation du modèle aux points expérimentaux semble beaucoup plus encourageante, comme en atteste le critère J ayant pour valeur 7,53. Les 4 valeurs des rendements apparaissent relativement faibles en comparaison de celles que nous avons pu identifier précédemment. La valeur de μ_{max} est quant à elle légèrement

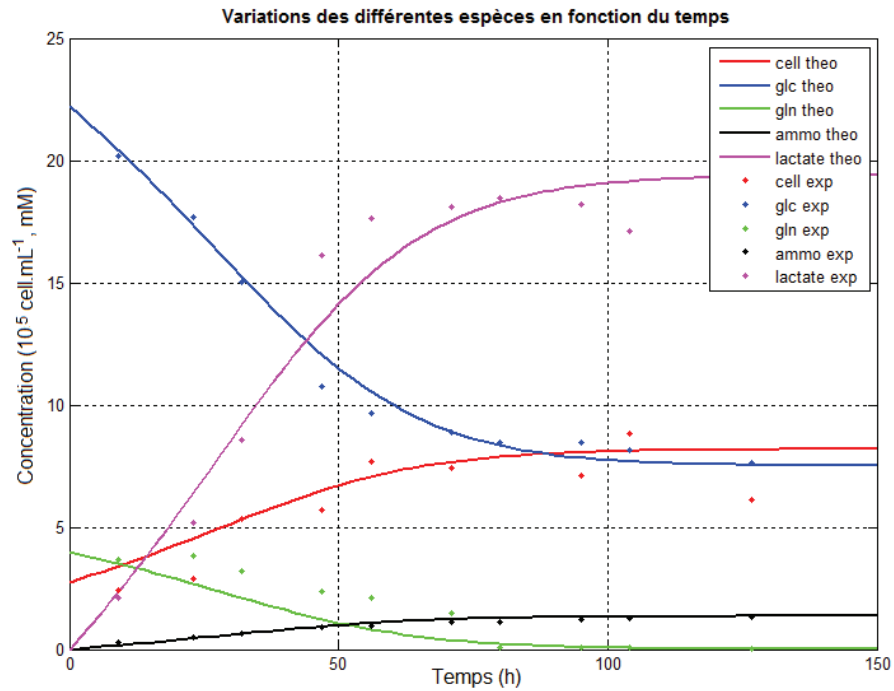


FIGURE 6.16 – Modèle de Monod double - spinner 2

Paramètre	Valeur
μ_{max}	$0,055 \text{ h}^{-1}$
K_{Glc}	10,62 mM
K_{Gln}	2,19 mM
$Y_{X/Glc}$	$0,37 \text{ } 10^5 \text{ cellules.mL}^{-1}.\text{g}^{-1}$
$Y_{X/Gln}$	$1,36 \text{ } 10^5 \text{ cellules.mL}^{-1}.\text{g}^{-1}$
$Y_{Lact/Glc}$	$0,34 \text{ gP.g}^{-1}$
$Y_{Ammo/Gln}$	$1,32 \text{ gP.g}^{-1}$
Critère J	7,53

TABLE 6.6 – Coefficients optimisés du Modèle de Monod double - spinner 2

surélevée.

6.3.3 Modèle de Monod avec inhibition par le lactate

Au vu des résultats satisfaisants du modèle de Monod double, il paraissait judicieux de compléter le modèle en utilisant un terme correspondant à l'inhibition de la vitesse spécifique de croissance cellulaire par le lactate (eq. 6.3, figure 6.17, tableau

6. Un exemple illustré de la démarche de modélisation

6.3. Présentation des modèles et des résultats obtenus

6.7).

$$\mu = \mu_{max} \frac{[Glc]}{[Glc] + K_{Glc}} \frac{[Gln]}{[Gln] + K_{Gln}} \frac{K_{Lact}}{[Lact] + K_{Lact}} \quad (6.3)$$

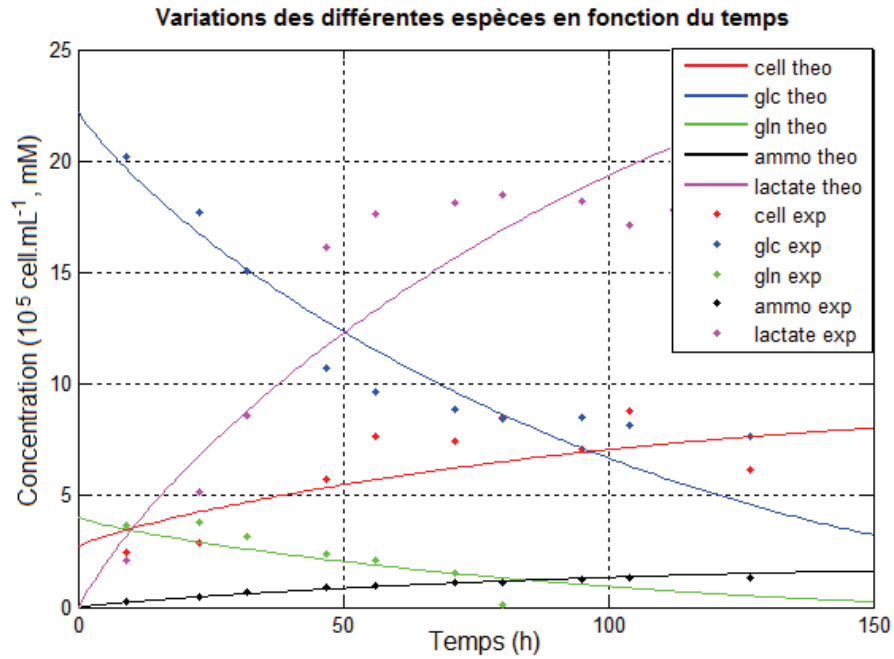


FIGURE 6.17 – Modèle de Monod avec inhibition par le lactate - spinner2

Paramètre	Valeur
μ_{max}	$0,046 \text{ h}^{-1}$
K_{Glc}	$9,01 \text{ mM}$
K_{Gln}	$0,07 \text{ mM}$
K_{Lact}	$11,91 \text{ mM}$
$Y_{X/Glc}$	$0,85 \text{ } 10^5 \text{ cellules.mL}^{-1}.\text{g}^{-1}$
$Y_{X/Gln}$	$0,66 \text{ } 10^5 \text{ cellules.mL}^{-1}.\text{g}^{-1}$
$Y_{Lact/Glc}$	$0,34 \text{ gP.g}^{-1}$
$Y_{Ammo/Gln}$	$3,00 \text{ gP.g}^{-1}$
Critère J	31,43

TABLE 6.7 – Coefficients optimisés du Modèle de Monod avec inhibition du lactate - spinner 2

Bien que la littérature (paragraphe 3.3.1) et les connaissances réunies autour du métabolisme des cellules Vero laissent présager que la croissance est vraisemblable-

blement stoppée par l'accumulation de lactate, ce modèle ne fournit pas de bons résultats. On s'aperçoit que dans ce cas, la superposition de ces trois contributions glucose - glutamine - lactate dans l'expression de la vitesse spécifique de croissance, ne fournit pas de résultats satisfaisants. Ce résultat souligne la complexité du processus de modélisation où, malgré des hypothèses réalistes, l'identification des paramètres peut se révéler difficile et conduire à des prédictions de mauvaise qualité.

6.3.4 Modèle de Monod double avec un terme de dégradation de la glutamine

Ce modèle correspond au modèle de Monod double avec pour seule différence un terme de cinétique d'ordre 1 correspondant à la dégradation chimique (ou enzymatique) de la concentration de glutamine dans le milieu de culture (eq. 6.4 et 6.5).

$$\left\{ \begin{array}{l} \mu = \mu_{max} \frac{[Glc]}{[Glc] + K_{Glc}} \frac{[Gln]}{[Gln] + K_{Gln}} \\ \frac{d[Gln]}{dt} = -\frac{1}{Y_{X_V/Gln}} \mu_{app} X_V - K_{deg}[Gln] \end{array} \right. \quad (6.4)$$

$$(6.5)$$

La valeur K_{deg} choisie pour la constante de dégradation de la glutamine a été identifiée dans la littérature [?], elle est de $0,00416 \text{ h}^{-1}$. On cherche alors à modéliser plus finement la diminution de glutamine dans le spinner. La valeur de la constante de dégradation a été trouvée dans la littérature [?]. Les résultats graphiques et numériques sont présentés dans la figure ?? et dans le tableau ??.

On observe que ce modèle fournit des résultats strictement identiques au modèle précédent. Les tests sur des spinners différents montrent que les résultats sont plutôt similaires d'un spinner à l'autre. Des différences notables concernant le K_{Gln} , le $Y_{X/Gln}$ et le rendement $Y_{ammo/Gln}$ sont cependant à considérer. La valeur faible de la constante K_{Gln} du spinner 5 peut être expliquée soit par une erreur lors de l'optimisation, soit par l'hypothèse, à vérifier, qu'une faible concentration de glucose entraîne une diminution de la consommation de glutamine.

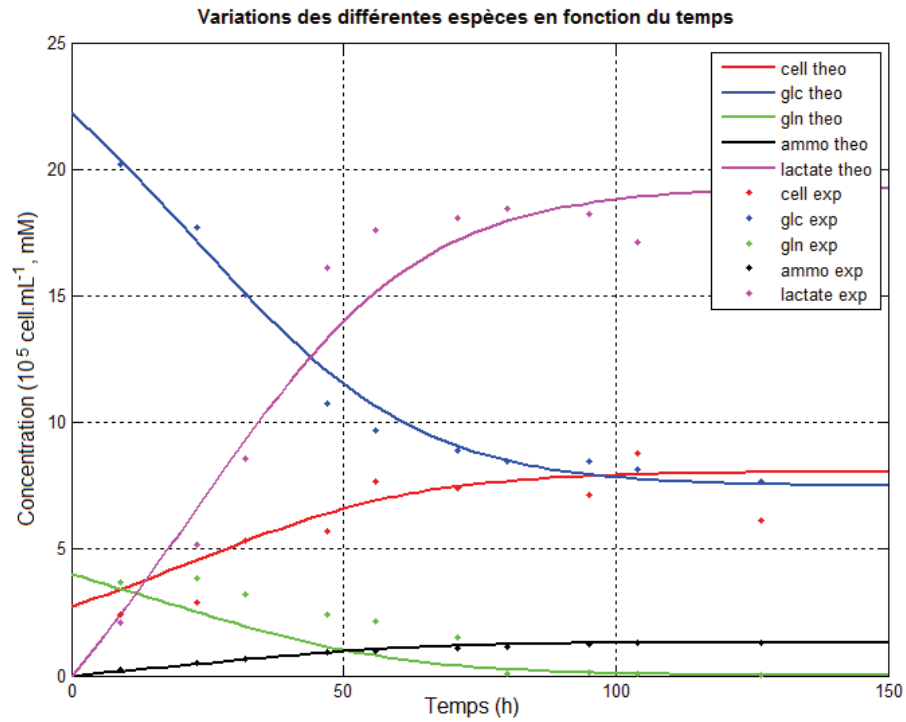


FIGURE 6.18 – Modèle de Monod double avec dégradation de la glutamine - spinner 2

	Spinner 1	Spinner 2	Spinner 5	Spinner 6	Spinner 7	Moyenne
μ_{max}	0,074	0,061	0,070	0,054	0,073	0,067
K_{Glc}	9,22	8,46	7,92	9,61	9,17	8,88
K_{Gln}	3,52	3,09	0,07	1,07	0,77	1,70
$Y_{X/Glc}$	0,49	0,36	0,60	0,46	0,26	0,43
$Y_{X/Gln}$	2,06	1,56	1,85	2,68	1,48	1,93
$Y_{Lact/Glc}$	0,40	0,39	1,08	1,17	0,73	0,75
$Y_{Ammo/Gln}$	1,12	1,31	1,84	1,67	1,18	1,42
Critère J	7,05	8,08	6,07	3,63	9,23	

TABLE 6.8 – Coefficients optimisés du Modèle de Monod double avec terme de dégradation - spinner 1, 2, 5, 6 et 7

6.3.5 Modèle d'Andrews/Haldane

Le modèle d'Andrews est un modèle assez couramment utilisé en modélisation biologique, notamment pour représenter les phénomènes d'inhibition par le substrat, dans notre cas : la glutamine (eq. ??). De par son formalisme mathématique, l'ex-

pression de Haldane induit une augmentation de la vitesse de croissance en fonction de substrat plus rapide que celle observée dans le cas de l'expression de Monod. De fortes concentrations en glutamine feront tendre ce terme vers 0, alors que de faibles concentrations effaceront son effet (figure ??, tableau ??).

$$\mu = \mu_{max} \frac{[Glc]}{[Glc] + K_{Glc}} \left(\frac{[Gln]}{K_{Gln} + [Gln] + \frac{[Gln]^2}{K_I}} \right) \quad (6.6)$$

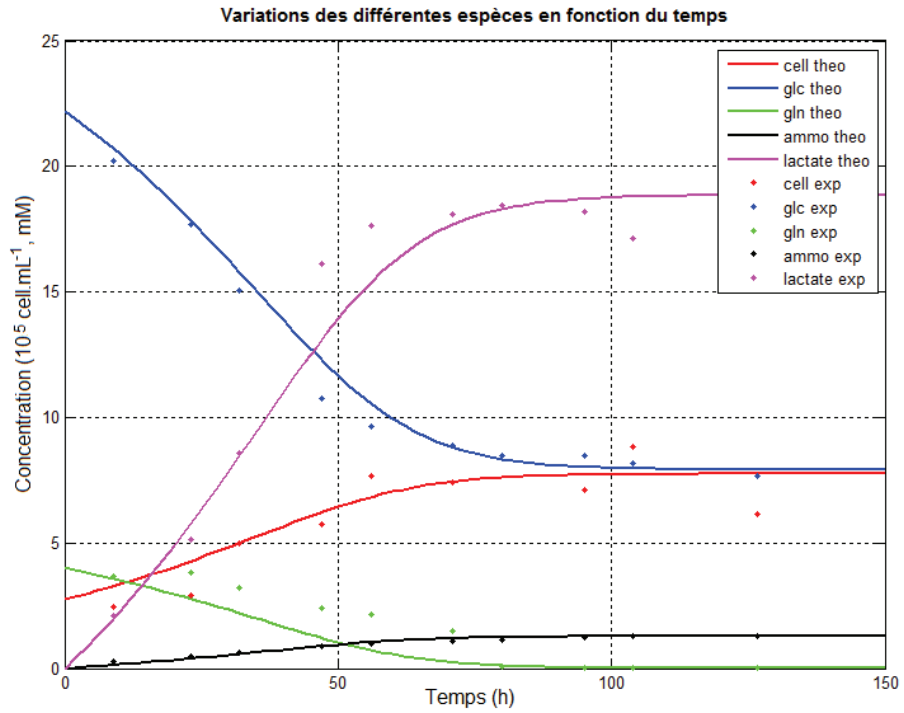


FIGURE 6.19 – Modèle d'Andrews avec inhibition par la glutamine - spinner 2

Ce modèle présente des résultats relativement cohérents sur l'ensemble des expériences excepté concernant la valeur de la constante K_{Gln} qui semble varier énormément d'un cas à l'autre. En prenant en considération la valeur du facteur de performance J , ce modèle est celui qui apporte les résultats les plus performants. Cependant, même s'il semble fournir les meilleurs résultats mathématiquement parlant, l'hypothèse biologique d'inhibition par la glutamine sur laquelle il repose est discutable, et il n'est pas forcément le plus pertinent.

	Spinner 1	Spinner 2	Spinner 5	Spinner 6	Spinner 7	Moyenne
μ_{max}	0,063	0,058	0,064	0,063	0,069	0,0635
K_{Glc}	9,37	10,09	7,62	9,16	8,70	8,89
K_{Gln}	2,01	1,76	0,01	0,97	0,69	1,09
K_I	11,99	6,94	8,21	9,07	8,84	9,01
$Y_{X/Glc}$	0,45	0,35	0,37	0,45	0,23	0,37
$Y_{X/Gln}$	1,57	1,25	0,76	1,72	1,21	1,30
$Y_{Lact/Glc}$	0,31	0,32	0,71	0,80	0,68	0,57
$Y_{Ammo/Gln}$	1,09	1,32	1,84	1,69	1,18	1,42
Critère J	7,40	6,61	7,30	3,53	9,43	

TABLE 6.9 – Coefficients optimisés du Modèle d'Andrews - spinner 1, 2, 5, 6 et 7

Cet exemple illustre bien les limites de la modélisation : une hypothèse fausse à la base peut, pour autant, conduire à un résultat d'allure satisfaisante.

6.4 Discussion des résultats

6.4.1 Discussion des graphes

Les modèles de Monod avec dégradation de la glutamine et d'Andrews présentent des résultats relativement satisfaisants en ce qui concerne le spinner 2. A partir des résultats obtenus sur les données du spinner 2, deux modèles ont été retenus et testés sur les spinners 1, 5, 6 et 7⁵. Le graphe ?? suivant résume les différents critères J calculés pour chaque modèle.

Les valeurs des vitesses spécifiques de croissance obtenues suite à l'optimisation ?? sont globalement plus élevées que celles obtenues par lecture des résultats expérimentaux ; le modèle semble surestimer les vitesses spécifiques de croissance.

Les courbes relatives au glucose et au lactate présentent, aux erreurs expérimentales près, une bonne similitude avec les valeurs réelles ; la courbe des ions ammonium est, quant à elle, en parfaite adéquation avec les valeurs cibles, et ce, pour tous les modèles. On note régulièrement des divergences entre les courbes correspondants à la glutamine et les points expérimentaux de cette dernière. Ceci explique sûrement,

5. Plutôt que de tester tous les modèles sur l'ensemble des spinners, nous avons choisis de procéder en deux temps. Cette façon de procéder n'est pas la seule possible et résulte d'un choix propre à la personne manipulant les données

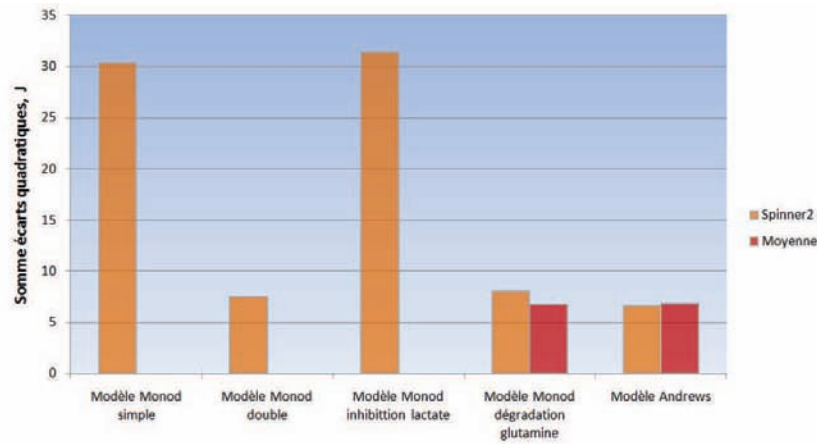


FIGURE 6.20 – Valeurs du critère de performance J des différents modèles

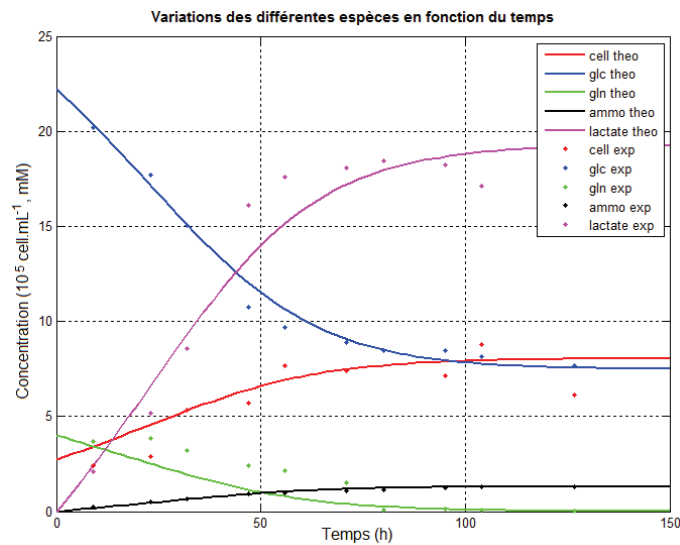


FIGURE 6.21 – Courbes résultantes du modèle de Monod double

par la même occasion, les faibles valeurs de rendement $Y_{X/Gln}$ optimisées et les fortes variations ressenties sur le K_{Gln} .

Cet écart constaté concernant les cellules et la glutamine est sûrement dû à l'optimisateur ; en effet si l'on utilise uniquement les points expérimentaux situés dans la phase exponentielle, on s'aperçoit que les courbes du modèle ont une allure beaucoup plus juste. Ceci permettrait de conclure que les formulations de nos modèles non structurés représentent bien la phase de croissance, mais pas forcément l'inté-

gralité de l'expérience. On peut ainsi supposer que le modèle est encore incomplet pour décrire l'ensemble d'une culture.

D'autre part, Matlab[®] donne accès à d'autres outils qui permettent, en aval, de « valider » en partie la structure de nos modèles. A l'issue d'une optimisation par l'algorithme, celui-ci propose un grand nombre de vecteurs de paramètres qui conduisent tous à une erreur J minimale et équivalente. L'analyse de l'ensemble des valeurs proposées pour un paramètre comme μ_{max} et l'analyse de ces ensembles de paramètres deux à deux, décrit ici la distribution des paramètres identifiés et les corrélations entre les paramètres. Par exemple, la figure ?? suivante montre la distribution des différents coefficients optimisés dans le cas du modèle d'Andrews ; on peut ainsi se rendre compte de l'impact de chacun des facteurs et des interactions pouvant exister entre ces derniers. Ce tableau possédant le même nombre de lignes et de colonnes permet de visualiser la répartition des valeurs de chacun des paramètres optimisés au sein de la population finale. La diagonale présente ainsi la distribution purement statistique des valeurs optimisées pour un même paramètre⁶. Plus la distribution est large et éparse, moins la précision sur la valeur du paramètre en question est importante dans le modèle ; à l'inverse un paramètre présentant un nuage de points concentrés aura un poids important sur le système.

Ce type de diagramme met aussi en évidence les corrélations éventuelles entre les différents paramètres du système. Une répartition des points de manière linéaire et oblique entre deux paramètres traduit alors que ces paramètres se compensent l'un et l'autre et qu'un seul peut suffire à caractériser le système. A titre d'exemple, nous avons créé un tel graphique en recréant artificiellement un modèle contenant deux termes dépendants l'un de l'autre (exemple figure ??).

En conclusion, les résultats que nous avons pu obtenir suite à ces travaux de modélisation répondent en partie à la problématique développée initialement. Tout en conservant une certaine simplicité dans le formalisme mathématique et dans les phénomènes décrits, nous avons identifié un modèle permettant, à quelques variations près, de représenter l'évolution de notre système de culture cellulaire. Comme nous

6. à la manière d'un intervalle de confiance

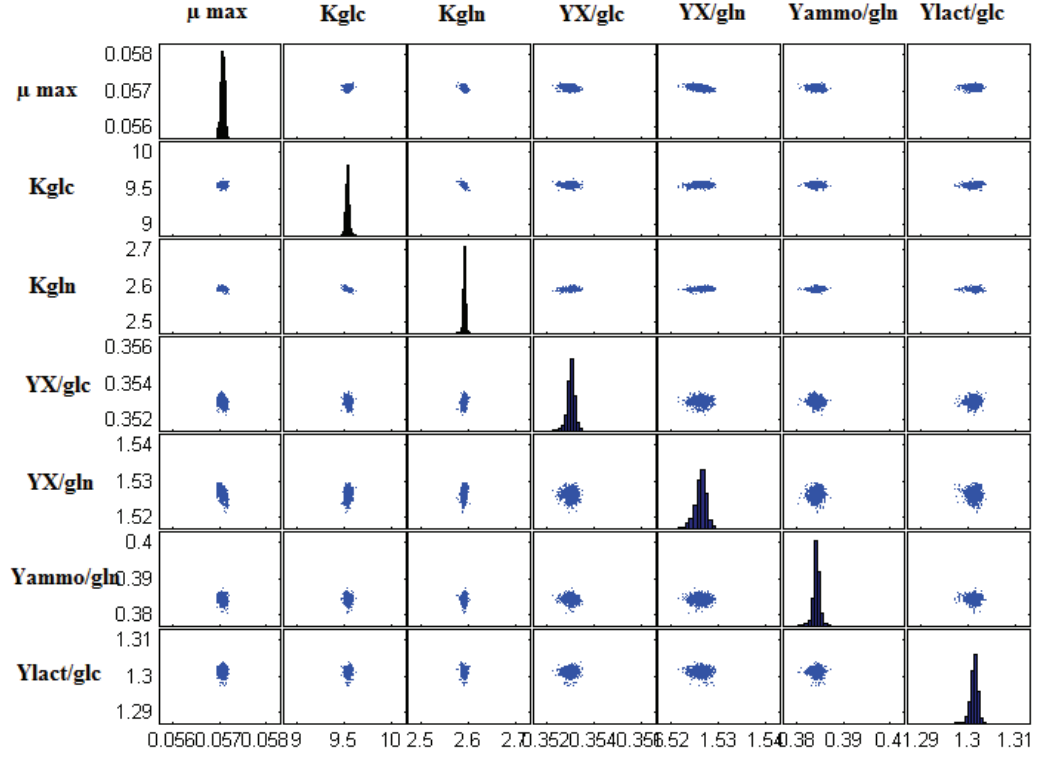


FIGURE 6.22 – Distributions au sein de la population optimisée et interactions entre les différents facteurs - spinner 2

l'avons vu, il existe un certain nombre de difficultés à palier concernant la phase de modélisation. La principale d'entre elle est qu'il faut être particulièrement vigilant dans la validation des hypothèses et l'interprétation des résultats. Ainsi un modèle reposant sur des postulats incorrects peut très bien fournir de bons résultats en apparence, et inversement. Un certain nombre de pistes pourront être développées pour aller plus loin dans l'approche de modélisation ; on peut par exemple citer :

- la modélisation des phénomènes intracellulaires, notamment à travers la caractérisation du pyruvate ;
- la description des phénomènes de mort et de maintenance cellulaire ;
- la limitation forcée par une espèce inconnue⁷ ;

7. Il est tout à fait possible d'ajouter au système une espèce inconnue de nature non identifiée et de supposer que l'entrée en phase stationnaire est consécutive à la disparition de cette espèce inconnue. Il peut par exemple s'agir de facteurs de croissance, d'acides aminés particuliers ... etc.

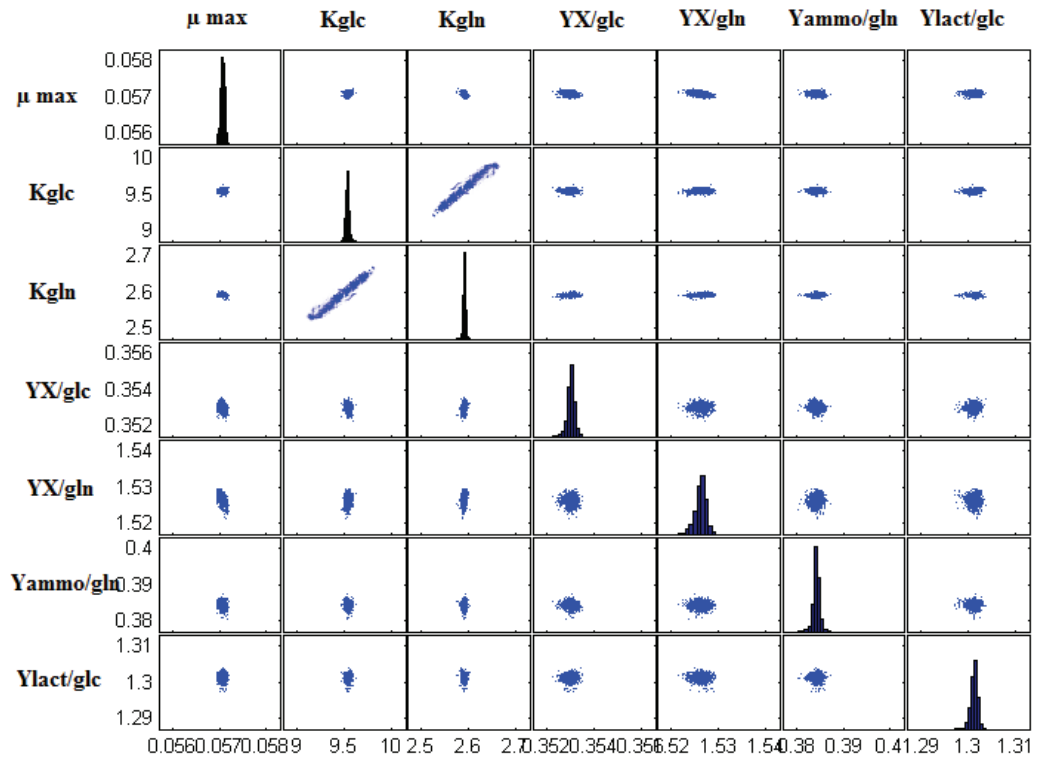


FIGURE 6.23 – Exemple de phénomène de compensation - spinner 2

– l'introduction d'un terme concernant les acides aminés.

Troisième partie

Aspects industriels de la maîtrise des procédés de production de vaccins

Chapitre 7

L'approche PAT appliquée à la culture de cellules animales

Après avoir suivi et après avoir compris l'intérêt théorique de la démarche de modélisation, il est légitime de se demander comment faire le lien entre le côté très conceptuel des modèles et la pratique de la production de terrain. L'apport de connaissances sur le procédé est tout à fait cohérent avec une nouvelle démarche prônée par les institutions réglementaires : le PAT.

Après avoir redéfini ce qu'est le PAT et après avoir brossé une description du contexte dans lequel le PAT s'impose, ce chapitre expliquera quels sont les outils nécessaires à sa mise en place, sur le terrain, en ce qui concerne les problématiques de culture cellulaire.

7.1 Une nouvelle approche du développement et de la production : le PAT

7.1.1 Définition du PAT

La démarche PAT, pour Process Analytical Technology, existe depuis plusieurs décennies dans des industries diverses, telles que les industries des secteurs chimique, agroalimentaire ou pétrolier. Elle est apparue beaucoup plus récemment dans le

7. L'approche PAT appliquée à la culture de cellules animales

7.1. Une nouvelle approche du développement et de la production : le PAT

domaine des industries biotechnologiques.

La FDA définit le PAT comme étant :

« a system for designing, analysing and controlling manufacturing through timely measurement (i.e., during processing) of critical parameters, with the goal of ensuring final product quality » ([?]).

Le but de cette systématique est de permettre le développement et la mise en place de procédés assurant de manière quasi certaine un niveau de qualité pré-défini comme acceptable.

Cette nouvelle tendance implique un bouleversement profond dans la façon de penser et d'appréhender le développement, la qualification et la validation des bio-procédés. Actuellement, pour s'assurer de la qualité du produit fini, l'approche la plus répandue consiste à contrôler le produit en fin de chaîne de production. A contrario, l'approche PAT propose, en complément du contrôle qualité, de suivre en temps réel l'évolution des variables du procédé.

Par conséquent, on assiste à une translation de la notion de qualité. Alors qu'auparavant la qualité se concrétisait en fin de procédé, dans le cadre du PAT, la qualité se construit en amont et au cours du procédé. Ceci implique que le procédé repose sur un socle de connaissances solides, étayées lors du développement, qui en assure sa maîtrise.

« Quality cannot be tested into products, it should be built in, or by design ».

Les objectifs du PAT sont multiples ; il permet au final :

- d'améliorer la compréhension et de maîtriser la variabilité des procédés ;
- de réduire le taux de rejet : la productivité s'en retrouve alors augmentée ;
- d'optimiser la durée des cycles de production ;
- de réduire les risques d'erreurs humaines en augmentant les automatismes ;
- de permettre la libération des lots en temps réel et de limiter les contrôles finaux à un petit nombre d'échantillons ;

7. L'approche PAT appliquée à la culture de cellules animales

7.1. Une nouvelle approche du développement et de la production : le PAT

- d'améliorer la productivité en facilitant potentiellement les procédés en continu, par rapport aux procédés discontinus.

7.1.2 La mise en pratique du PAT

L'initiative PAT repose sur 4 piliers principaux :

- l'analyse multi-variable des données, qui s'oppose à la tendance actuelle à ne contrôler les procédés qu'en fonction du temps de production¹. L'analyse multi-variable du procédé implique la présence d'outils informatiques puissants permettant l'acquisition des données et leur analyse.
- des méthodes d'analyse qui permettent de suivre l'évolution temporelle des paramètres d'importance.
- une meilleure maîtrise globale et une meilleure automatisation des procédés, permettant de prendre et d'appliquer en temps réel des décisions.
- la mise en place d'un management des connaissances (Knowledge management) permettant la pérennité des connaissances globales sur le produit et sa fabrication.

C'est dans cette optique que s'intègrent les outils de modélisation mathématique tels que ceux que nous avons pu présenter. Comme nous l'avons vu précédemment, les modèles permettent d'augmenter le degré de connaissance du procédé en validant certaines hypothèses. Ils permettent aussi de prédire l'évolution du procédé et d'aider l'utilisateur à la prise de décision, en vue de réduire les variations du procédés et par conséquent d'optimiser et d'améliorer ses performances.

Le PAT passe par l'identification et la mesure des paramètres critiques du processus, encore appelés CCP pour « Critical Process Parameters » et par la définition d'un domaine de confiance définissant les frontières d'application du procédé. Ce dernier point rapproche le PAT d'une autre notion récente : celle de QbD.

1. La très grande majorité des procédés pharmaceutiques reposent actuellement sur des procédures opératoires standards (SOP), que l'on pourrait assimiler à des recettes, à des routines pré-conçues (contrôle en boucle ouverte, sans « retro-action »)

7.1.3 Les outils du PAT

On peut classer les outils pour la mise en œuvre du PAT en trois catégories :

- « at-line » : ces techniques impliquent des mesures et des analyses hors ligne suite à des prélèvements d'échantillons,
- « on-line » : la mesure est réalisée quasiment en temps réel, et elle est non invasive. Le capteur, ou la technologie, est implanté en boucle fermée sur le procédé afin de ne pas perturber son évolution,
- « in-line / in-situ » : la mesure est réalisée en temps réel et ne perturbe pas le système étudié étant donné que le capteur stérilisable, ou la technologie, est non invasif et est implanté dans le procédé à étudier.

7.1.4 La méthodologie QbD

La méthodologie QbD, pour « Quality by Design », a pour but l'établissement d'un espace de confiance (ou Design space) qui tient compte de la variabilité naturelle et des interactions entre les différents paramètres opératoires influant sur le procédé et sur la qualité finale du produit. L'objectif premier est de déterminer les paramètres critiques du procédé tels que, par exemple, la composition des matières premières, la recette² de production, les conditions opératoires, ...

L'espace de confiance représente alors un espace dans lequel les perturbations n'auront pas d'effet sur la qualité du produit, et ne nécessiteront pas de modifications du dossier d'acceptation.

La méthodologie QbD s'appuie donc sur une grande connaissance et une bonne maîtrise du procédé de production résultant d'un grand nombre d'informations acquises, soit, au cours du procédé par les technologies PAT d'analyse en ligne, soit, par des techniques de plans d'expériences préalables (DOE : Design Of Experiment).

Les approches PAT et QbD impliquent un surcoût évident lors des opérations de développement et une maîtrise des procédés beaucoup plus exigeante. Cependant,

2. Terme trivial désignant le protocole complet de production

elles entraînent aussi des économies considérables en production. En effet, ces approches modernes permettent, à travers une meilleure compréhension des processus, de réduire de façon conséquente leur variabilité intrinsèque³. On améliore ainsi la qualité et la productivité des procédés, deux notions souvent en opposition.

7.1.5 Référentiel normatif

Le premier document officiel, évoquant ces nouvelles directives réglementaires, provient de la FDA [?] et date de 2002. A travers ce document, dont le sous-titre est « A scientific, risk-based approach », la FDA pose les premières bases du management des risques ; il est précisé que les entreprises pharmaceutiques devront :

- adopter et intégrer les nouvelles évolutions technologiques. ICH Q8 : Pharmaceutical Development including Quality by Design with focus on Drug Product Development ;
- adopter les derniers systèmes en cours de management de la qualité. ICH Q9 : Quality risk management⁴ ;
- adopter un management de la qualité basé sur le risque. ICH Q10 : Quality systems⁵.

7.2 Le PAT appliqué à la culture cellulaire

Comme cela à été mis en évidence dans la partie concernant le traitement de la modélisation, les paramètres dont le suivi en ligne est particulièrement approprié pour la compréhension et l'amélioration des procédés sont les suivants :

- ✓ la concentration et la viabilité cellulaire ;
- ✓ les concentrations en éléments nutritifs, principalement glucose et glutamine ;
- ✓ les concentrations en co-produits du métabolisme, principalement ammonium et lactate.

3. La variabilité inhérente à un procédé est souvent appelée statistiquement capabilité.

4. Ce document concerne le contrôle, la communication et contient un listing des risques encourus pour la qualité d'un médicament durant son cycle de vie

5. Il s'agit d'un complément aux actuelles GMP qui a pour objectif l'introduction de l'amélioration continue dans les procédés de fabrication pharmaceutiques

D'autres paramètres auront aussi leur importance, tels que :

- les paramètres physico-chimiques de fonctionnement du réacteur (pH, température, pO_2 , pCO_2 , osmolarité, agitation et hydrodynamique, ...);
- la concentration et la qualité du produit (quantités de virus ou de protéines produites, taux de particules virales non infectieuses, produits de dégradation, ...).

L'analyse de la littérature proposée ci-dessous ciblera essentiellement le suivi en ligne de la concentration et de la viabilité cellulaire, ainsi que celui des éléments nutritifs et produits principaux.

7.2.1 La mesure du pH et de la pO_2

A l'inverse des autres paramètres énumérés précédemment⁶, la plupart des bioréacteurs assurent le suivi en ligne en routine du pH, de la température et de la pO_2 par des capteurs stérilisables. L'utilisation de ces indicateurs pour le suivi et l'amélioration des cultures cellulaires est donc une méthode particulièrement avantageuse en terme d'investissement, puisqu'elle ne nécessite pas de lourdes installations supplémentaires.

Il est notamment possible de déterminer à partir de la pO_2 et des vitesses de consommation en oxygène, les moments privilégiés pour l'infection, la récolte ainsi que les changements de milieu [?] (figure ??).

7.2.2 La mesure de la concentration et de la viabilité cellulaire

La concentration cellulaire est une des variables clefs pour le contrôle des procédés de culture cellulaire. Elle est particulièrement utile pour déterminer les moments optimaux d'infection virale des cultures. Les premières techniques mises en place quantifiaient la concentration cellulaire de manière indirecte à partir de données intermédiaires telles que la consommation d'oxygène ou la quantité de glucose consommée [?]. Les inconvénients de ces méthodes de quantification sont qu'elles se

6. Ces paramètres ne sont pas suivis en systématique, mais uniquement en fonction des besoins et de manière plus artisanale.

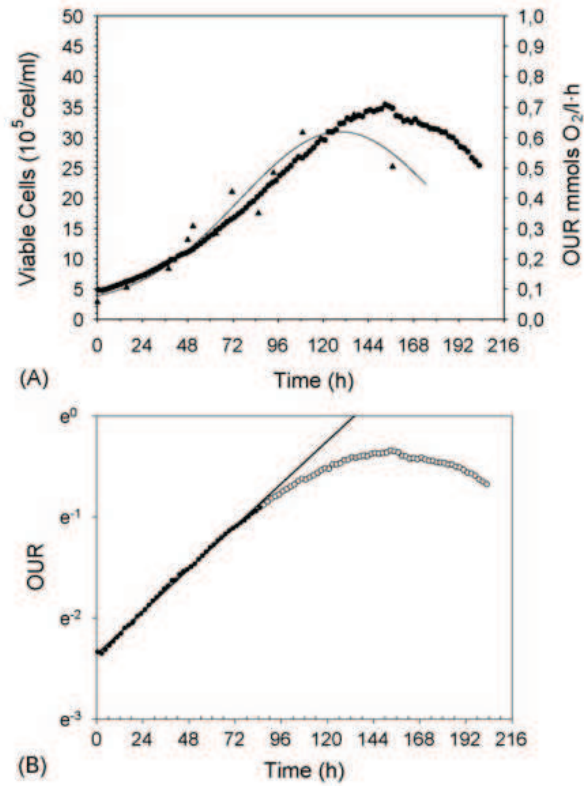


Fig. 1. Growth and OUR profiles in a batch culture. (A) On-line OUR measurements (●), off-line viable cell counting (▲) and its mathematical fitting (—). (B) Profiles of $\ln$ OUR vs time. During the exponential growth phase, the linear fitting (●) denotes the good correlation between OUR values and cell growth. At the end of the exponential phase, $\ln$ OUR values divert from the linearity and progressively decrease according to the changes in cell physiology (○).

FIGURE 7.1 – Exemple de suivi des concentrations cellulaires dans le cadre du PAT [?]

déroulent la plupart du temps hors-ligne, et qu'elles impliquent l'hypothèse, discutable, des rendements constants.

La spectroscopie diélectrique

En physique, on désigne par spectroscopie diélectrique l'ensemble des techniques de mesures des propriétés diélectriques d'un milieu en fonction de la fréquence.

Par analogie, on peut assimiler la cellule à une sphère contenant un cytoplasme conducteur, baignant dans une solution (milieu de culture), elle aussi conductrice. En

raison, de la membrane cytoplasmique, naturellement imperméable aux ions, l'application d'un champ électrique à la suspension cellulaire va induire une polarisation des cellules. La mesure de cette polarisation permet d'accéder à la permittivité cellulaire, qui peut être enregistrée dans le bioréacteur par une sonde stérilisable.

En modifiant la fréquence du champ électrique, on peut provoquer une chute de la permittivité induite par la polarisation des membranes. A travers quelques relations mathématiques, il est alors possible de relier la permittivité enregistrée, au volume cellulaire global.

7.2.3 Le dosage des métabolites

Il est possible d'assurer un suivi en-ligne des espèces par la mise en place de méthodes permettant de doser ces métabolites directement dans le surnageant de culture. En effet, le suivi de la concentration de certains métabolites clefs du métabolisme peut permettre d'améliorer le contrôle de la culture par le calcul des rapports stœchiométriques [?].

Actuellement, le suivi des métabolites est communément réalisé par des mesures hors-ligne, soit par des méthodes enzymatiques, soit par CLHP. D'autres outils pointus tels que la spectroscopie de fluorescence, la RMN ou la spectroscopie de masse sont aussi envisageables. Tous se heurtent cependant à une problématique de taille, à savoir la nécessité de prélever de manière stérile et automatisée des échantillons dans le milieu de culture. D'autre part, la matrice d'analyse est particulièrement complexe et ces techniques imposent le plus souvent une extraction en amont visant à purifier l'échantillon. La présence de microporteurs rend cette phase de purification relativement délicate et longue à réaliser, inconvénient majeur pour une démarche PAT.

Dans ce contexte, les méthodes spectroscopiques, telles que la spectroscopie Raman et la spectroscopie infrarouge sont particulièrement avantageuses. Implantées *in situ* par le biais de sondes stérilisables, elles permettent d'acquérir des données en temps réel rapidement, de manière non invasive et sans préparation préalable des

échantillons.

7.2.3.1 La spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une méthode non-destructive permettant de caractériser la composition moléculaire et la structure d'un milieu. Cette technique est fortement complémentaire de la spectroscopie infrarouge, qui permet également d'étudier les modes vibrationnels d'un matériau. La méthode consiste à focaliser un faisceau de lumière monochromatique sur un échantillon puis à étudier et à analyser la lumière diffusée⁷.

Le spectre Raman résultant présente l'intensité des radiations, fonction de la longueur d'onde du faisceau d'excitation. En raison de la complexité des milieux de culture, les spectres obtenus sont parfois particulièrement chargés et difficiles à traduire.

La spectroscopie Raman a déjà montré son potentiel pour l'identification de composés solubles dans divers procédés biotechnologiques. Pour l'instant aucune application ne concerne directement les cellules animales, mais la spectroscopie Raman a déjà été utilisée, notamment pour suivre la production d'éthanol par les levures [?].

7.2.3.2 La spectroscopie IR

La spectroscopie infrarouge est une classe de spectroscopie qui traite de la région infrarouge du spectre électromagnétique (figure ??). Dans cette technologie, on étudie la réponse vibrationnelle d'une molécule suite à l'absorption de radiations électromagnétiques. La radiation émise en retour est fonction du squelette et de la nature des liaisons composant la molécule ; chaque fonction organique, et par conséquent chaque molécule, va ainsi présenter une empreinte spectrale bien particulière (figure ??).

Longtemps cette technique analytique n'a été considérée que comme une technique qualitative permettant de tester la présence ou l'absence de composés. Les avancées significatives dans le domaine du traitement des signaux notamment, ont

7. La lumière résultante est recueillie et envoyée dans un monochromateur et son intensité est alors mesurée avec un détecteur

7. L'approche PAT appliquée à la culture de cellules animales

7.2. Le PAT appliqué à la culture cellulaire

LE SPECTRE ÉLECTROMAGNÉTIQUE:

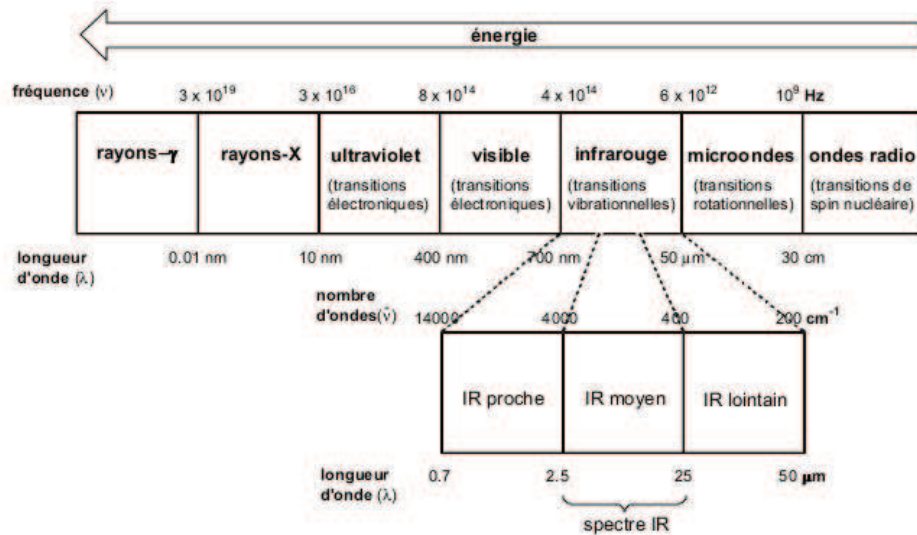


FIGURE 7.2 – Position de l'infrarouge dans le spectre électromagnétique

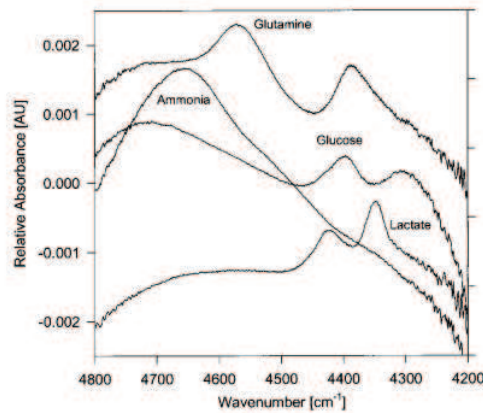


Figure 1. Superimposed absorbance spectra of pure components in phosphate/carbonate buffer at pH 7.4.

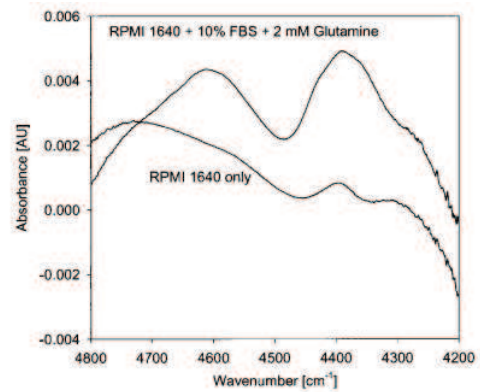


Figure 2. Absorbance spectra of cell culture media before and after adding 10% fetal bovine serum and 2 mM glutamine.

FIGURE 7.3 – Exemples de spectres proche infrarouge de composés classiques des milieux de culture [?]

permis d'explorer une nouvelle partie du spectre électromagnétique et d'étudier des échantillons avec des longueurs d'ondes plus faibles (MIR, NIR) permettant le dosage des métabolites. Cette méthode analytique est maintenant très présente dans

l'arsenal analytique des laboratoires de contrôle qualité ; son caractère non invasif en fait une méthode de choix pour tester les matières premières, les produits finis ainsi que pour s'assurer du bon déroulement de certaines opérations unitaires en cours de production⁸.

Dans le cas précis des cultures cellulaires animales, la spectroscopie proche infrarouge a déjà démontré son intérêt dans le dosage des métabolites. Cependant, la plupart des applications restent pour l'instant « at-line », et non « in situ », ce qui constitue l'objectif final.

La principale difficulté inhérente à l'utilisation de ces techniques réside dans l'interprétation des spectres obtenus. En effet, un spectre infrarouge classique est composé d'une multitude de signaux superposés, qu'il va falloir individualiser par des outils mathématiques et informatiques tels que la PCA (Analyse en composante principale), les méthodes de régression ou les transformées de Fourier [?]. Ces techniques vont permettre d'extraire de façon sélective les informations contenues. Un autre obstacle à surmonter pour mettre en place un suivi en ligne par NIR tient à la complexité physique des milieux de culture. En effet, la présence de bulles, la viscosité du milieu ou encore une répartition biphasique, seront autant de phénomènes qui risquent de perturber l'acquisition et la qualité des spectres [?] (figure ??).

Comme nous avons pu le voir, le PAT est une solution particulièrement intéressante dans la maîtrise au quotidien des bioprocédés. Bien que l'approche PAT soit maintenant connue de tous, et qu'elle ait trouvée sa place dans les textes réglementaires les plus récents, un grand nombre d'entreprises pharmaceutiques restent encore très peu expérimentées vis-à-vis de ce concept. Il est résulte un certain scepticisme et une certaine difficulté à faire admettre les conséquences de taille que le PAT induit. Dans cette période de crise, l'argument économique sera certainement un argument critique, poussant les organisations à adopter assez rapidement ce nouvel outil.

8. Les problématiques de mélange, de séchage, de lyophilisation, de polymorphismes, ..., sont particulièrement propices à l'application de cette technique.

7. L'approche PAT appliquée à la culture de cellules animales

7.2. Le PAT appliqué à la culture cellulaire

Fermentation anaérobie	Cellules animales/ Plantes	Fermentation aérobie unicellulaire	Fermentation bactéries/ champignons filamenteux
- Faible densité cellulaire	- Faible densité cellulaire	- Haute densité cellulaire	- Haute densité cellulaire
- anaérobie	- faible aération	- aération forte	- aération forte
- agitation modérée	- agitation modérée	- agitation forte	- agitation forte
- non visqueux	- non visqueux	- viscosité faible/ modérée	- visqueux
- solution aqueuse	- solution aqueuse	- solution aqueuse	- solution aqueuse /huile
Complexité d'application de la spectroscopie proche infrarouge			

FIGURE 7.4 – Les différents niveaux de complexité dans l'application de la spectroscopie NIR aux bioprocédés [?]

Chapitre 8

La maîtrise de la qualité dans une production aseptique

Nous avons pu mettre en évidence dans le chapitre précédent que l'approche PAT offre une meilleure maîtrise du procédé. Cette approche tend à augmenter le degré de connaissance relatif au procédé, à réduire sa variabilité intrinsèque et à mettre en place un suivi ciblé sur chaque lot. Par conséquent, le PAT présente le double avantage d'améliorer la productivité du procédé, par la recherche de rendements optimaux, mais aussi le degré de qualité final du produit.

Un autre facteur va venir impacter directement la qualité du produit final aseptique ; il s'agit, non plus du procédé en lui même, mais de son environnement. Effectivement, dans le cadre de productions stériles, un ensemble de mesures préventives sont mises en place pour s'assurer qu'aucune contamination ne peut survenir durant la production. Il apparaît donc particulièrement important de consacrer un chapitre aux spécificités des productions stériles.

Ce chapitre s'attachera donc en premier lieu à redéfinir la notion de stérilité, à présenter les différentes méthodes pouvant être mises en œuvre et enfin à décrire les moyens permettant, en pratique, de limiter les biocontaminations.

8.1 Stérilité et stérilisation

Le vaccin est un produit obligatoirement stérile ; son mode d'administration exclut formellement que le vaccin soit vecteur d'un quelconque micro-organisme introduit au cours de sa fabrication. Par ailleurs, il est aussi indispensable de préserver le procédé de culture en lui même, de toute contamination extérieure qui viendrait entraver son bon déroulement.

8.1.1 La notion de stérilité

8.1.1.1 Définition

Selon les BPF et la Pharmacopée européenne, la stérilité est définie par l'absence de tout organisme vivant dans ou sur le produit ; les conditions de l'essai de stérilité sont décrites dans la Pharmacopée européenne [?].

En réalité, un produit considéré comme stérile ne signifie pas forcément qu'il est exempt de micro-organismes non désirés, mais seulement :

« qu'aucun micro-organisme contaminant n'a pu être décelé dans l'échantillon examiné, dans les conditions de l'essai ».

Par définition, l'état stérile d'un produit se traduit par la probabilité d'au plus $1/10^6$ d'y trouver un germe viable ou revivifiable. Cette notion est introduite par les autorités de santé sous le terme de niveau d'assurance de stérilité, ou NAS ; ce concept est explicité en Annexe ??.

Selon la Pharmacopée européenne [?], les formes pharmaceutiques strictement stériles sont :

- les préparations parentérales, telles que les injectables, les préparations pour perfusion¹, les gels et les implants ;
- les préparations ophtalmiques ;
- les fils chirurgicaux non résorbables stériles.

1. à utiliser en l'état, à diluer ou à dissoudre

8.1.2 La stérilisation

La stérilisation est une technique destinée à éliminer tout micro-organisme d'une préparation ou d'un produit. Ce procédé a été inventé par Nicolas Appert à la fin du XVIII^{ème} siècle sous le nom original d'appertisation. En revanche, l'explication théorique du phénomène n'a été fournie par Louis Pasteur qu'au XIX^{ème} siècle. Dans le domaine de l'industrie pharmaceutique, la stérilisation est employée dans le but d'éliminer les germes viables ou revivifiables, potentiellement infectieux, des médicaments ou des dispositifs médicaux [?].

Les lois qui régissent l'inactivation des micro-organismes sont les mêmes quel que soit le procédé choisi. Au cours de la stérilisation, la concentration d'une population bactérienne décroît de façon logarithmique en fonction du temps (figure ??).

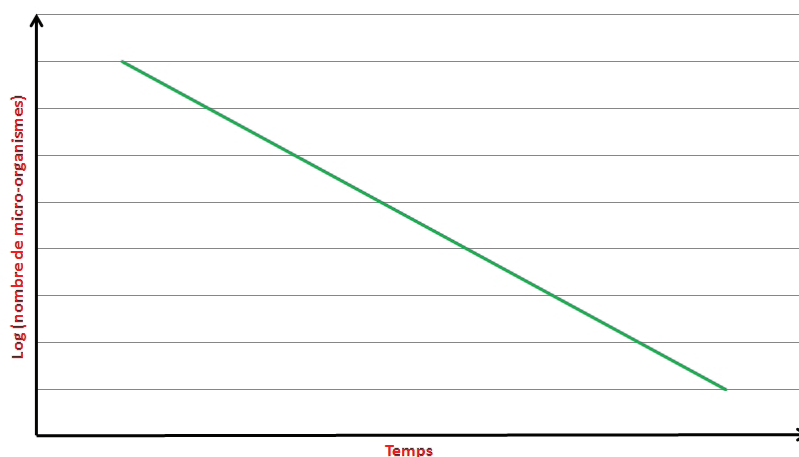


FIGURE 8.1 – Droite d'inactivation des micro-organismes

Une stérilisation efficace est une stérilisation qui permet d'obtenir une très faible probabilité de survie des spores bactériennes. La plupart des bactéries sont facilement tuées par l'action des différents procédés de stérilisation, à l'exclusion de certaines spores et de certaines formes de résistance. L'efficacité de la stérilisation dépend principalement de la charge microbienne de départ : plus le nombre de micro-organismes présents initialement est important, plus le NAS est difficile à atteindre.

Il est à noter que la stérilisation est un processus au résultat permanent ; tant

que la barrière protectrice de l'élément stérilisé n'est pas rompue, un produit stérile le restera forcément.

8.1.2.1 Validation de la stérilisation

Un certain nombre de tests sont mis en place avant et pendant la production pour s'assurer que le processus de stérilisation s'est déroulé en bonne et due forme. Selon la Pharmacopée européenne, un procédé de stérilisation doit être validé pour assurer une reproductibilité et une efficacité maximale. Cette validation de la stérilisation consiste en 3 éléments :

- la validation microbienne : cette étape ne concerne que les procédés de stérilisation dont les paramètres physiques (température, temps, ...) ne sont pas faciles à contrôler. A l'aide d'indicateurs biologiques répartis dans la charge soumise à stérilisation, la qualification consiste à démontrer que le procédé inactive l'ensemble des micro-organismes du test. Ces indicateurs biologiques sont des supports de micro-organismes de référence.
- les essais de stérilité : ces tests consistent à observer l'effet du procédé de stérilisation sur les produits fabriqués. Ils correspondent donc au contrôle d'un certain nombre d'échantillons de la production.
- la détermination de la contamination initiale : l'efficacité de la stérilisation dépend de cette biocharge initiale.

8.2 Les différentes méthodes d'obtention de la stérilité

Il existe différentes méthodes approuvées par les BPF et la Pharmacopée européenne pour la fabrication d'unités stériles. Bien que les principes mis en œuvre diffèrent, on peut les répartir en deux grandes écoles :

- la stérilisation terminale et la filtration stérilisante ;
- le remplissage aseptique, réalisé dans des conditions particulièrement surveillées de stérilité.

8.2.0.2 La stérilisation terminale

La stérilisation terminale consiste à effectuer un traitement physique sur la solution après sa fabrication. Cette stérilisation peut se faire avec ou sans le conditionnement final.

Quelle que soit la méthode employée pour stériliser un produit, le cycle de stérilisation, c'est à dire l'ensemble des opérations effectuées dans un stérilisateur pour stériliser une charge, est défini par des paramètres physiques précis (température, temps, pression, taux d'humidité, concentration en gaz selon les procédés). La stérilisation est validée prioritairement par l'examen de ces caractéristiques physiques, mais comme nous avons pu le voir, il est également possible de renforcer le contrôle par des indicateurs chimiques ou biologiques disposés au sein même de la charge à stériliser [?], [?].

Les moyens de réalisation de la stérilisation d'un produit et son contenant sont les suivants :

- la stérilisation à la vapeur d'eau : le produit est introduit dans un autoclave. L'autoclave est une enceinte close et sous pression dans laquelle la vapeur d'eau est envoyée sur les produits de manière à ce qu'aucune unité ne soit épargnée. L'action de l'eau et de la chaleur permet d'obtenir un produit stérile en dénaturant les protéines bactériennes grâce à une réaction d'hydrolyse, inhibant ainsi les mécanismes de duplication moléculaire. Cette technique possède une action sporicide particulièrement efficace. Par conséquent, elle est recommandée en première intention dès l'instant que le contenant du produit peut résister à ce traitement. Elle reste la technique la plus utilisée dans l'industrie pharmaceutique de part sa fiabilité de résultat et de part son coût.
- la stérilisation par chaleur sèche : le produit est placé dans un four muni d'un système de circulation de l'air. Ce four est appelé étuve de Poupinel ou four Pasteur. La stérilisation se fait encore une fois par l'action de la chaleur. Cette méthode est principalement utilisée pour la dépyrogénisation de la verrerie en amont d'un remplissage aseptique.
- la stérilisation par irradiation ionisante : un rayonnement gamma d'isotope ou

un faisceau d'électrons traverse le produit et les matériaux à stériliser. L'action bactéricide résulte de l'ionisation des molécules vitales telles que l'ADN ou les protéines. Cette solution est privilégiée pour les produits sensibles à la chaleur mais elle reste peu utilisée sauf pour sécuriser les PSM et les enceintes.

- la stérilisation à l'aide d'un gaz : les gaz les plus courants sont l'oxyde d'éthylène et l'acide peracétique. En raison de l'effet fortement cytotoxique du gaz, cette méthode est employée exclusivement dans le cas où aucune des autres méthodes n'est utilisable. Ces gaz nécessitent des précautions de protection particulières pour le personnel et possèdent un caractère explosif pour des concentrations supérieures à 3%, d'où une certaine difficulté de manipulation.

8.2.0.3 La filtration stérilisante

La filtration stérilisante est une technique purement mécanique qui consiste à faire passer le produit à stériliser au travers d'un filtre. Ce dernier est constitué d'une membrane stérile à pores d'un diamètre nominal de $0,22\ \mu\text{m}$.

La filtration est le résultat de deux phénomènes : d'une part, la rétention des particules par interception directe des particules en fonction de leur taille et, d'autre part, le mécanisme d'adhésion des bactéries sur les matériaux composant le filtre. La rétention des bactéries par un filtre est dépendante de plusieurs facteurs [?], tels que :

- le type de filtre : sa structure, sa composition chimique, la taille de ses pores, son épaisseur, ses dimensions, ...
- le type de fluide : sa compatibilité avec la structure du filtre, la présence de surfactants, ses composants, son pH, sa viscosité, sa force ionique, sa biocharge initiale, ...
- les conditions de la filtration : température, pression, vitesse d'écoulement du fluide, temps de contact entre le fluide et le filtre, la durée d'utilisation, ...

La filtration stérilisante est utilisée pour les médicaments qui ne peuvent pas être stérilisés dans leur récipient final car ils ne résistent pas aux traitements classiques

présentés précédemment². Ce procédé est aussi le procédé de choix pour filtrer des matières premières fluides comme par exemple les milieux de culture ou l'eau.

Malgré son optimisation permanente, la filtration reste tout de même moins performante que les autres méthodes car les risques en terme de stérilité demeurent encore importants. De plus, la filtration ne retient que les bactéries et les moisissures alors que les virus, certains mycoplasmes et les pyrogènes ne sont pas ou peu éliminés du liquide.

8.2.0.4 Le remplissage aseptique

Le remplissage est réalisé dans des conditions d'aseptie, en ZAC. Ce procédé de fabrication s'adresse aux produits qui ne peuvent pas subir un cycle de stérilisation normal car ils seraient détériorés par la montée en température. Le remplissage a lieu soit sous hotte à flux de classe A, soit dans un isolateur dans un local de classe B, afin de limiter au maximum les risques d'introduction de contaminants dans le produit ; les produits et matières premières ont été eux aussi dûment stérilisés. C'est pourquoi cette étape de remplissage n'est pas suivie d'une stérilisation supplémentaire, les conditions de stérilité étant normalement respectées en tout point de la fabrication.

Ne pouvant pas démontrer la stérilité de chaque unité d'un lot, les industries pharmaceutiques emploient la méthode de libération paramétrique. Selon les BPF [?], la libération paramétrique des produits stériles est :

« un système de libération propre à assurer que le produit est de la qualité requise, sur la base d'informations recueillies en cours de fabrication ».

La libération d'un lot aseptique repose sur un ensemble de paramètres qui doivent être tous conformes pour pouvoir assurer que chaque unité de produit fabriquée est stérile (figure ??). La libération du produit fini est basée à posteriori sur les données de suivi et sur les contrôles de l'ensemble de ces paramètres. Les informations recueillies in-process peuvent être multiples :

- contrôle de la contamination microbiologique ;
- test de stérilité des produits ;

2. produits hygroscopiques ou thermolabiles

- indicateurs biologiques de stérilisation d'équipements.

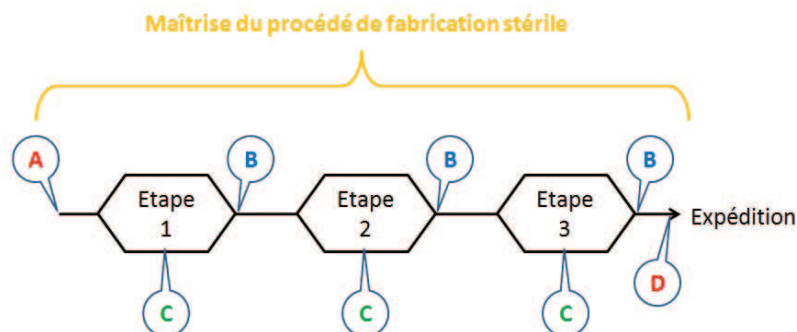


FIGURE 8.2 – Recueil de données aux différentes étapes du procédé de fabrication [?]

- A : contrôle des matières premières et des articles de conditionnement à la livraison par les fournisseurs. Les contrôles permettent de vérifier notamment que ces composants sont exempts de tout micro-organisme afin qu'ils ne soient pas source de contamination.
- B : contrôles en cours de production : contrôles intermédiaires effectués tout au long du procédé de fabrication permettant de suivre la qualité du produit.
- C : auto-contrôles : contrôles directement réalisés par les producteurs. Par exemple, la mesure de pH ainsi que la coloration du milieu d'une culture cellulaire peuvent refléter une contamination bactérienne.
- D : contrôles du produit fini : contrôles physico-chimiques, bactériologiques et fonctionnels aboutissant à la libération du lot.

Il est communément reconnu [?] :

« qu'un ensemble exhaustif d'essais et de contrôles en cours de fabrication peut constituer un moyen plus efficace de garantir le respect des spécifications du produit fini que les tests pratiqués sur le seul produit fini ».

Selon l'EMA, la libération paramétrique n'est possible qu'à condition que le procédé de stérilisation soit validé, qu'un suivi en cours de production soit instauré et que la

robustesse du procédé soit démontrée. Elle est validée par une étude pointue visant à assurer le niveau de stérilité du produit qui nécessite la validation du procédé de fabrication de produits stériles et une bonne définition des critères d'acceptation d'un lot conforme.

8.3 Limitation des sources de contamination

Comme nous avons pu le préciser, limiter les sources de contamination est une préoccupation cruciale pour assurer la qualité du produit final.

Cette limitation des biocontaminations repose sur deux piliers essentiels : la maîtrise des salles propres et du personnel.

8.3.1 Les salles propres

8.3.1.1 Définition

Les produits stériles sont fabriqués dans des zones de travail particulières appelées : salle propre, salle blanche, zone à empoussièrement contrôlé ou encore zone à atmosphère contrôlée. Selon la norme NF EN ISO 14644 [?], une particule se définit comme étant :

« Un objet solide ou liquide dans le cadre de la classification de la propreté de l'air, appartenant à une distribution cumulée qui est fondée sur une taille, de limite inférieure, dans l'intervalle allant de 0,1 μm à 0,5 μm ».

Selon la même norme, une salle propre est :

« Une salle dans laquelle la concentration de particules en suspension dans l'air est maîtrisée et qui est construite et utilisée de façon à minimiser l'introduction, la production et la rétention de particules à l'intérieur de la pièce et, dans laquelle d'autres paramètres pertinents tels que la température, l'humidité et la pression sont maîtrisés comme il convient ».

8.3.1.2 Classification

La ZAC est un espace clos construit et utilisé de façon à réduire l'introduction, la multiplication ou la persistance de substances contaminantes. Ce sont des zones de travail conçues de manière à pouvoir maîtriser l'environnement de la production. Comme leur nom l'indique, l'air est contrôlé régulièrement pour s'assurer qu'il n'y a pas eu de micro-organismes ou de particules introduites dans ces locaux.

Ainsi, suivant l'activité au sein de la ZAC, les exigences réglementaires diffèrent. Selon le niveau de qualité d'environnement requis, les salles propres sont classées en quatre catégories. Pour chacune d'elles, les BPF définissent des normes à respecter [?]. En effet, le taux de particules solides et le nombre de micro-organismes tolérés dans l'environnement sont plus stricts pour des médicaments injectables, obligatoirement stériles (classe A), que pour des comprimés (classe C ou D).

Il existe différentes sources réglementaires qui régissent la classification des salles propres. Le tableau ?? présente les correspondances entre les trois réglementations en vigueur.

Selon les BPF [?], la classe 1, classe la plus stricte, correspond à la qualité d'air présent dans un isolateur ou une hotte à flux laminaire (HFL). Cet équipement est toujours installé dans un environnement de classe B afin de diminuer la probabilité d'introduction de contaminants sous la hotte. Les classes C et D suffisent pour la production de médicaments lorsqu'il n'y a aucun contact du produit avec l'environnement extérieur : le produit est contenu dans un récipient fermé (ampoule, flacon, bouteille, ...)

8.3.1.3 La conception des locaux

Les locaux sont construits de manière à limiter les risques d'accumulation en micro-organismes dans la zone [?]. Plusieurs aspects sont pris en compte avant la construction d'une ZAC : les matériaux, l'agencement des locaux et les installations.

Le but est de minimiser l'exposition du produit stérile à des contaminations potentielles. Ainsi, les consignes données par les autorités américaines sont les suivantes [?] :

référentiels	GMP	BPF	ISO 14644-1	Surveillance particulaire au repos, part. de 0,5µm/m³	Surveillance microbiologique UFC/m³
Classes	M 3.5 ou 100	A	5	3500	<1
	M 4.5 ou 1000	B	6	3500	10
	M 5.5 ou 10 000	C	7	350000	100
	M 6.5 ou 100 000	D	8	3500000	200

TABLE 8.1 – Correspondance des différentes classifications caractérisant les salles propres

- limiter la durée d'exposition du produit à l'environnement ;
- contrôler l'environnement ;
- optimiser le flux de production ;
- choisir des équipements adaptés aux conditions de la classe A ;
- optimiser les flux du personnel et du matériel pour prévenir des mouvements superflus ;
- limiter les mouvements du personnel en installant des postes de travail ergonomiques ;
- encadrer le nombre d'opérateur et limiter leurs allées et venues ;
- concevoir les équipements de manière à réduire les interventions ;
- utiliser des sas de transfert entre les zones ;
- faciliter la stérilisation des équipements ;
- organiser les flux d'air sans perturbation.

Les ZAC sont construites de façon à ce que [?] :

« Chaque opération soit réalisée dans une zone dédiée et organisée de manière à éviter toute contamination ou mélange de produits ».

Pour chaque zone, il faut tenir compte des points suivants :

- des conditions de travail : la zone en pression positive doit être équipée de système HVAC (Heating, Ventilating, Air, Conditionning), de système de traitement de l'air et de ventilation.

« Pendant la fabrication, une alimentation en air filtré doit maintenir en toutes circonstances une pression positive ». [?]

La température (18 à 20 °C) et l'humidité relative (30 à 55%) sont contrôlées car elles ne doivent pas être trop élevées pour ne pas favoriser la croissance bactérienne et pour conserver des conditions de travail confortables.

- de l'agencement de la zone : toutes les surfaces sont lisses, imperméables, sans fissures et résistent aux traitements chimiques ; les coins sont à bannir. Les meubles, les étagères et le matériel sont en nombre limité.
- des équipements : les éviers sont exclus des zones classées A et B.

- des matériaux et matériels : l'inox est le matériau le plus souvent employé, il possède les propriétés adaptées pour l'environnement d'une ZAC : peu rugueux, facilement lavable et stérilisable avec un faible pouvoir relarguant. Le matériel est le plus souvent du matériel à usage unique, plus pratique à manipuler. La gestion des déchets prend par contre un caractère particulièrement important.
- de l'alimentation en fluide : l'eau et l'air entrant dans la ZAC sont transportés dans des canalisations conçues de telle manière qu'il n'existe pas de niche. L'eau est maintenue à une température de 70 °C pour ne pas favoriser le développement bactérien.
- des sas d'entrée et de sortie : l'air filtré ventile les différents sas tout en maintenant une cascade de pression de telle façon que les particules ne pénètrent pas dans la ZAC, c'est à dire par une surpression de l'intérieur vis-à-vis de l'extérieur. Ceci permet de limiter les mouvements d'air et donc les transferts de particules vers la ZAC.

La conception des salles blanches a changé depuis l'apparition des isolateurs. L'isolateur présente pour avantage principal la réduction du contact Homme/produit. Cependant l'investissement de départ est conséquent, c'est pourquoi ce type d'équipement est tout de même réservé à des productions spécifiques comme celles de produits à caractère thermolabile remplis en conditions aseptiques ou de produits dangereux.

8.3.1.4 La problématique de l'air

Il s'avère nécessaire de limiter le risque de dépôt des particules. Pour cela, des systèmes réalisant des flux d'air laminaires, c'est à dire réguliers, homogènes et unidirectionnels, sont mis en place dans les zones de fabrication. Ceci permet aux particules d'être portées par des courants horizontaux, tourbillonnaires ou ascensionnels et d'éviter ainsi leur chute sur les surfaces, sur le personnel ou directement sur le produit.

Les ZAC sont alimentées d'air stérile obtenu par des filtres absolus HEPA situés aux points de soufflage et d'extraction d'air dans la zone. Ils retiennent à la fois

les particules solides et les micro-organismes contenus dans l'air. La maîtrise du traitement de l'air consiste à contrôler régulièrement le taux de renouvellement de l'air, le taux d'empoussièrement et les surpressions afin de conserver un taux de particules bas dans la zone de travail.

8.3.2 Le personnel

Le personnel est la source principale d'introduction des biocontaminants ; c'est pourquoi il est indispensable de travailler de manière rigoureuse. Une augmentation de l'activité du personnel s'accompagne irrémédiablement d'une augmentation, plus ou moins forte, du taux de particules dans l'espace de travail.

8.3.2.1 Deux principes fondamentaux

Afin de limiter l'intrusion de particules et donc de micro-organismes dans le produit stérile, il est nécessaire de suivre ces règles élémentaires.

Le nombre de personnes en ZAC

L'homme est la première source de contamination dans une salle blanche. En effet, augmenter le nombre de personnes engendre également des mouvements d'air plus importants. Les flux d'air conçus pour diriger l'ensemble des particules vers les systèmes de filtration sont alors perturbés et ne peuvent plus jouer leur rôle. Les contaminants potentiellement présents dans la zone ont alors plus de chance d'atteindre le produit.

Pour réduire au maximum les contaminants, le nombre de personnes circulant dans la ZAC en activité doit être réduit au strict nécessaire pour la production ou tout autre activité à réaliser.

L'hygiène du personnel

Le personnel doit faire preuve d'une propreté et d'une hygiène remarquables. Par exemple, si un technicien est amené à intervenir dans 2 zones distinctes où sont manipulées des cultures en micro-organismes différents, il est obligé de se doucher entre les deux zones afin d'éviter toute contamination croisée des produits.

Il est à noter qu'une personne malade ou blessée ne peut pas entrer dans une

ZAC car elle risque d'introduire des particules ou micro-organismes dans l'environnement (blessure en contact avec le produit, gouttelettes de salive projetées lors d'un éternuement, ...).

8.3.2.2 La formation du personnel

D'après les BPF [?] :

« le personnel doit recevoir, initialement et de façon répétée, une formation comprenant les aspects théoriques et pratiques du concept d'assurance qualité ».

Dans le cas des productions aseptiques, le personnel amené à intervenir dans une ZAC reçoit également une formation spécifique comportant des consignes d'hygiène et des notions de microbiologie. Il convient également d'évaluer régulièrement les acquis du personnel [?] :

« La formation continue du personnel doit être assurée et son efficacité pratique périodiquement évaluée ».

On constate en effet une certaine dérive dans les gestes et les bonnes pratiques du personnel qu'il convient de limiter.

8.3.2.3 L'habillement

Pour éviter la contamination du produit, le personnel doit s'habiller avec une tenue spécifique afin de contenir les particules [?].

« Un vêtement protecteur propre et stérile (stérilisé ou désinfecté) doit être fourni à chaque opérateur en classe A/B lors de chaque séance de travail... ».

Le personnel doit ainsi respecter les procédures d'habillement en vigueur. Les vêtements personnels ne peuvent être introduits dans les vestiaires conduisant aux zones B et C. Quelques règles simples sont à respecter :

- enfiler sa tenue sans qu'elle touche le sol ;
- se laver les mains avant de rentrer en zone ;

- respecter les précautions d’usage pour enfiler les gants sans en contaminer la surface extérieure. Le gant est en effet un des vecteurs majeurs de contamination par les micro-organismes.

Selon la classe de la salle propre, la tenue à porter peut être différente : plus les normes particulières sont strictes, plus la tenue est protectrice. Dans certains cas, si le germe manipulé est fortement pathogène, les habits ont aussi pour rôle de protéger l’opérateur vis-à-vis du risque biologique inhérent au produit. Selon les BPF [?] (tableau ??) :

« Les vêtements et leur qualité doivent être adaptés aux fabrications et aux classes des zones de travail ».

Les vêtements utilisés sont de deux types :

- à usage unique en matière non tissée. Par définition, l’usage unique présente deux avantages : la diminution des risques de contamination croisée et une facilité de gestion des tenues car la tenue est utilisée puis jetée.
- réutilisable après stérilisation. Pour être réutilisées, ces tenues doivent être stérilisées par autoclavage, rayonnement β ou γ .

	A/B	C	D
Corps	Veste + pantalon ou combinaison, serrées au poignet avec un col montant	Veste + pantalon ou combinaison, serrées au poignet avec un col montant	Vêtement protecteur normal
Tête	Cagoule pour les cheveux, masque pour le visage, barbe et moustaches recouvertes	Cheveux, barbe et moustaches recouvertes	Cheveux, barbe et moustaches recouvertes
Mains	gants en plastique ou caoutchouc stérilisés et non poudrés	-	-
Pieds	Bottes stérilisées ou désinfectées, enserrant le bas de pantalon	Chaussures et couvre-chaussures	Chaussures et couvre-chaussures

TABLE 8.2 – Les tenues de travail selon la classification des zones [?]

Conclusion

Les vaccins constituent une classe thérapeutique qui possède plusieurs spécificités, tant au niveau des méthodes de production en vigueur, qu’au niveau de leur formulation et de leur administration. Historiquement, les vaccins sont les premiers représentants d’une catégorie de spécialités en forte croissance : biomédicaments. A travers le temps, les vaccins n’ont cessé d’évoluer jusqu’à atteindre, de nos jours, des formes faisant largement appel aux techniques de génie génétique. Malgré tout, cette classe thérapeutique est totalement indissociable des technologies de culture cellulaire. Ces dernières décennies, la lignée cellulaire Vero a massivement été utilisée par de nombreux laboratoires pour permettre la production de vaccins à des échelles importantes. A des fins d’optimisation, il est donc particulièrement utile de connaître les spécificités de culture, ainsi que d’avoir un aperçu juste du métabolisme de cette lignée.

Pour répondre à ces problématiques de compréhension du métabolisme cellulaire, une alternative de choix repose sur la mise en place de modèles mathématiques schématisant le comportement des cellules en culture. Nous avons pu constater, à travers notre étude, que la modélisation est une solution de choix, qui peut fournir des résultats satisfaisants. En contrepartie, cet outil est aussi relativement complexe, et impose d’être mis en place avec des personnes compétentes en la matière. Pour l’instant, les outils de modélisation sont encore assez peu présents dans les industries de santé, mais il est fort à parier qu’il deviendront certainement une habitude dans les années à venir.

L’âge d’or de l’industrie pharmaceutique est révolu et cette dernière doit mainte-

nant faire face à de nouveaux défis. Actuellement, le climat économique est beaucoup moins faste ; les pertes de brevet et l'arrivée des génériques créent un environnement fortement concurrentiel pour lequel productivité et économies sont de rigueur. Parallèlement, les autorités de santé exigent un degré de qualité de plus en plus élevé, alors même que les procédés de production sont de plus en plus complexes. Ces deux raisons justifient la démocratisation de l'approche PAT au sein des entreprises de santé. Cette nouvelle démarche implique de mieux comprendre les différentes étapes de la fabrication de manière à pouvoir en maîtriser et en certifier le bon déroulement. L'emploi du PAT est particulièrement approprié dans le domaine des biotechnologies qui mettent en jeu des phénomènes relativement complexes ; en effet, les procédés biotechnologiques sont soumis aux aléas liés à l'utilisation de matériel biologique. En terme de résultat, l'objectif du PAT est *in fine* de réduire la variabilité intrinsèque aux process, ce qui permet de gagner aussi bien en terme de productivité que de qualité.

Parallèlement à l'application sur le terrain de bonnes pratiques de fabrication permettant la maîtrise des biocontaminations, il est alors possible des standardss de qualité particulièrement élevés. Cependant, bien que cette approche soit indiscutablement positive, en terme de productivité et de qualité, elle suscite encore plusieurs inquiétudes et l'avenir reste flou quant à la rapidité de sa mise en place.

Bibliographie

- [1] 2000 AFNOR. Norme NF EN ISO 14937 ; Stérilisation des produits de santé.
- [2] 2003 AFNOR. Norme ISO 14644 ; Salles propres et environnement maîtrisés apparentés, Partie 6 : Vocabulaire.
- [3] AFSSAPS. *Bonnes pratiques de production et de fabrication pharmaceutique, Chapitre 2 : le personnel*. 2007.
- [4] AFSSAPS. *Fabrication des médicaments stériles*. Ligne directrice particulière 1, 1 edition, 2007. 48-59.
- [5] AFSSAPS. *Fabrication des médicaments stériles*. Ligne directrice particulière 1, 1 edition, 2007. 108-110.
- [6] P.N. Barrett, W. Mundt, O. Kistner, and M.K. Howard. Vero cell platform in vaccine production : moving towards cell culture-based viral vaccines. *Vaccines*, 8(5) :607–618, 2009.
- [7] E.J. Bauer. *Pharmaceutical packaging handbook*. Informa Healthcare, Pittsburgh, 1st edition, 2006.
- [8] LEEM Comité Biotech. Bioproduction 2008, État des lieux et recommandations pour l’attractivité de la France. Rapport de synthèse - LEEM, 2008.
- [9] G. Birol, P. Doruker, B. Kirdar, Z.I. Ansan, and K. Algen. Mathematical description of ethanol fermentation by immobilised *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, 33(7) :763–771, 1998.
- [10] P. Bogaerts. *Contribution à la modélisation mathématique pour la simulation et l’observation d’états des bioprocédés*. PhD thesis, Université libre de Bruxelles - Faculté des sciences appliquées, 1999.

- [11] S. Carmaux. Caractérisation de la mort des cellules animales cultivées en bioréacteur. Master's thesis, Faculté de pharmacie de Nancy, 2008.
- [12] S. Chevret. Modèles mathématiques utilisés en médecine. *Réanimation*, 16(3) :240–244, 2007.
- [13] C. Danan and A. Rachon. Qualification des performances des filtres stérilisants. *Techniques de l'ingénieur*, Réf. P3 354, 2006.
- [14] C. Danan and C. Vadrot. Contrôle et validation des procédés de stérilisation des dispositifs médicaux par des méthodes microbiologiques. *Techniques de l'ingénieur*, Réf. P3 354, 2006.
- [15] Roche Diagnostics. Apoptosis and Cell Proliferation. http://www.rocke-applied-science.com/sis/apoptosis/docs/21552_Apoptosis.pdf-Consultationfévrier2010.
- [16] H. Dorai, S.K. Yun, D. Ellis, C. Kinney, C. Lin, D. Jan, G. Moore, and M.J. Ben-tenbaugh. Expression of anti-apoptosis genes alters lactate metabolism of Chinese Hamster ovary cells in culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(3), 2009.
- [17] D. Duval, C. Demangel, I. Geahel, K. Blondeau, and A. Marcadet. Comparison of various methods for monitoring hybridoma cell proliferation. *Journal of Immunological Methods*, 134(2) :177–185, 1990.
- [18] J.M. Eakman, A.G. Fredrickson, and H.M. Tsuchiya. Statistics and Dynamics of Microbial Cell Populations. *Chemical Engineering Progress Symposium Series*, 69 :37–49, 1966.
- [19] R.W. Ellis. New technologies for making vaccines. *Vaccine*, 17(13-14) :1596–1604, 1999.
- [20] Food and Current good manufacturing practice drug administration. Guidance for industry, Sterile drug products produced by aseptic processing. 2004.
- [21] Food and Current good manufacturing practice drug administration. Manufacturing, processing, packaging or holding drugs, 21 CFR, Part 211. 2003.

- [22] Food and Guidance for Industry drug administration. PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. <http://www.fda.gov/cvm/guidance/published.html>. 2004.
- [23] P. Gaulé and M. Kaddar. Le marché mondial des vaccins : évolution et dynamisme. *ReMed ; Réseau médicament & développement*, 29 :1–4, 2004.
- [24] N. Guerin. Histoire de la vaccination : de l’empirisme aux vaccins recombinants. *La Revue de médecine interne*, 28(1) :3–8, 2007.
- [25] J.C. Guichard. Les salles propres (salles blanches), du Fédéral Standard aux normes ISO. <http://www.aspec.fr;Consultationmars2010>.
- [26] Gleave S. Butler M. Hassell, T. Growth inhibition in animal cell culture - The effect of lactate and ammonia. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 30(1) :29–41, 1991.
- [27] H. Huang, Y. Yu, X. Yi, and Y. Zhang. Nitrogen metabolism of asparagine and glutamate in VERO cells studied by $1\text{H}/15\text{N}$ NMR spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(2) :427–436, 1996.
- [28] M. Kaddar. Marché mondial du vaccin et besoins des PED. Extrait de conférence - OMS, 2006.
- [29] J.F. Kerr, A.H. Wyllie, and Currie A.R. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4) :239–257, 1972.
- [30] C. Kontoravdi, D. Wong, C. Lam, Y.L. Yih, M.G.S. Yap, E.N. Pistikopoulos, and A. Mantalaris. Modeling amino acid metabolism in mammalian cells - Toward the development of a model library. *Biotechnology Progress*, 23(6) :1261–1269, 2007.
- [31] P. Kourilsky. Extrait de conférence - La vaccination : problèmes de science, question de société. Collège de France - Chaire d’immunologie moléculaire, 2003-2004.
- [32] M. Lecina, A. Soley, J. Gracia, E. Espunya, B. Lazaro, J.J. Cairo, and F. Godia. Application of on-line OUR measurements to detect actions points to im-

- prove baculovirus-insect cell cultures in bioreactors. *Journal of Biotechnology*, 125(3) :385–394, 2006.
- [33] F. Llaneras and J. Pico. Stoichiometric modelling of cell metabolism. *Journal of biosciences and bioengineering*, 105(1) :1–11, 2008.
- [34] J. Lobry. *Réévaluation du modèle de croissance de Monod. Effet des antibiotiques sur l'énergie de maintenance*. PhD thesis, Université Claude Bernard - Lyon I, 1991.
- [35] L. Luanfeng, S. Ming, and S. Yigao. A single-use, scalable perfusion bioreactor system. *BioProcess International*, 7(5S) :18–23, 2009.
- [36] R.D. Mcgee, J.F. Drake, A.G. Fredrickson, and H.M. Tsuchiya. Studies in intermicrobial symbiosis. *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus casei*. *Canadian Journal of Microbiology*, 18(11) :1733–1742, 1972.
- [37] S. Mendivil and A. Burns. Quality by Design : Current Regulatory Status and Future Challenges. *BioProcess International*, 7(S) :84–87, 2009.
- [38] O.W. Merten. Editorial : Safety for vaccine(e)s. *Cytotechnology*, 34(3) :181–183, 2006.
- [39] O.W. Merten. Introduction to animal cell culture technology - Past, present and futur. *Cytotechnology*, 3(1-3) :181–183, 2006.
- [40] O.W. Merten, R. Wu, E. Couvel, and R. Crainic. Evaluation of the serum-free medium MDSS2 for the production of poliovirus on Vero cells in bioreactors. *Cytotechnology*, 25(1-3) :35–44, 1997.
- [41] J. Montagnon, A. Nicolas, B. Fanget, and L. Peyron. Comparison of sensitivity of VERO cell line versus primary monkey kidney cells in the detection of residual live polio virus during and after inactivation. *Developments in biological standardization*, 47 :151–156, 1981.
- [42] J. Neermann and R. Wagner. Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *Journal of Cellular Physiology*, 166(1) :152–169, 1996.

- [43] New Brunswick Scientific. Catalogue New Brunswick Scientific. http://www.nbsc.com/bioflopro_cc.aspx-Consultationmars2010.
- [44] Institut Pasteur. Les vaccins du futur. <http://www.pasteur.fr/actu/presse/com/dossiers/vaccins/vacfuturs.html;Consultationjanvier2010>.
- [45] M. Pedot. Maîtrise des biocontaminations au cours d'une production aseptique. Cas d'application : production de principe actif viral produit par la technique dite en "Monolayer". Master's thesis, Faculté de pharmacie de Nancy, 2008.
- [46] E. Petiot. *Procédés de cultures de cellules Vero en milieu sans sérum : contribution au développement d'une stratégie PAT*. PhD thesis, Institut polytechnique de Lorraine, Nancy, France, 2009.
- [47] 5ème édition Pharmacopée européenne. Chapitre 2.6.1 : Stérilité, Référence 01-2005-20601. <http://online.phEur.org/entry.htm;Consultationmars2010>.
- [48] S.L. Plotkin and S.A. Plotkin. A short history of vaccination. In *Vaccines*, 4th edition.
- [49] M.N. Pons, S.L. Bontao, and O. Potier. Spectral analysis and fingerprinting for biomedica characterisation. *Journal of Biotechnology*, 113(1-3) :211–230, 2004.
- [50] S. Quesney, A. Marc, C. Gerdil, C. Gimenez, J. Marvel, Y. Richard, and B. Meignier. Kinetics and metabolic specificities of Vero cells in bioreactor cultures with serum-free medium. *Cytotechnology*, 42(1) :1–11, 2003.
- [51] M. Rey and R. Triaou. Les vaccins. *La Semaine des hôpitaux de Paris*, 62(48-49) :3823–3848, 1986.
- [52] M. Rhiel, M.B. Cohen, D.W. Murhammer, and M.A. Arnold. Nondestructive near-infrared spectroscopic measurement of multiple analytes in undiluted samples of serum-based cell culture media.
- [53] J.E. Ricci. Les mécanismes moléculaires de l'apoptose. INSERM U526, Faculté de médecine de Nice. <http://www.123bio.net/revues/jericci/iapoptose.html-Consultationfévrier2010>, 2000.

- [54] Ozturk S. and Wei-Shou H. *Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies*. Biotechnology and bioprocessing, taylor & francis ltd, 1st edition edition, 2004.
- [55] M. Scarff, S.A. Arnold, L.M. Harvey, and B. McNeil. Near infrared spectroscopy for bioprocess monitoring and control : Current status and future trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, 26(1) :17–39, 2006.
- [56] Wikipedia Johann Dréo schéma libre de droit. Les algorithmes évolutionnistes. http://fr.wikipedia.org/wiki/Algorithme_evolutionniste; Consultationmars2010.
- [57] M. Schneider, I.W. Marison, and U. Von Stockar. The importance of ammonia in mammalian cell culture. *Journal of Biotechnology*, 46(3) :161–185, 1996.
- [58] B. Schwikowski, P. Uetz, and S. Fields. A network of protein-protein interactions in yeast. *Nature Biotechnology*, 18(12) :1257–1261, 2000.
- [59] Sartorius Stedim. Catalogue Sartorius Biotech. <http://www.sartorius-stedim.com/index.php?id=2016&L>; Consultationmars2010.
- [60] M. Thilakavathi, T. Basak, and T. Panda. Modeling of enzyme production kinetics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(5) :991–1007, 2007.
- [61] N. Trijau. Production de vaccins et d’anticorps par les plantes. Master’s thesis, Faculté de pharmacie de Nancy, 2008.
- [62] D. Wang, W. Liu, B. Han, and R. Xu. The bioreactor : a powerful tool for large-scale culture of animal cells. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 6(5) :397–403, 2005.
- [63] J.N. Warnock and M. Al-Rubeai. Bioreactor systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 45(1) :1–12, 2006.
- [64] W. Whitford and J. Cadwell. Interest in hollow-fiber perfusion bioreactors is growing. *BioProcess International*, 7(5) :54–64, 2009.

-
- [65] Dong Z., Saikumar P., Weinberg J. M., and Venkatachalam M.A. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. *American journal of pathology*, 151(5) :1205–1213, 1997.
- [66] A.-P. Zeng, W.-S. Hu, and W.-D. Deckwer. Variation of stoichiometric ratios and their correlation for monitoring and control of animal cell cultures. *Biotechnology Progress*, 14(3) :434–441, 1 998.

Annexe A

Rédiger un document sous L^AT_EX

A la lecture de cette thèse, peut être aurez-vous remarqué qu'elle se distingue des autres thèses d'exercices en pharmacie par son allure et par son style typographique. Ce constat s'explique par le fait que l'intégralité de cette thèse a été réalisé sous L^AT_EX.

Qu'est ce que L^AT_EX ?

L^AT_EX est un logiciel de traitement de texte que j'ai découvert à l'ENSIC et qui est une bonne alternative aux autres logiciels de traitement de texte plus connus tels que *Word*[®]¹.

L^AT_EX permet un rendu visuel proche de celui des ouvrages d'imprimerie et s'occupe automatiquement de la mise en forme des documents : table des matières, légendes, liste des tableaux, références, gestion de la bibliographie, ... etc. L^AT_EX constitue donc un outil particulièrement propice à la rédaction de documents scientifiques tels que les thèses, puisqu'il est parfaitement adapté à la taille des documents, à l'insertion de graphiques et de tableaux, ainsi qu'à la gestion de la bibliographie.

En contrepartie, ce confort et cette qualité de présentation ont un coût ; en effet, L^AT_EX est beaucoup plus compliqué à prendre en main pour un néophyte et demande un certain investissement à l'origine. Cela demande un peu d'effort et de temps pour

1. A l'inverse de L^AT_EX, Word[®] est un logiciel de traitement de texte, dit WYSIWYG : What You See Is What You Get

assimiler les fonctions de base mais cela fait économiser par la suite énormément d'énergie.

$\text{\LaTeX}$ fonctionne en deux étapes :

- l'écriture du texte sous forme d'instructions de codage ;
- l'interpolation et la création du document final, après compilation.

Pour exemple, voici un morceau choisi de ce chapitre :

```
\chapter{Rédiger un document sous \LaTeX{}} \label{annexe:latex}

A la lecture de cette thèse, peut être aurez vous remarqué qu'elle
se distingue des autres thèses d'exercices en pharmacie par son
allure et par son style typographique. La raison à cette constatation
est que l'intégralité de cette thèse a été réalisé sous \LaTeX{}.

\index{Latex@\LaTeX{}}

\noindent \textbf{Qu'est ce que \LaTeX{} ?}

\LaTeX{} est un logiciel de traitement de texte que j'ai découvert à
l'ENSIC, qui est une bonne alternative aux autres logiciels de
traitement de texte plus connus tels que \emph{Word}$^{\circledR}$.
```

Les solutions que j'ai utilisées

Si vous êtes parvenus jusqu'ici c'est que $\text{\LaTeX}$ vous intéresse au moins un peu et que vous allez peut-être l'essayer. Dans ce cas vous remarquerez que $\text{\LaTeX}$ ne fonctionne pas comme un logiciel traditionnel et qu'il fonctionne grâce à deux entités distinctes : le coeur de $\text{\LaTeX}$, qui travaille en coulisses, et l'éditeur de texte.

Pour ma part, j'ai utilisé les éléments suivants qui sont extrêmement populaires :

- Le coeur de $\text{\LaTeX}$: utilisation de MikTeX, disponible sur <http://miktex.org/> ;
- L'éditeur de texte : utilisation de T_EXmaker.

Annexe B

Les algorithmes évolutionnistes

Définition principe de fonctionnement

La classe des algorithmes évolutionnistes regroupe toutes les métaheuristiques basées sur des populations et qui utilisent des mécanismes inspirés de l'évolution biologique et des théories néo-darwiniennes. Cette méthodologie d'optimisation emprunte d'ailleurs tout son vocabulaire à la biologie.

L'idée des algorithmes évolutionnistes est de s'inspirer du modèle de la théorie de l'évolution proposée par Darwin pour faire évoluer une population initiale d'individus sur plusieurs générations de manière à sélectionner les meilleurs individus. Bien entendu les mots de « population » et « d'individus » recouvrent ici un sens mathématique tout à fait singulier :

- un individu correspond en réalité à un vecteur de coefficients ;
- une population est quant à elle un ensemble d'individus.

La notion de « meilleur » individu est associée à celle de performance des individus. D'un point de vue mathématique, cette performance est exprimée à partir du critère que l'on cherche à optimiser (eq. ??).

$$Min_X J(X) = \sum_{especes} \left(\sum_{nbpts} \left(\frac{(X_{theo} - X_{exp})^2}{X_{exp}} \right) \right) \quad (B.1)$$

Principe de fonctionnement

1. La première étape consiste à générer aléatoirement un nombre d'individus,

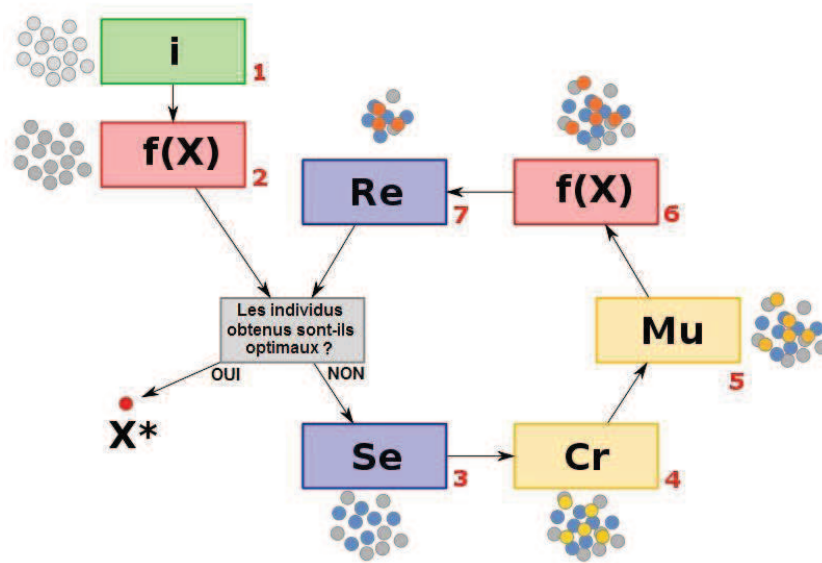


FIGURE B.1 – Schéma récapitulatif du fonctionnement d'un algorithme évolutionniste [?]

notés i sur le schéma.

2. On applique ensuite le modèle sur chacun de ces individus. Chaque individu décrit un vecteur de paramètres du modèle qui permet de prédire des profils de concentrations. On évalue ensuite leur performance ; dans notre cas, la performance correspond à l'écart quadratique entre valeurs théoriques et expérimentales.
3. S'en suit l'étape de sélection (Se) pour laquelle on conserve les individus les plus performants et on rejette les individus les moins efficaces.
4. Ces individus performants seront croisés entre eux (Cr). D'un point de vue mathématique, cela signifie que l'on mélange entre eux les coefficients d'individus différents. On exploite les caractéristiques des meilleurs individus pour créer de nouveaux individus encore plus performants.
5. Parallèlement, les individus subissent aléatoirement des mutations (Mu). La force de ces algorithmes est qu'à chaque génération on réintroduit une part de hasard dans les populations.

6. La performance des individus est à nouveau réévaluée par $f(x)$.
7. un certain nombre d'individus sont remplacés, et si le critère d'arrêt n'est pas satisfait, le cycle recommence en position 3.

A l'issue de plusieurs générations, ce processus itératif permettra à l'algorithme de faire converger la population vers un ensemble d'individus proches de l'optimum.

Parmi les différentes options que l'on peut modifier pour faire varier l'optimisation, on trouve :

- les bornes du domaine de recherche : qui définissent l'intervalle dans lequel pourront se trouver les valeurs aléatoirement générées ;
- le nombre d'individus : qui correspond au nombre de points dans la population par génération. Plus ce nombre est élevé, plus les chances de générer un individu performant sont importantes mais plus la convergence est longue à obtenir (car l'algorithme traite plus d'informations) ;
- les caractéristiques d'élimination : qui définissent comment on choisit d'éliminer certains individus ;
- le critère d'arrêt stoppant l'algorithme : ici, il correspond à la différence entre le critère de performance du meilleur individu et celui du dernier individu de la population ;
- le type de codage d'un individu (haploïde ou diploïde) : dans l'algorithme utilisé, on définit un pourcentage d'individus homozygotes et hétérozygotes (les homozygotes s'apparentent à un codage haploïde) ;
- la nature des mutations et leur fréquence d'occurrence : qui correspond au nombre d'individus ou de gènes nouvellement créés au sein de la population.

L'optimum final et la durée de convergence du programme dépendront des valeurs rentrées pour ces différents critères et de la cohérence des bornes choisies.

Annexe C

Le niveau d'assurance de stérilité

Un niveau d'assurance de stérilité (NAS) défini est toléré puisqu'il est impossible de garantir une absence totale de micro-organismes viables pour tous les articles d'un même lot. Ce niveau d'assurance correspond à une contamination maximale tolérée même si, dans l'absolu, nous recherchons un taux de contamination nul au sein de l'ensemble du lot. Il convient de réaliser un plan d'échantillonnage et de faire intervenir des notions de probabilité.

L'inactivation des micro-organismes par des procédés de stérilisation suit une loi exponentielle. Pour un procédé de stérilisation donné, le NAS est fixé selon la probabilité de survie d'un micro-organisme après stérilisation. Ce NAS est fonction du nombre, du type et de la résistance des micro-organismes présents dans le produit. Quelle que soit la méthode de stérilisation choisie, le NAS recherché est de 10^{-6} selon différents textes réglementaires dont la Pharmacopée européenne [?]. Ainsi, un NAS de 10^{-6} correspond à une probabilité d'au plus un micro-organisme viable pour 1.10^6 unités stériles du produit final.

Annexe D

Liste des abréviations et nomenclature

α KG	: Alpha Cétoglutarate
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
AFSSAPS	: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
ARN	: Acide Ribonucléique
ATP	: Adénosine Tri-Phosphate
BCG	: Bacille de Calmette et Guérin
BHK	: Baby-Hamster Kidney (cell)
BPF	: Bonnes Pratiques de Fabrication
CHO	: Chinese Hamster Ovary (cell)
CLHP	: Chromatographie Liquide Haute Performance
CNRS	: Centre National de la Recherche Scientifique
CPP	: Critical Process Parameters
CO ₂	: Dioxyde de carbone
CSTBR	: Continuous Stirred-Tank Bioreactor
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DOE	: Design Of Experiment
EMA	: European Medicines Agency
EPPI (ou Eau : Eau Pour Préparation Injectable PPI)	
ENSAIA	: Ecole Nationale Supérieure d’Agronomie et des Industries Alimentaires
ENSIC	: École Nationale Supérieure des Industries Chimiques
FDA	: Food and Drug Administration
(c)GMP	: (current) Good Manufacturing Practices
GPBA	: Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires
β HCG	: Hormone Chorionique Gonadotrope
HEPA	: High Efficiency Particulate Air (filter)

TABLE D.1 – Liste des abréviations

HFL	: Hotte à Flux Laminaire
HPV	: Human Papillomavirus
HSV	: Herpes Simplex Virus
HVAC	: Heating, Ventilating, Air, Conditionning
ICH	: International Conference on Harmonisation (of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)
INPL	: Institut National polytechnique de Lorraine
IR	: Infrarouge
ISO	: International Organization for Standardization
LSGC	: Laboratoire des Sciences du Génie Chimique
PAT	: Process Analytical Technology
MDCK	: Madin-Darby Canine Kidney (cell)
N ₂	: Diazote
NaCl	: Chlorure de Sodium
NAD ⁺ /NADH	: Nicotinamide Déshydrogénase
NAS	: Niveau d'Assurance de Stérilité
NH ₃ /NH ₄ ⁺	: Ammoniac / Ammonium
NIR	: Near Infrared (proche infrarouge)
O ₂	: Dioxygène
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PCA	: Analyse en Composante Principale
pH	: Potentiel Hydrogène
PSM	: Poste de Sécurité Microbiologique
QbD	: Quality by Design
R&D	: Recherche et Développement
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
RPM	: Rotation par minute
SARS	: Severe Acute Respiratory Syndrome
SIDA	: Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SVF	: Sérum de Veau Foetal
TCA	: Tricarboxylic Acid (cycle des)
UFC	: Unités Formant Colonies
VIH	: Virus de l'Immunodéficience Humaine
WHO	: World Health Organisation
ZAC	: Zone à Atmosphère Contrôlée

TABLE D.2 – Liste des abréviations (suite)

X_V	: Concentration en cellules viables, 10^5 cellules.mL ⁻¹
X_M	: Concentrations en cellules mortes, 10^5 cellules.mL ⁻¹
dt	: Intervalle de temps, h
r_X	: Vitesse de croissance cellulaire, 10^5 cellules.mL ⁻¹ .h ⁻¹
r_M	: Vitesse de décès cellulaire, 10^5 cellules.mL ⁻¹ .h ⁻¹
μ_{app}	: Vitesse spécifique de croissance apparente, en h^{-1}
k_M	: Vitesse spécifique de décès, en h^{-1}
μ_{reel}	: Vitesse spécifique de croissance, en h^{-1}
$[S]$	: Concentration en substrat, g.L ⁻¹
$[S]_0$	: Concentration initiale en substrat, g.L ⁻¹
$[P]$	: Concentration en produit, g.L ⁻¹
$[P]_0$	: Concentration initiale en produit, g.L ⁻¹
$Y_{X/S}$	: Constantes de rendement Cellule/Substrat
$Y_{P/S}$	: Constantes de rendement Produit/Substrat
K_S	: Concentration à demi-saturation, mol.L ⁻¹
K_I	: constante d'inhibition, mol.L ⁻¹

TABLE D.3 – Nomenclature

Index

- Adjuvants, 16
- Algorithmes évolutionnistes, 71
- Algorithmes évolutionnistes, 135
- Anatoxines, 14
- Andrews, 88
- Andrews, Expression de, 58
- Batch, 31
- Cinétique de culture, 30
- Conservateurs, 18
- Croissance, 52
- Culture
 - en bioréacteurs, 20
 - en Monolayer, 20
- Décès cellulaire, 52
- Fredrickson, Classification de, 67
- Edward Jenner, 5
- K_S , 78
- L^AT_EX, 133
- Lignée cellulaire, 22
- Lissage, 74
- Microporteurs, 24, 26
- Milieu sans sérum, 27
- Modèle mathématique, 62
- Modèles
 - boîte noire, 65
 - comportementaux, 65
 - cybernétiques, 70
 - fonctionnels, 65
 - phénoménologiques, 65
- Modes d'administration, 19
- Monod, Expression de, 57
- Ovoculture, 7, 20
- Louis Pasteur, 6
- Principe actif, 13
- Rendement, 80
- Rendements, 54
- Taux de croissance, 77
- Vaccins
 - à ARN nu, 16
 - entiers inactivés, 14
 - recombinants, 14
 - sous-unités, 15
 - vivants atténués, 13
- Variolisation, 5

Vitesse spécifique de croissance, 53

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 4 mai 2010

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**

présenté par Arnaud DUIGOU

Sujet : Maîtrise des procédés de culture cellulaire pour la
production de vaccins.Jury :Président : Mme. Chantal FINANCE, Professeur à la Faculté
de PharmacieDirecteur : Mme. Annie MARC, Directeur de Recherche
CNRSJuges : M. Frantz FOURNIER, Maître de Conférences à
l'ENSAIA

Vu,

Nancy, le 29 Mars 2010

Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse

Mme. Chantal FINANCE

Mme. Annie MARC



Vu et approuvé,

Nancy, le 06 AVR. 2010

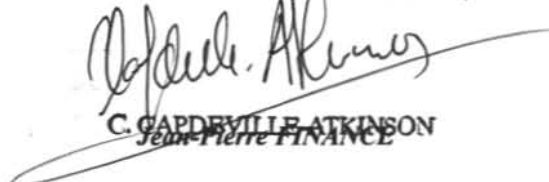
Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Francine PAULUS

Vu,

Nancy, le 13 04 - 2010

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Pour le Président
et par Délégation,
La Vice-Présidente du Conseil
des Etudes et de la Vie Universitaire,
C. GAPDEVILLE ATKINSON
Jean-Pierre FINANCE

N° d'enregistrement : 3259

N° d'identification :

TITRE

Maîtrise des procédés de culture cellulaire pour la production de vaccins

Thèse soutenue le 4 mai 2010

par Arnaud Duigou

RÉSUMÉ

Les bioprocédés ont connu un essor considérable dans les industries pharmaceutiques au cours de ces dernières décennies ; les biotechnologies y ont réussi leur pari en passant, en l'espace de quelques années, de la théorie à la réalité. À constater l'évolution forte du marché des biomédicaments, les biotechnologies et l'industrie pharmaceutique sont de plus en plus intimement liées. Ce constat est particulièrement vrai en ce qui concerne le domaine des vaccins, puisque la production de vaccins est indissociable des techniques de culture de cellules animales. Par conséquent, les principes de culture cellulaire et le métabolisme des cellules animales sont des thématiques particulièrement étudiées depuis plusieurs décennies.

Sous l'impulsion des autorités de santé et sous l'effet d'une concurrence exacerbée, les industries de santé se doivent de maîtriser de mieux en mieux leurs procédés de production, à fortiori les procédés biotechnologiques. Cette maîtrise passe par une meilleure compréhension des procédés et de leur fonctionnement, ainsi que par l'utilisation de nouveaux outils tels que les modèles mathématiques. Dans ces conditions, les modèles mathématiques permettent de jeter un pont entre l'entité microscopique qu'est la cellule, et l'aspect macroscopique et le fonctionnement du procédé.

Les problématiques de modélisation s'intègrent parfaitement dans une nouvelle approche définie par les autorités de santé : le PAT, pour Process Analytical Technology. Le déploiement de cette méthodologie PAT permet de rationaliser et d'optimiser la maîtrise du procédé. Outre l'optimisation du procédé, en lui-même, il est tout autant indispensable de veiller à l'environnement du procédé pour assurer la qualité du produit fini. Un second point déterminant dans la pratique industrielle sera donc de connaître les concepts fondamentaux pour se prémunir des biocontaminations.

MOTS CLÉS

Culture cellulaire ; (Cellules) Vero ; Production de vaccins ; PAT ; Biocontaminations

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Docteur Annie MARC	Laboratoire des Sciences du Génie Chimique UPR CNRS 6811	Expérimentale ☐
		Bibliographique ☒
		Thème : 3, 5, 6 ☐

<u>Thèmes</u>	1 - Sciences fondamentales	2 - Hygiène/Environnement
	3 - Médicament	4 - Alimentation - Nutrition
	5 - Biologie	6 - Pratique professionnelle