

Titre: Intensification de procédé via fed-perfusion pour la production de palivizumab avec une lignée cellulaire CHO inductible
Title: palivizumab with an inducible CHO cell line

Auteur: Dariouch Darimont
Author:

Date: 2025

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Darimont, D. (2025). Intensification de procédé via fed-perfusion pour la production de palivizumab avec une lignée cellulaire CHO inductible [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/67164/>

Document en libre accès dans PolyPublie Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/67164/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Olivier Henry
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Intensification de procédé via fed-perfusion pour la production de palivizumab
avec une lignée cellulaire CHO inductible**

DARIOUCH DARIMONT

Institut de génie biomédical

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie biomédical

Août 2025

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

**Intensification de procédé via fed-perfusion pour la production de palivizumab
avec une lignée cellulaire CHO inductible**

présenté par **Dariouch DARIMONT**

en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*
a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Michel PERRIER, président

Olivier HENRY, membre et directeur de recherche

Gregory DE CRESCENZO, membre

DÉDICACE

*À mes parents,
pour m'avoir transmis le goût de questionner et de comprendre
ainsi que l'esprit critique, ouvert et réfléchi,
des qualités qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici.*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr Olivier Henry, pour m'avoir fait découvrir la biofabrication et les procédés biopharmaceutiques à travers son cours passionnant. Je le remercie également de m'avoir offert l'opportunité d'accomplir mon projet de recherche, pour son encadrement et la confiance qu'il m'a accordée.

Je remercie les membres du jury : M. Gregory De Crescenzo, pour avoir accepté d'évaluer mon travail, ainsi que M. Michel Perrier, pour avoir accepté de présider mon jury.

Je voudrais chaleureusement remercier chacun des membres du labo pour m'avoir permis de travailler dans un lieu convivial et pour nos discussions éclairées. En particulier Lydia, pour son aide tout au long de mon projet, ainsi que Yuan, Hélène, Faranak et Marion.

Je tiens également à remercier Saba pour son engagement sur deux trimestres. Ce fut un réel plaisir de le former et de travailler au labo avec lui. Sa contribution au projet fut précieuse, y consacrant du temps et de l'énergie, même en dehors de ses obligations.

Ce séjour au Canada n'aurait pu être aussi enrichissant sans mes amis et mes proches. À ceux restés en Belgique dont mes parents et mon frère, merci pour leur soutien inconditionnel. Et à ceux que j'ai rencontrés à Montréal, merci de m'avoir permis de vivre une expérience unique, d'ouvrir mes horizons et de profiter pleinement de cette aventure.

RÉSUMÉ

La fabrication de protéines recombinantes thérapeutiques constitue actuellement l'un des secteurs les plus rentables de l'industrie pharmaceutique. En particulier récemment, la pandémie de COVID-19 a fortement influencé la croissance du marché des protéines recombinantes. La demande accrue de mesures thérapeutiques et vaccinales a dirigé l'attention des acteurs du marché et des organisations publiques vers des activités de recherche et développement, où les protéines recombinantes ont joué un rôle essentiel.

Les cellules de mammifères, capables d'effectuer des modifications post-traductionnelles cruciales pour les fonctions biologiques de ces protéines, sont une plateforme d'expression privilégiée, avec les cellules CHO occupant une position prédominante dans la production industrielle à grande échelle. Parmi les approches développées pour améliorer ces systèmes, on compte les systèmes d'expression inductibles qui permettent de réguler la production de protéines. Parmi les plus récents, on trouve le 'cumate gene switch', qui utilise le cumate comme inducteur. En conférant la capacité de contrôler la production de la protéine souhaitée, ces systèmes offrent la possibilité de séparer les phases de croissance et de production.

De plus, les rendements de production ont considérablement progressé au cours des dernières décennies grâce aux améliorations apportées aux procédés de culture et aux systèmes d'expression. La demande croissante pour ces protéines impose le développement de procédés de fabrication plus flexibles et intensifiés dans l'industrie. Pour répondre à ces enjeux, les procédés continus comme la perfusion sont une stratégie clé permettant d'intensifier la production tout en maintenant une qualité constante. Néanmoins, il est nécessaire de poursuivre leur développement afin de surmonter les défis liés à leur mise en œuvre tels que la complexité opérationnelle et la gestion de volumes importants de milieux. Dans ce contexte, l'étude à petite échelle joue un rôle crucial pour explorer, optimiser et maîtriser ces procédés en amont, avant leur transfert vers des bioréacteurs de plus grande capacité. L'objectif général de ce travail est donc d'optimiser le rendement de production d'un système CHO inductible au cumate et produisant un anticorps monoclonal (Palivizumab) en implémentant une stratégie de culture en perfusion à faible taux à partir d'une culture fed-batch de référence.

Premièrement, nous avons démontré que l'implémentation d'une stratégie de pseudo-perfusion par centrifugation à volume fixe en complément d'un régime d'alimentation fed-batch permet d'augmenter le rendement d'un facteur 10 et la concentration cellulaire maximale d'un facteur 11,6, tout en réduisant de moitié la concentration de métabolites dans la culture (lactate et ammoniac). De plus, il a été observé qu'une induction retardée, à plus forte concentration

cellulaire, permet d'optimiser les performances de culture dans des conditions identiques. Enfin, la comparaison de trois taux de perfusion fixes a mis en évidence le lien entre le taux de perfusion et la densité cellulaire maximale, avec une concentration maximale atteignant 45×10^6 cellules/mL.

En second lieu, nous avons développé une stratégie de fed-perfusion, dans laquelle l'alimentation est complétée par une perfusion, toutes deux basées sur la densité cellulaire viable. Deux taux spécifiques de perfusion cellulaire (CSPR) ont été comparés, 0,025 et 0,010 nL/cellule/jour, avec un taux d'alimentation fixe de 3,75 μ L/cellule/jour. En fed-batch, cette stratégie d'alimentation a permis d'atteindre une concentration cellulaire 4,3 fois supérieure à celle obtenue avec le régime précédent, ainsi qu'un titre 2,7 fois plus élevé. Nous avons pu démontrer l'intérêt d'une stratégie en fed-perfusion à taux spécifiques, en multipliant le titre jusqu'à un facteur 6,5, tout en optimisant la concentration cellulaire, en réduisant l'accumulation de métabolites, et en diminuant le volume de perfusion utilisé par rapport aux stratégies à taux fixe, pourtant plus élevés.

Finalement, la montée en échelle vers un bioréacteur d'un volume de culture de 400 mL a été réalisée. La perfusion a pu être adaptée à cette échelle par filtration, et l'effet bénéfique de la stratégie a été confirmé, avec une concentration cellulaire doublée en perfusion et un titre augmenté d'un facteur 1,4, malgré des performances moindres comparées à l'échelle réduite, sans cause clairement identifiée. Cette étape a également mis en évidence la sensibilité de la stratégie aux conditions de culture initiales et à la croissance observée dès l'inoculation.

De manière générale, ce travail contribue au développement et à l'optimisation des procédés de production des protéines recombinantes avec des systèmes d'expression mammifères inductibles. Cette étude propose une approche novatrice combinant une stratégie d'alimentation indépendante de la stratégie de perfusion, toutes deux ajustées en fonction de la densité cellulaire viable (VCD) et appliquées tout au long de la culture. L'intérêt de cette configuration est mis en lumière pour intensifier les cultures, améliorer les rendements et réduire l'accumulation de métabolites tout en minimisant le volume de perfusion employé. La combinaison d'un mode de culture en Fed-perfusion et des systèmes inductibles ouvre la voie à des procédés plus flexibles, permettant de choisir le moment de l'induction et d'exercer un meilleur contrôle sur le métabolisme cellulaire.

ABSTRACT

The production of therapeutic recombinant proteins is one of the most profitable sectors of the pharmaceutical industry. CHO cells have been the platform of choice for large-scale protein expression for decades. Among recent advances, inducible gene expression systems as the cimate gene switch offer greater flexibility by decoupling the growth and production phases.

Simultaneously, improvements in bioprocesses have led to significant gains in productivity. Continuous processes such as perfusion are emerging to meet increasing demand and to ensure consistent product quality.

This study aimed to optimize monoclonal antibody (Palivizumab) production in a cimate inducible CHO cell line by implementing a low-rate perfusion strategy in comparison with a fed-batch reference process. First, a fed pseudo-perfusion approach based on centrifugation was evaluated in shake flasks with fixed rates, which allowed a 10-fold increase in product yield and a 9.5-fold increase in maximum cell concentration, while reducing metabolite accumulation in the culture by half. This was followed by the development of a fed-perfusion strategy, in which both feeding and perfusion rates were adjusted based on viable cell density (VCD). Two perfusion rates (0.010 and 0.025 nL/cell/day) were compared with a feeding rate of 3.75 μ L/cell/day. In fed-batch, this strategy allowed a 4.3-fold increase in cell density and a 2.7-fold increase in product titer. We demonstrated the benefit of a specific rate-based fed-perfusion strategy, achieving up to a 6.5-fold increase in titer.

Lastly, the most promising condition was transferred to a 400 mL bioreactor and adapted with a filtration-based perfusion system. Despite performance differences at scale, the strategy successfully demonstrated the potential for process intensification, with a twofold increase in cell density under perfusion and a 1.4-fold improvement in titer.

Overall, this work contributes to the development of intensified, flexible biomanufacturing strategies for recombinant protein production using inducible mammalian expression systems. The proposed approach combining independent, VCD-based feeding and perfusion strategies offers a novel framework for improving productivity, reducing metabolite accumulation, and minimizing medium consumption, while enabling control over the induction phase and cellular metabolism.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	iii
REMERCIEMENTS	iv
RÉSUMÉ	v
ABSTRACT	vii
TABLE DES MATIÈRES	viii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xiv
LISTE DES ANNEXES	xv
 CHAPITRE 1 INTRODUCTION	 1
1.1 Problématique : la demande en protéines recombinantes	1
1.2 Système d'expression inductible : 'cumate gene switch'	1
1.3 Procédé de culture en perfusion	2
1.4 Objectifs de recherche	3
1.5 Plan du mémoire	4
 CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	 5
2.1 Les protéines recombinantes thérapeutiques et systèmes d'expression	5
2.2 Les Cellules CHO Inductible : Plateforme d'expression idéale pour la production d'anticorps monoclonaux	8
2.2.1 Intérêt et évolution des cellules CHO pour la production industrielle de protéines recombinantes	8
2.2.2 Systèmes d'expression inductibles	9
2.3 Bio-procédés et développement de cellules CHO	14
2.4 Effet des paramètres de culture sur l'expression des protéines recombinantes	15
2.4.1 Conditions physico-chimiques	15
2.4.2 Milieu de culture	16

2.4.3 Déchets métaboliques	17
2.4.4 Induction	18
2.5 Modes de cultures	18
2.5.1 Cuvée	19
2.5.2 cuvée alimentée	19
2.5.3 Chémostat	20
2.5.4 Perfusion	20
2.6 Cultures de cellules en Perfusion	21
2.6.1 Rétention des cellules	21
2.6.2 Caractérisation du procédé	22
2.6.3 Contrôles	23
2.6.4 Modèles à échelle réduite	24
 CHAPITRE 3 INTENSIFICATION DE PROCÉDÉ : FED-PERFUSION À FAIBLE TAUX AVEC UNE LIGNÉE CHO INDUCTIBLE AU CUMATE POUR LA PRODUCTION DE PALIVIZUMAB	28
3.1 Matériels et méthodes	28
3.1.1 Lignée cellulaire et conditions de culture en flasque	28
3.1.2 Culture en bioreacteur	29
3.1.3 Analyse de la viabilité cellulaire, des nutriments, des métabolites et du produit	30
3.1.4 Croissance, production, consommation et taux spécifique cellulaires .	31
3.1.5 Gestion et nature des erreurs expérimentales	33
3.2 Première campagne : taux de perfusion fixe	34
3.2.1 Paramètres étudiés	34
3.2.2 Résultats et discussion	35
3.3 Seconde campagne : taux de perfusion spécifique fixe et montée en échelle . .	44
3.3.1 Paramètres étudiés	44
3.3.2 Résultats	45
3.4 Discussion	59
3.4.1 Campagne 1	59
3.4.2 Campagne 2	61
 CHAPITRE 4 CONCLUSION	66
4.1 Synthèse des travaux	66
4.2 Limitations	66
4.3 Améliorations futures	67

RÉFÉRENCES	70
ANNEXES	79

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1	Modèles à petite échelle pour le développement de procédé et leurs caractéristiques.	27
Tableau 3.1	Conditions expérimentales testées pour la première campagne	35
Tableau 3.2	Effet de la concentration cellulaire à l'induction et de la perfusion sur la croissance et la productivité	36
Tableau 3.3	Effet de la perfusion sur la croissance et la productivité.	40
Tableau 3.4	Conditions expérimentales testées pour la seconde campagne (expériences 1 à 3)	45
Tableau 3.5	Effet du taux de perfusion spécifique sur la croissance et la productivité	46
Tableau 3.6	Effet du taux de perfusion spécifique sur la croissance et la productivité en flasque et bioréacteur.	51
Tableau .1	Composition du milieu BalanCD	79
Tableau .2	Composition de la solution feed	79

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1	Répartition des peptides et protéines thérapeutiques approuvés par la FDA en 2024 selon leur classe pharmacologique.	7
Figure 2.2	Voie proposée pour le catabolisme du p-cymène chez <i>Pseudomonas putida</i> PL-W : (A) CymAa (p-cymène monooxygénase) ; (B) CymB (p-cumyl alcool déshydrogénase) ; (C) CymC (aldéhyde déshydrogénase).	11
Figure 2.3	Configuration répresseur du système «cumate gene switch»	11
Figure 2.4	Configuration transactivateur du système «cumate gene switch»	12
Figure 2.5	Configuration transactivateur inverse du système «cumate gene switch».	12
Figure 2.6	Configuration double régulée inverse du système «cumate gene switch».	13
Figure 2.7	Procédé typique de développement d'une lignée cellulaire mammifère pour la production de protéines recombinantes.	14
Figure 2.8	Principaux modes de culture : (A) cuvée, (B) cuvée alimentée, (C) chémostat et (D) perfusion	19
Figure 3.1	Vue d'ensemble du montage du bioréacteur, schéma de la configuration de la plaque supérieure (headplate)	30
Figure 3.2	Vue d'ensemble du montage du bioréacteur, vue latérale	31
Figure 3.3	Schéma de la procédure pour simuler une culture en perfusion dans des flasques agitées (pseudo-perfusion) et pour l'échantillonnage.	32
Figure 3.4	Campagne 1 expérience 1 : Croissance cellulaire et taux de perfusion spécifique (CSPR)	36
Figure 3.5	Campagne 1 expérience 1 : métabolites (glucose et lactate)	38
Figure 3.6	Campagne 1 expérience 1 : produit (anticorps PLVZM)	39
Figure 3.7	Campagne 1 expérience 2 : Croissance cellulaire et taux de perfusion spécifique (CSPR).	41
Figure 3.8	Campagne 1 expérience 2 : métabolites (glucose et lactate)	42
Figure 3.9	Campagne 1 expérience 2 : produit (anticorps PLVZM)	43
Figure 3.10	Campagne 2 expérience 1 : Croissance cellulaire et taux de perfusion.	46
Figure 3.11	Campagne 2 expérience 1 : métabolites (glucose, lactate et ammoniac)	48
Figure 3.12	Campagne 2 expérience 1 : produit (anticorps PLVZM)	49
Figure 3.13	Résultats campagne 2 expérience 2 : Croissance cellulaire et taux de perfusion.	52
Figure 3.14	Campagne 2 expérience 2 : métabolites (glucose, lactate et ammoniac)	54
Figure 3.15	Campagne 2 expérience 2 : produit (anticorps PLVZM)	56

Figure 3.16	Production totale et rendement volumétrique pour l'ensemble des expériences	57
Figure 3.17	Productivité quotidienne pour l'ensemble des expériences.	58

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ATF	Filtration tangentielle alternée
BHK	Cellules de rein de hamster nouveau-né
CHO	Cellules d'ovaire de hamster chinois
CMV	Cytomégalovirus humain
CSPR	Taux spécifique de perfusion cellulaire
DHFR	Dihydrofolate réductase
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
FBS	Sérum foetal bovin
GFP	Protéine fluorescente verte
GOI	Gène d'intérêt
GS	Glutamine synthétase
HEK-293	Cellules de rein embryonnaire humain
LDH	Lactate déshydrogénase
MCT	Transporteur de monocarboxylate
MTX	Méthotrexate
NS0	Lignée cellulaire dérivée de myélome murin
PerC6	Cellules dérivées de rétine humaine
q_{glc}	Taux spécifique de consommation de glucose
q_{NH_3}	Taux spécifique de production d'ammoniac
q_P	Taux spécifique de production
q_{lac}	Taux spécifique de production de lactate
TFF	Filtration tangentielle
TF	Facteur de transcription
VCD	Densité cellulaire viable

LISTE DES ANNEXES

Annexe A : COMPOSITION DU MILIEU ET SOLUTION D'ALIMENTATION . . . 79

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Problématique : la demande en protéines recombinantes

De nos jours, les maladies chroniques et infectieuses représentent un défi majeur pour la santé publique mondiale. Par exemple, le cancer est aujourd’hui dénommé « la maladie du siècle ». Leur prévalence croissante, associée aux limites des traitements conventionnels, a conduit à une transformation profonde du paysage thérapeutique.

L’une de ces avancées majeures est l’essor de l’utilisation des produits biologiques. Leurs applications se sont diversifiées, s’étendant des secteurs traditionnels de l’alimentation et de la chimie jusqu’au secteur biopharmaceutique [1]. Parmi ceux-ci, la fabrication de protéines recombinantes thérapeutiques constitue actuellement l’un des secteurs les plus rentables avec des prévisions estimant sa valeur à environ 570 milliards d’ici 2030 [2] [3]. Cet essor a stimulé un intérêt croissant pour le marché des biomolécules, favorisant le développement des systèmes d’expression de protéines recombinantes. Récemment, la pandémie de COVID-19 a fortement influencé la croissance du marché des protéines recombinantes [4] [2]. Cette demande accrue de mesures thérapeutiques et vaccinales a dirigé l’attention des acteurs du marché et des organisations publiques vers des activités de recherche et développement, où les protéines recombinantes ont joué un rôle essentiel. Aujourd’hui, les anticorps monoclonaux représentent environ 40-50% de ce marché [3] et sont principalement utilisés pour le traitement de maladies auto-immunes, des cancers ainsi que de certaines maladies infectieuses.

La demande croissante impose une évolution vers des capacités de fabrication plus flexibles et intensifiées dans l’industrie [4]. Les rendements de production ont considérablement progressé au cours des dernières décennies avec des améliorations apportées aux procédés de culture et aux systèmes d’expression tels qu’une meilleure sélection de lignées cellulaires, une meilleure formulation des milieux ainsi que le développement de procédés en cuvée alimentée et en perfusion opérant à haute densité cellulaire [1] [5] [4].

1.2 Système d’expression inductible : ‘cumate gene switch’

Parmi les systèmes d’expression disponibles, les cellules de mammifères, capables d’effectuer des modifications post-traductionnelles similaires à celles retrouvées chez l’humain et cruciales pour les fonctions biologiques de ces protéines, sont privilégiées. En particulier, les cellules

CHO constituent la principale plateforme d'expression, assurant la production d'environ 70% de toutes les protéines recombinantes et des anticorps monoclonaux [6] [7] [8].

Récemment, l'intérêt pour le développement de systèmes d'expression inductibles adaptés aux cellules de mammifères a considérablement augmenté [9]. Il est possible de contrôler le moment de production d'une protéine recombinante, grâce à l'utilisation de ces systèmes inductibles. Leur utilisation procure une plus grande flexibilité dans la conception et l'optimisation du processus de production de protéines, permettant de séparer les phases de croissance cellulaire et de production, en favorisant une croissance rapide des cellules jusqu'à une densité optimale avant de déclencher la production de la protéine d'intérêt. Ainsi, il est possible d'optimiser les conditions pour chaque phase du processus.

Parmi les plus récents, on trouve le « cumate gene switch », qui utilise le cumate comme inducteur [9] [10] [11]. Il permet un contrôle précis et non toxique de l'expression génique, optimisant ainsi la production d'anticorps monoclonaux, tout en préservant la viabilité cellulaire. Sa flexibilité et sa fiabilité surpassent celles des systèmes existants, offrant une solution adaptable pour la production de protéines thérapeutiques complexes [12]. Bien que les systèmes d'expression inductibles soient aujourd'hui bien caractérisés, peu d'études se sont intéressées à l'intensification des procédés de production utilisant ces cellules, en particulier dans des configurations de culture en perfusion.

1.3 Procédé de culture en perfusion

Bien que les procédés en batch et en fed-batch soient les systèmes de production les plus largement utilisés pour les cellules de mammifères, les procédés en perfusion suscitent un intérêt croissant [13] [14] [15].

Le mode perfusion permet de maintenir un environnement constant favorable aux cellules grâce à l'élimination continue des sous-produits et à l'ajout de nutriments. Comparé aux modes batch et fed-batch, le mode perfusion permet de prolonger la culture des cellules en bonne santé, potentiellement à une densité cellulaire élevée, tout en réduisant le temps de résidence du produit dans le bioréacteur. Ces effets permettent d'améliorer la qualité du produit et sont essentiels pour la production de glycoprotéines instables, comme le facteur VIII. [16] [13].

Un autre avantage du mode perfusion est l'utilisation de bioréacteurs plus petits par rapport aux procédés en fed-batch, ce qui offre des bénéfices tels que la réduction des opérations de nettoyage en place (clean-in-place) et la possibilité d'utiliser des bioréacteurs jetables au lieu de bioréacteurs en acier inoxydable, en raison des volumes de travail plus réduits [17].

Cependant, les procédés en perfusion présentent également des inconvénients : ils sont plus complexes d'un point de vue technique et en termes de stérilité, génèrent de grands volumes de récolte qui nécessitent un traitement supplémentaire, consomment des volumes importants de milieu et produisent plusieurs lots de récolte par cycle de culture.

1.4 Objectifs de recherche

Les travaux présentés dans cette thèse avaient pour objectif de vérifier les hypothèses suivantes :

- L'intégration d'un mode de perfusion à faible taux dans un procédé de cuvée alimentée permet d'améliorer la productivité globale en limitant l'accumulation de métabolites inhibiteurs.
- L'utilisation d'un taux de perfusion et d'alimentation par cellules permet d'optimiser les rendements de production par rapport aux volumes de milieu et d'alimentation employés.
- Le taux de perfusion employé durant la croissance cellulaire influe sur rendement de production ainsi que la concentration cellulaire maximale avant induction.
- La montée en échelle du procédé intensifié (en bioréacteur) permet de conserver des rendements similaires au modèle réduit tout en augmentant la capacité de production.

Ainsi, l'objectif général de ce travail consistait à augmenter la productivité des cultures pour une lignée cellulaire inductible grâce à l'intensification d'un mode cuvée alimentée par l'établissement de stratégies d'opération en mode perfusion. Les recherches se sont organisées autour des objectifs spécifiques suivants :

- Établir un procédé de culture à petite échelle en mode cuvée alimentée avec un moment propice pour l'induction et une stratégie d'alimentation efficace.
- Établir une méthode d'intensification par perfusion à partir du procédé de culture en mode cuvée alimentée.
- Déterminer des conditions de culture favorisant la productivité et le rendement des cultures en mode perfusion.
- Réaliser la montée en échelle du procédé en bioréacteur.

1.5 Plan du mémoire

Le premier chapitre de ce mémoire introduit la problématique liée à la production de protéines recombinantes, en mettant en lumière les défis associés à leur expression dans un contexte industriel. Il présente également les enjeux scientifiques et techniques relatifs à l'optimisation des procédés de culture cellulaire pour améliorer les rendements et la qualité des biomolécules produites.

Le second chapitre est consacré à une revue de la littérature sur les différentes stratégies employées pour maximiser la production de protéines recombinantes. Cette revue débute par une présentation des protéines recombinantes et de leur importance dans l'industrie biopharmaceutique. Ensuite, elle explore l'utilisation des cellules de hamster chinois (CHO), qui constituent le système d'expression privilégié pour la production de ces protéines en raison de leurs caractéristiques biologiques et de leur adaptabilité aux environnements industriels. Une section est ensuite dédiée aux systèmes d'expression inductibles, qui permettent un contrôle précis de l'expression des protéines et présentent divers avantages en fonction du type d'induction utilisé. Par la suite, une analyse approfondie des paramètres influençant la culture cellulaire est réalisée, abordant notamment l'impact du pH, de la température, de l'oxygénéation et de la composition des milieux de culture sur la productivité cellulaire. Les différents modes de culture sont brièvement présentés et, enfin, le chapitre se conclut par une présentation détaillée de la culture en perfusion.

Le chapitre 3 décrit en détail le matériel et les méthodes utilisés dans cette étude. Il comprend la présentation des lignées cellulaires et des systèmes d'expression mis en place. Une présentation des systèmes de culture développés en flasque et en bioréacteur est présentée ainsi que les conditions expérimentales appliquées. Les méthodologies analytiques employées pour évaluer les performances des cultures et la production des protéines recombinantes y sont également exposées.

La deuxième partie du chapitre 3 est dédiée à la présentation des résultats obtenus. Il met en avant les observations et les performances des différents systèmes testés, en analysant les impacts des modifications de procédés sur la production de protéines recombinantes. Une discussion des résultats permet d'évaluer l'efficacité des approches étudiées et d'identifier les perspectives d'amélioration.

Enfin, la conclusion de ce mémoire synthétise les principales contributions de l'étude et propose des perspectives pour l'optimisation future du système développé ainsi que de futures recherches envisageables.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Les protéines recombinantes thérapeutiques et systèmes d'expression

Le corps humain produit des milliers de protéines et d'enzymes nécessaires au bon fonctionnement physiologique de l'organisme. L'absence de ces protéines biologiques peut conduire au développement de pathologies sévères telles que le diabète, les troubles de la coagulation, etc. Une approche pour pallier cette carence consiste à administrer les protéines manquantes dans l'organisme, de façon à rétablir une concentration protéique suffisante pour assurer les fonctions biologiques normales. Ces protéines administrées peuvent être produites *ex vivo* à l'aide de systèmes biologiques et sont nommées protéines recombinantes. [4] [18]

Depuis la réussite de l'expression de l'insuline humaine avec *Escherichia coli*, le premier de ces produits commercialisé avec succès en 1982 [4], la production industrielle de protéines recombinantes n'a cessé d'évoluer. Ces protéines modifiées génétiquement jouent aujourd'hui un rôle essentiel, aussi bien comme outils de recherche (protéines fluorescentes, systèmes CRISPR-Cas9, enzymes de restriction) que comme produits thérapeutiques (insuline, érythropoïétine, anticorps monoclonaux, vaccins, etc.) [4] [1] offrant ainsi des solutions précieuses pour répondre aux défis complexes de la santé, de l'industrie et de la recherche. Cet intérêt met en avant un marché en pleine évolution. Le marché mondial des protéines thérapeutiques a atteint une valeur de 367 milliards de dollars en 2024 dont près de 50% est attribuable aux anticorps monoclonaux et devrait connaître une croissance annuelle composée (CAGR) de 6-7% de 2025 à 2030 [2] [3]. La prévalence croissante des maladies chroniques ou des cancers devrait stimuler la croissance du secteur. De plus, l'intérêt grandissant pour les biologiques et les biosimilaires est un autre facteur contribuant à la croissance de l'industrie. La récente pandémie de COVID-19 a également influencé cette croissance [4].

Pour couvrir ce besoin de production, différents systèmes d'expression de ces protéines ont été développés. Les cellules bactériennes, telles qu'*E. coli*, font partie des premiers systèmes utilisés. Elles sont encore souvent choisies pour leur rapidité de croissance, leur densité théorique maximale élevée (1×10^{13} bactéries/mL), leur simplicité de manipulation génétique ainsi que leur capacité à produire une haute concentration de protéines [19] [4]. Ces caractéristiques sont très utiles pour les applications telles que l'insuline, l'hormone de croissance humaine (hGH), etc. Elles sont économiques, mais présentent des limitations en termes de production de protéines complexes, en raison de l'absence de mécanismes de glycosylation similaires à ceux des cellules eucaryotes [19].

Les cellules de levure, comme *Saccharomyces cerevisiae*, permettent, dans une certaine limite, une glycosylation similaire à celle des cellules mammifères ainsi qu'un repliement correct des protéines, améliorant la fonctionnalité des protéines. Les souches de levures sont génétiquement bien caractérisées et sont connues pour effectuer de nombreuses modifications post-traductionnelles. Elles sont plus faciles et moins coûteuses à manipuler que les cellules d'insectes ou de mammifères, et s'adaptent facilement aux processus de fermentation. Les deux souches de levures les plus utilisées sont *S. cerevisiae* et la levure méthylotrophique *P. pastoris* [20].

D'autres systèmes moins communs tels que les cellules d'insectes, offrent des glycosylations plus complexes et la capacité à produire des protéines post-traductionnellement modifiées similaires à celles des cellules mammifères. Cependant, leur coût de culture est généralement plus élevé et des glycosylations incorrectes peuvent poser problème [20].

Les cellules végétales ainsi que les plantes transgéniques ont également fait l'objet d'un fort intérêt. L'utilisation des plantes offre un certain nombre d'avantages par rapport à d'autres systèmes d'expression. Premièrement, un faible risque de contamination par des pathogènes animaux, y compris les virus, car aucun virus végétal n'a été trouvé pathogène pour l'homme. Un autre avantage est que la croissance à l'échelle agricole nécessite uniquement de l'eau, des minéraux et de la lumière. Parmi les avantages supplémentaires des systèmes végétaux, en tant qu'eucaryotes supérieurs, ils sont capables d'effectuer de nombreuses modifications post-traductionnelles similaires à celles qui se produisent dans les cellules humaines. Les avantages de la production à l'échelle agricole sont cependant contrebalancés par les longs délais de développement, les variations de rendement et de qualité du produit, ainsi que la difficulté d'appliquer les bonnes pratiques de fabrication (GMP) aux premières étapes de la production. La culture cellulaire végétale, en tant que système d'expression pour les protéines recombinantes, permet d'éviter ces problèmes tout en conservant les avantages. Comme les micro-organismes, les cellules végétales sont peu coûteuses à cultiver et à entretenir. Mais dans de nombreux cas ces systèmes sont limités par leurs rendements, les différences de modifications post-traductionnelles avec les cellules mammifères ou encore les glycans spécifiques aux plantes qui peuvent être immunogènes ou allergènes, ce qui est particulièrement problématique pour les thérapeutiques injectables [20] [21].

Les cellules de mammifères sont souvent privilégiées pour la production de protéines thérapeutiques. Elles permettent une glycosylation et des transformations post-traductionnelles similaires à celles des protéines humaines, assurant une fonctionnalité optimale. Cet avantage fait de ces cellules le support privilégié pour la production de protéines thérapeutiques car la majorité de celles-ci présentent au moins une modification post-traductionnelle qui influence

grandement leurs propriétés biochimiques et thérapeutiques. Cependant, le coût de production des cellules mammifères est élevé, et le processus est plus lent par rapport aux systèmes bactériens [22]. Bien qu'il existe plusieurs lignées cellulaires de mammifères, telles que les cellules de rein de hamster nouveau-né (BHK), les cellules NS0 dérivées de myélome murin, les cellules HEK-293 de rein embryonnaire humain ou les cellules PerC6 dérivées de rétine humaine, depuis les années 2000, plus de 70% des protéines thérapeutiques recombinantes sont produites dans des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) [22–24].

La popularité des cellules CHO s'explique par plusieurs raisons detaillées dans le chapitre 2.2.1.

Au cours des 20 dernières années, le nombre de médicaments à base de protéines approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis a considérablement augmenté. En 2015, environ 650 protéines thérapeutiques étaient approuvées dans le monde, dont près de 400 obtenues par des technologies d'ADN recombinant. En 2024, il existe plus de 800 protéines thérapeutiques approuvées par la FDA sur le marché dont 40% sont représentés par les anticorps monoclonaux (voir figure 2.1) [25] [18]. Cette croissance met en évidence la nécessité de systèmes d'expression performants, capables de produire des protéines humaines complexes et fonctionnelles, un rôle que les cellules CHO remplissent particulièrement bien.

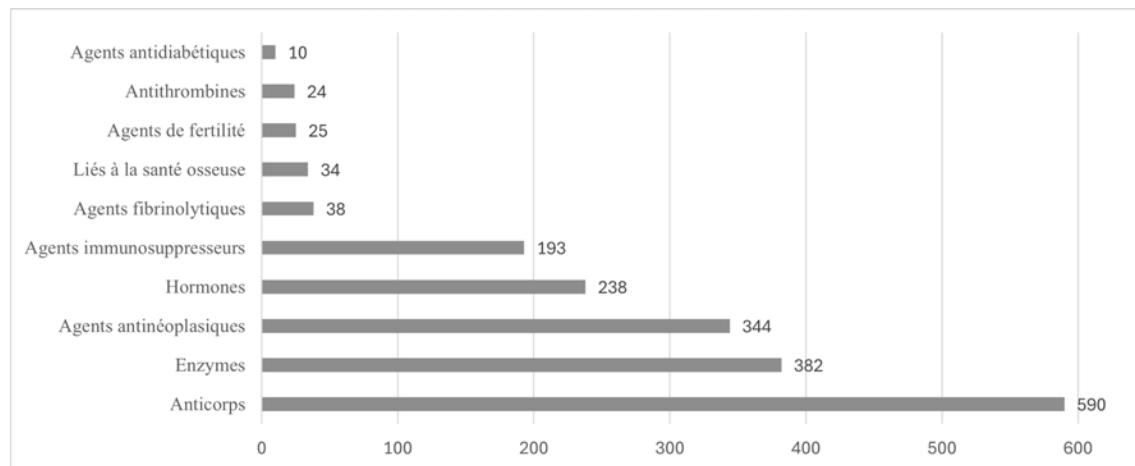


FIGURE 2.1 Répartition des peptides et protéines thérapeutiques approuvés par la FDA en 2024 selon leur classe pharmacologique. Adapté depuis la base de données THPdb2.

2.2 Les Cellules CHO Inductible : Plateforme d'expression idéale pour la production d'anticorps monoclonaux

2.2.1 Intérêt et évolution des cellules CHO pour la production industrielle de protéines recombinantes

En 1957, les cellules CHO ont été isolées pour la première fois par le Dr Theodore T. Puck à partir de cellules épithéliales de l'ovaire d'un hamster chinois [26]. Au fil du temps, elles ont été adaptées pour la culture à grande échelle, les milieux sans sérum et la manipulation génétique pour améliorer le rendement des protéines. Parmi les développements clés figurent la création des cellules CHO-K1 en 1968. En 1983, les cellules CHO-DXB11, déficientes en DHFR, ont été générées, permettant la sélection de cellules transfectées avec un gène d'intérêt (GOI). En 1986, des systèmes pour amplifier les gènes via MTX (méthotrexate) ont été introduits, augmentant le rendement des protéines recombinantes. En 1987, le système Glutamine Synthétase a été adapté pour les cellules CHO. En 1994, la lignée CHO-DG44 a été créée, avec une délétion complète des gènes DHFR, facilitant ainsi la sélection des cellules porteuses du GOI [27]. Depuis 2012-2016, plus de la moitié des protéines thérapeutiques recombinantes sont produites avec des cellules CHO [6] [22] en raison de plusieurs atouts majeurs :

- Les cellules CHO possèdent des caractéristiques idéales pour l'industrialisation des procédés et leur mise à l'échelle. Elles sont robustes avec une bonne résistance au cisaillement tout en étant tolérantes aux changements de conditions de culture. De plus elles présentent une croissance relativement rapide et la faible productivité spécifique (q_P), qui constitue l'un des inconvénients de l'utilisation de cellules de mammifères pour la production de protéines, peut être surmontée grâce à l'amplification génique dans les cellules CHO. Notamment via dihydrofolate réductase (DHFR) ou la glutamine synthétase (GS) [23]. Leur capacité à croître en suspension dans un milieu sans sérum offre de nombreux avantages à grande échelle [8].
- L'expérience que l'industrie et la recherche ont développée concernant les cellules CHO depuis 1980 permet d'avoir du recul sur les méthodes de production et une grande expérience réglementaire concernant l'utilisation des cellules CHO pour la production de protéines recombinantes, facilitant l'approbation de la commercialisation des protéines thérapeutiques auprès d'agences réglementaires comme la FDA [8].
- Les cellules CHO semblent résistantes aux infections par virus humains ce qui minimise les risques de biosécurité pour une production commerciale. [28] [29]

- Les cellules CHO sont capables de réaliser des modifications post-traductionnelles proches de celles des cellules humaines, notamment en matière de glycosylation. Ce processus est essentiel pour les protéines thérapeutiques, car il influence fortement leur rendement, leur bioactivité, leur solubilité, leur stabilité face à la dégradation, leur immunogénicité et leur clairance dans l'organisme. Les CHO peuvent produire des glycoprotéines porteuses de N-glycans de type humain, rendant ainsi les protéines thérapeutiques obtenues plus compatibles, plus efficaces et plus stables chez l'homme [20].

2.2.2 Systèmes d'expression inductibles

Intérêt

Les vecteurs d'expression sont des outils essentiels en recherche biomédicale. La plupart des vecteurs classiques sont munis d'un promoteur viral, permettant une bonne expression du transgène. Parmi ceux-ci, les promoteurs constitutifs dérivés du cytomégalovirus humain (CMV) demeurent, à ce jour, le choix privilégié dans l'essentiel des constructions vectorielles classiques. Ce promoteur permet une expression continue du transgène d'intérêt, sans contrôle sur la durée ni sur le niveau d'expression. L'expression débute après la transfection et se poursuit tout au long des étapes de sélection et de clonage cellulaire. Dans certains cas, une expression non maîtrisée peut entraîner la mort cellulaire ou un ralentissement de la croissance à cause de l'effet cytostatique ou cytotoxique du produit sur les cellules hôtes. Dans ce cas, induire l'expression du transgène au moment désiré est important [12] [30]. Ces systèmes permettent donc la séparation de la phase de croissance et de production des cellules. Le stress métabolique sur les cellules lié à la production de protéines recombinantes est réduit, ce qui leur permet de se développer et de se diviser plus rapidement, aboutissant potentiellement à une densité cellulaire plus élevée en fin de culture. Ainsi, le grand intérêt de ce système est d'apporter une plus grande flexibilité dans la conception et l'optimisation du processus de production de protéines.

Pour cela, un vecteur dont le promoteur n'est actif qu'en présence d'un composé spécifique est utilisé. Plusieurs de ces systèmes inductibles ont été développés pour les cellules de mammifères, reposant sur la régulation par des hormones stéroïdiennes, des métaux lourds, un choc thermique ou la tétracycline. Leur principal inconvénient est la « fuite » (leakiness), c'est-à-dire l'expression parfois observée à l'état éteint (off). De plus, les inducteurs peuvent induire des effets indésirables, tels que de la cytotoxicité ou des biais dans l'interprétation des données d'expression [30].

Un exemple courant est le système reposant sur un promoteur CMV dérivé couplé à des opérateurs tétracycline. Développé depuis sa découverte en 1992, il permet l'expression rapide du transgène dès l'ajout de la tétracycline ou de son analogue, la doxycycline. Un inconvénient majeur de ce système tient à son contrôle par des antibiotiques, dont l'emploi peut être restreint par les autorités réglementaires pour la production de protéines thérapeutiques destinées à l'usage humain [31]. Pour pallier ces limitations, des chercheurs du Conseil national de recherches du Canada ont mis au point le système inductible au cumate. Comme son nom l'indique, cet opérateur est activé par le cumate qui est non toxique pour les cellules, peu coûteux et n'est pas présent dans les réactifs de culture couramment utilisés [9, 12, 31].

Principe de fonctionnement des systèmes inductibles

Chez les cellules de mammifères, la transcription est un processus hautement complexe, contrôlé par de multiples éléments de signalisation de l'ADN et les facteurs de liaison correspondants. Dans cette cascade, le promoteur (incluant le promoteur central et proximal) joue un rôle clé en intégrant et en traitant les signaux transcriptionnels. Ainsi, le choix du promoteur central et des éléments adjacents peut avoir une influence significative sur l'efficacité d'expression du transgène. En plus des promoteurs viraux et eucaryotes naturels bien connus, plusieurs promoteurs synthétiques conçus pour posséder des propriétés spécifiques ont été développés [30].

Comme les systèmes constitutifs, les systèmes inductibles destinés à l'expression de protéines recombinantes comportent un ou plusieurs gènes placés sous le contrôle d'un promoteur. Ils se distinguent par la présence d'un inducteur (un petit composé chimique) spécifique qui facilite la liaison ou la dissociation d'un facteur de transcription (TF) spécifique au promoteur ou depuis celui-ci, et active ou bloque ensuite la transcription du gène d'intérêt (GOI). Ces régulateurs permettent donc de contrôler l'expression du gène d'intérêt en réponse à un inducteur [32].

Les termes ON et OFF désignent respectivement l'activation et la répression de la transcription du gène placé en aval du promoteur dans un système inductible. Pour garantir l'efficacité de ce type de système, il est essentiel que le rapport d'induction ON/OFF soit le plus élevé possible, c'est-à-dire que l'expression du transgène soit fortement activée en présence de l'inducteur et quasiment nulle en son absence [9].

Le «cumate gene switch»

Le système cumate gene switch se base sur le répresseur CymR (Cymene Repressor) des opérons *p-cmt* et *p-cym* présent dans la bactérie *Pseudomonas putida*. L'opéron *p-cym* code pour les enzymes responsables de la dégradation du p-cymène (4-isopropyltoluène) en p-cumate (acide 4-isopropylbenzoïque). Ces enzymes comprennent CymA, CymB et CymC, (voir figure 2.2) alors que l'opéron *p-cmt* code pour le catabolisme du cumate en isobutyrate, pyruvate et acétyl-coenzyme A [11]. En amont de ceux-ci se trouve donc le gène codant pour CymR contrôlant l'expression des deux opérons et inductible au cumate. Ainsi, le CymR exécute cette régulation via la fixation à des séquences opératrices CuO (Cumate Operator) en présence de cumate [9].

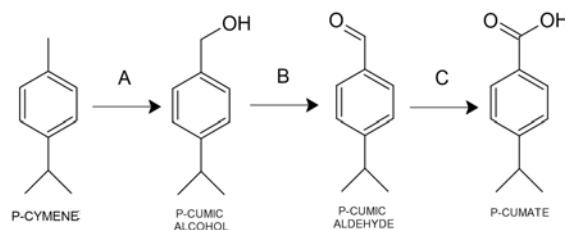


FIGURE 2.2 Voie proposée pour le catabolisme du p-cymène chez *Pseudomonas putida* PL-W : (A) CymAa (p-cymène monooxygénase) ; (B) CymB (p-cumyl alcool déshydrogénase) ; (C) CymC (aldéhyde déshydrogénase). Adapté de [11]

Dans les travaux de Poulain et al. en 2006 [9], ce système CymR/CuO présent chez *Pseudomonas putida* a été exploité pour contrôler l'expression de gènes chez les cellules mammifères à l'aide de trois stratégies différentes. Plus tard en 2017, ce système a été optimisé davantage [10].

1. Configuration répresseur : CymR est utilisé pour réprimer la transcription à partir d'un promoteur mammifère (CMV5) en se liant à un site opérateur (CuO) placé en aval du site d'initiation. L'ajout de l'inducteur (cumate) aux cellules de mammifères provoque un changement de conformation de CymR, l'empêchant alors de se lier à l'ADN, ce qui lève ainsi la répression. [9]

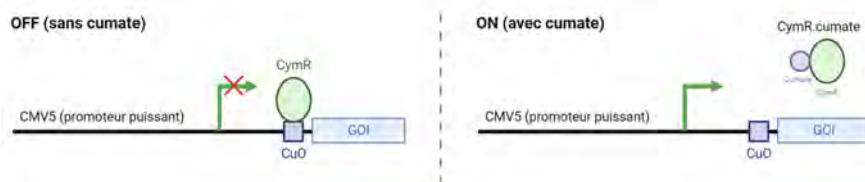


FIGURE 2.3 Configuration répresseur du système «cumate gene switch». Adapté de [9]

2. Configuration transactivateur : CymR est fusionné à un domaine d'activation VP16 du virus *Herpes simplex*, et la molécule chimérique ainsi obtenue cTA (cumate transactivator) est utilisée pour activer la transcription en se liant en aval aux six répétitions de la séquence opératrice (6X-CuO) du promoteur CR5. L'ajout de cumate, empêche le cTA de se lier à l'ADN et n'est donc plus capable d'activer la transcription. La lignée cellulaire CHO exprimant de façon stable le cTA (CHO-cTA) se base sur cette configuration. Il a été démontré avec cette lignée que le promoteur CR5 est supérieur au promoteur constitutif CMV5, avec une expression de la GFP six fois plus élevée [33]

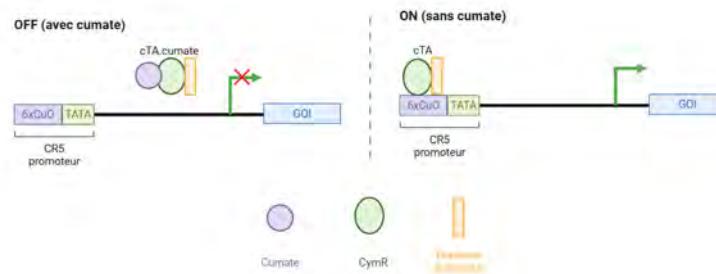


FIGURE 2.4 Configuration transactivateur du système «cumate gene switch». Adapté de [9]

3. Configuration transactivateur inverse : Un mutant de CymR est utilisé, c'est une variante capable de se lier à l'ADN en présence de cumate plutôt qu'en son absence, le rCymR (reverse CymR). rCymR est fusionné au domaine d'activation VP16, la molécule chimérique ainsi obtenue rcTA (reverse cumate transactivator) est utilisée pour activer la transcription en se liant en aval aux six répétitions de la séquence opératrice (6X-CuO) du promoteur CR5. La liaison de rcTA, et donc l'activation, est induite par l'ajout de cumate [9]. Dans les cellules CHO, les niveaux d'expression obtenus à partir de cette configuration sont similaires à ceux obtenus à partir du cTA. Cependant, le ratio ON/OFF est très faible, en raison d'une expression basale élevée sans ajout du cumate. [9]

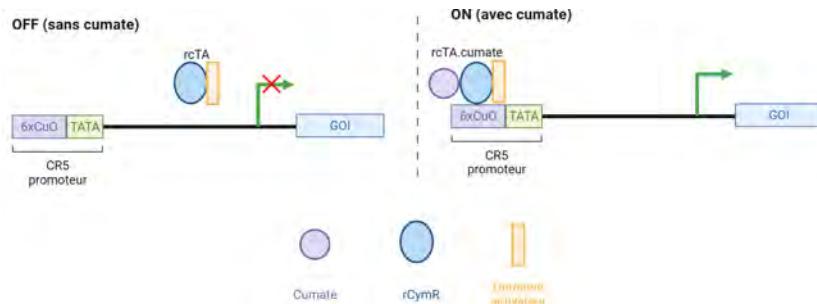


FIGURE 2.5 Configuration transactivateur inverse du système «cumate gene switch». Adapté de [9]

4. Configuration « inverse double régulée » : Cette configuration se base sur le système précédent mais pour pallier au faible ratio ON/OFF, l'expression du rcTA est régulée via le promoteur CMV5-CuO (au lieu de CR5). Ainsi, en l'absence de cumate, le CymR empêche l'expression de rcTA. Si du cumate est ajouté, il empêche la fixation du CymR à CuO, permettant alors l'expression du rcTA. rcTA se fixe alors au promoteur CR5 et active l'expression du gène d'intérêt.

Cette configuration a été utilisée pour le développement de lignées cellulaires CHO, la lignée CHO^{BRI/rcTA} [10] et CHO^{cum2}. La génération de populations hétérogènes stables à partir de CHO^{cum2} a permis de produire 235 mg/L d'une protéine chimérique CD200F, 160 mg/L d'anticorps chimérique B43 et 206 mg/L d'EPO, avec des ratios ON/OFF de 6, 16 et 74 [34]. La lignée CHO^{BRI/rcTA} a permis la génération de populations stables produisant jusqu'à 350 mg/L de Rituximab, dans des cultures Fed-Batch avec un ratio ON/OFF de 6 [10].

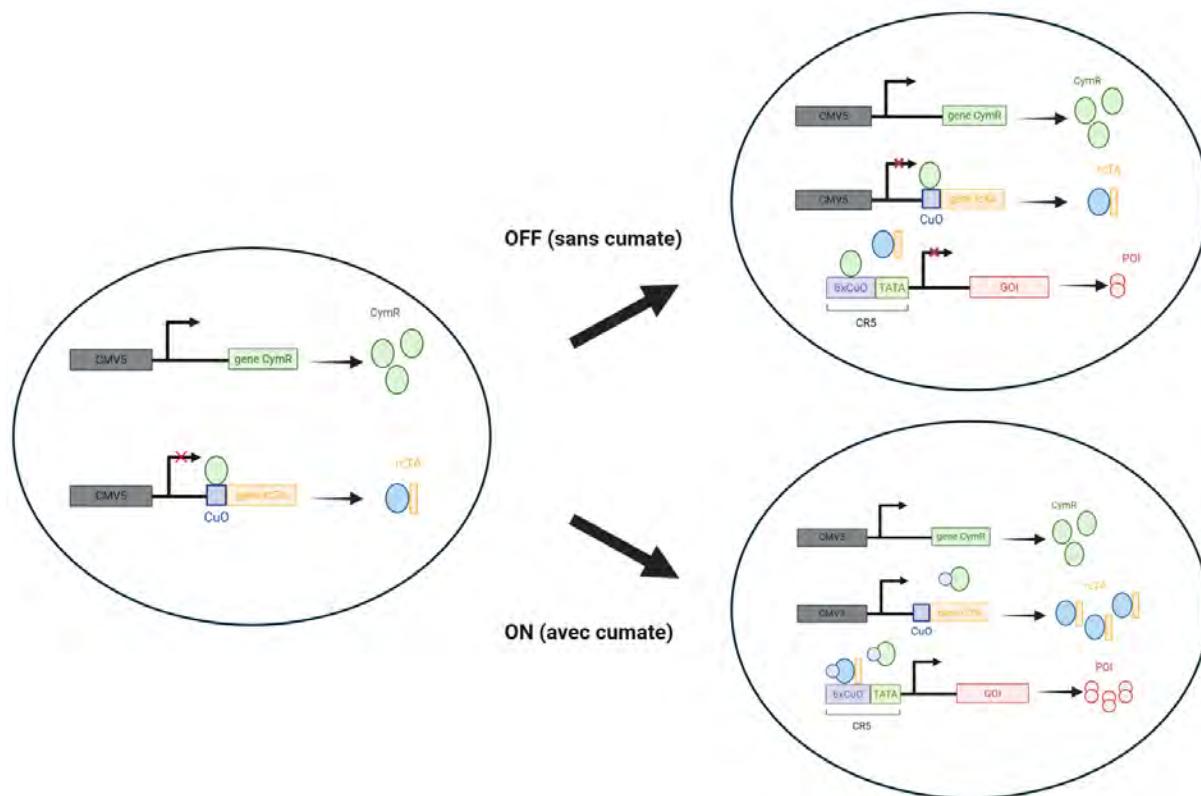


FIGURE 2.6 Configuration double régulée inverse du système «cumate gene switch». Adapté de [10]

2.3 Bio-procédés et développement de cellules CHO

Le développement d'un procédé pour produire des protéines recombinantes avec des cellules mammifères suit en général un schéma bien défini (voir fig. 2.7).

Tout d'abord, le gène recombinant et ses éléments régulateurs nécessaires à sa transcription sont transférés dans les cellules hôtes désirées. Un gène conférant un avantage sélectif aux cellules est aussi introduit. Quelques jours après la transfection, un agent de sélection est appliqué et seules les cellules exprimant le gène de sélection survivent.

Après la sélection, les cellules survivantes sont isolées individuellement dans un nouveau milieu de culture afin de développer différents clones. Ces clones sont ensuite évalués pour leur capacité à produire la protéine recombinante. Ensuite, une lignée cellulaire est sélectionnée en fonction de ses caractéristiques de croissance et de productivité, puis utilisée pour la production à grande échelle de la protéine recombinante. Un procédé de culture est alors mis en place et optimisé selon les besoins de production. [23] [35]

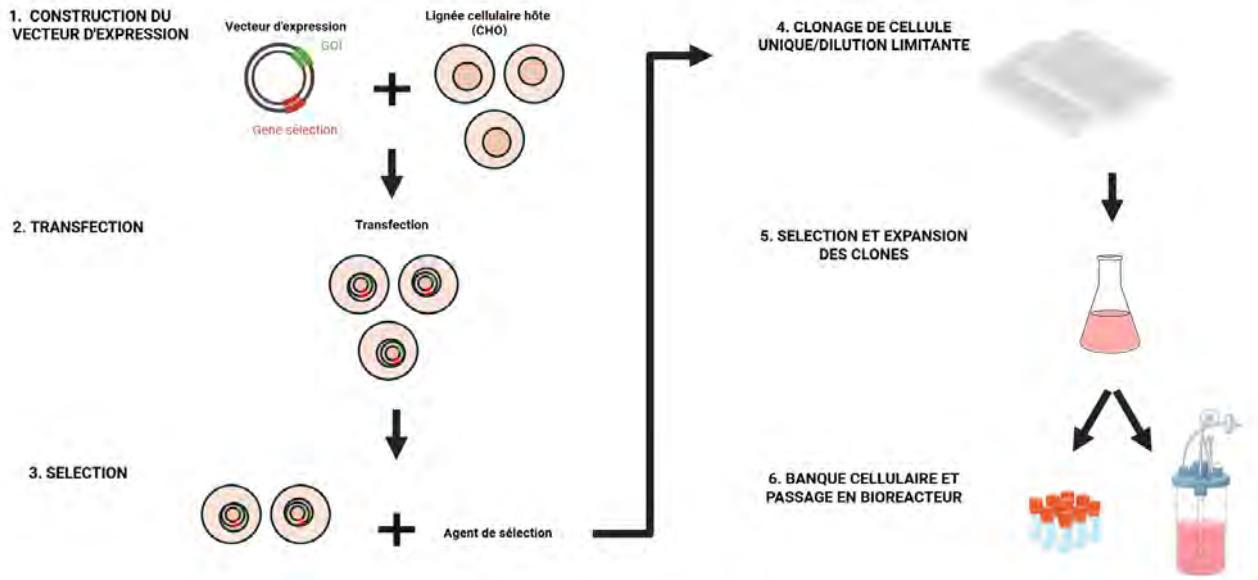


FIGURE 2.7 Procédé typique de développement d'une lignée cellulaire mammifère pour la production de protéines recombinantes. Adapté de [35]

Ce travail s'attache à la dernière étape du procédé, qui consiste à développer et optimiser un processus de culture adapté aux contraintes de production.

2.4 Effet des paramètres de culture sur l'expression des protéines recombinantes

Après avoir sélectionné les clones exprimant le plus de protéines, seuls ceux montrant de bonnes performances en bioréacteur à petite échelle sont choisis comme lignées de production. Les cellules animales sont particulièrement difficiles à cultiver en raison de leurs besoins nutritionnels complexes et de leur sensibilité aux paramètres de culture tels que le niveau d'O₂ et de CO₂ requis, la composition des milieux de culture, etc. Ainsi, la détermination de tels paramètres est essentielle à la réalisation d'une production à plus grande échelle.

2.4.1 Conditions physico-chimiques

Les conditions dans lesquelles les cellules sont cultivées sont importantes pour leur croissance. Celles-ci sont généralement optimales lorsqu'elles sont proches des conditions de l'organisme d'origine.

Température

La température a un fort impact sur le métabolisme cellulaire et donc sur la croissance et l'expression de protéines. Pour les cellules mammifères, une température de 37 °C est favorable à la croissance. Pourtant, une réduction de la température (32-35°C) permet de diminuer la consommation en nutriments et de maintenir la viabilité sur de plus longues périodes [36-38]. Ainsi, certaines stratégies de culture reposant sur une réduction de la température après l'atteinte d'une concentration cellulaire optimale font l'objet de recherches [39-41].

pH

Le pH a également un fort effet sur le métabolisme cellulaire. Les variations de pH dans la culture de cellules de mammifères sont principalement causées par l'accumulation de lactate ou de dioxyde de carbone. Les conditions de culture optimales pour la croissance et la productivité ne sont souvent atteintes que dans une plage de pH étroite, d'où l'importance d'une fine régulation de ce paramètre. Différentes recherches ont étudié l'effet du pH autour du pH physiologique. En général, un pH optimal pour CHO est compris entre 7.2 +- 0.1 en bioréacteur. Un pH trop bas (< 6,9) ou trop élevé (> 7,5) peut inhiber la croissance cellulaire et augmenter la mortalité cellulaire [38]. Néanmoins, le pH (ou plage) idéal varie en fonction de la lignée cellulaire. Certaines études montrent un pic de productivité ou de longévité pour des pH de 6.8, 7, 7.4 ou encore 7.6 [42] [43].

Transfert gazeux

La concentration d'oxygène (DO) et de dioxyde de carbone (pCO_2) dissous dans le milieu de culture impactent largement la croissance cellulaire. Le potentiel du pCO_2 à inhiber la croissance cellulaire et la productivité a été rapporté par d'autres chercheurs. L'inhibition de la croissance a été observée à 120 mm Hg de pCO_2 chez des cellules de myélome NS/0. Une réduction de la croissance et de l'expression du produit a également été rapportée chez des cellules CHO à cette même concentration de CO_2 [44]. De manière similaire, un bon contrôle de la DO est nécessaire. En effet, un manque ou un excès d'oxygène dissous dans le milieu va drastiquement diminuer la croissance et la productivité des cellules [45] [46]. La consommation d'oxygène est particulièrement importante en phase exponentielle de croissance et décroît après avoir atteint un plateau.

2.4.2 Milieu de culture

Le développement et l'optimisation du milieu de culture cellulaire sont considérés comme des stratégies importantes pour la production de protéines recombinantes. Cela permet de répondre efficacement aux besoins nutritionnels des cellules, de réduire les sous-produits, ainsi qu'à améliorer la qualité du produit mais cela influence directement la densité cellulaire atteignable et le titre [5].

Historiquement, les milieux contenaient des composants d'origine animale, comme le sérum foetal bovin (FBS) en raison de sa richesse en facteurs de croissance et nutriments. Toutefois, ce composant présente de nombreux inconvénients : variabilité d'un lot à l'autre, risques de contamination (mycoplasmes, virus, prions) et considérations éthiques. De plus, le FBS contient des composants non définis pouvant interférer avec la différenciation cellulaire ou induire des effets imprévisibles sur le phénotype des cellules. Pour ces raisons, les formulations ont évolué vers des milieux sans sérum, puis sans composants d'origine animale, et enfin vers des milieux chimiquement définis, où chaque composant est connu et contrôlé [47].

En 2015, près de 25% de la littérature concernant les bioprocédés de cellules CHO portaient l'optimisation des milieux de culture. Il s'agissait d'identifier les composants clés favorisant la croissance cellulaire, la productivité recombinante et la réduction des déchets métaboliques [5]. Cependant, l'impact de l'optimisation du milieu est rarement uniforme. La lignée cellulaire ainsi que la nature de la protéine recombinante peuvent influencer la réponse des cellules à une formulation de milieu donnée [23].

2.4.3 Déchets métaboliques

Les effets toxiques de l'ammoniac et du lactate sur les cultures de cellules de mammifères sont bien connus et largement étudiés sur différentes lignées cellulaires. Le niveau de tolérance à ces deux déchets métaboliques est spécifique à chaque lignée cellulaire et varie considérablement [48].

Lactate

Concernant le lactate, les effets indésirables sont provoqués par le lactate lui-même ou par la base ajoutée pour neutraliser celui-ci dans le bioréacteur. En effet, l'accumulation de lactate acidifie le pH, nécessitant l'ajout de bases pour neutraliser cette acidité. Cependant, cet ajout augmente l'osmolalité, ce qui peut affecter négativement les cellules. La plupart des études sur les effets du lactate sur les CHO se concentrent sur son impact sur la croissance et la productivité. Mais il peut également induire l'apoptose et réduire la productivité en raison des changements de pH et d'osmolalité. Il a été déterminé qu'une concentration de lactate supérieure à 40 mM est nuisible à la croissance cellulaire et à la productivité [49].

Deux phases distinctes du métabolisme du lactate existent. Dans un premier temps, les cellules consomment du glucose, ce qui entraîne la production de lactate. Celui-ci est généré par la glycolyse, à partir du pyruvate, sous l'action de la lactate déshydrogénase A (LDHA). Dans certains cas, une seconde phase peut être observée, au cours de laquelle les cellules consomment le lactate précédemment produit, même en présence de glucose et d'acides aminés en concentrations non limitantes dans le milieu. Il est également possible que glucose et lactate soient métabolisés simultanément. Ce phénomène de 'lactate switch' est bien documenté bien que ses mécanismes exacts restent mal compris. Il implique notamment un changement du flux métabolique, une régulation du transporteur MCT (monocarboxylate transporter) et une activité accrue de la LDH (lactate déshydrogénase) qui reconvertis le lactate en pyruvate utilisable [50]. De nombreuses études s'intéressent au ratio de lactate produit par rapport au glucose consommé. Cette re-consommation du lactate est bénéfique, car elle permet de réduire son accumulation toxique dans le milieu, d'éviter l'acidification excessive et d'améliorer la croissance cellulaire ainsi que la productivité des cultures. L'analyse de plus de 200 cultures de production a révélé une forte corrélation entre les cultures qui effectuent le "switch" lactate et une productivité élevée. Mais, le moment du "switch" est difficile à contrôler car il dépend de nombreux facteurs comme le pH, la disponibilité du glucose et de la glutamine, ou encore l'état redox cellulaire. Cela rend son exploitation industrielle complexe sans maîtrise fine du procédé [50].

Ammoniac

L'ammoniac est un sous-produit toxique du métabolisme cellulaire, dont l'accumulation inhibe le fonctionnement des cellules. Ses concentrations peuvent atteindre jusqu'à 10 mM en fin de culture, en grande partie à cause de la dégradation de la glutamine. Une concentration élevée en ammoniac perturbe le pH intracellulaire ainsi que les gradients électrochimiques à travers la membrane cellulaire, ce qui inhibe la croissance, la densité cellulaire maximale et la productivité [51]. Ses effets se manifestent à de plus basses concentrations que pour le lactate, entre 2 à 4 mM sans nécessairement impacter significativement les rendements pour des cellules CHO [52]. L'ammoniac perturbe également le profil de glycosylation des protéines recombinantes, ce qui peut compromettre leur stabilité, leur activité biologique et leur immunogénicité [53].

2.4.4 Induction

Le moment d'ajout de cumate et de la diminution de température au cours de la culture pour induire la production est un paramètre important. En effet, la productivité dépend de la concentration cellulaire viable maximale obtenue ainsi que de la productivité cellulaire spécifique [54].

L'objectif principal serait alors d'associer une phase de croissance rapide et intense à une phase de production stable après induction, maintenant la viabilité et un état métabolique productif favorable. Cependant, réaliser l'induction à des concentrations élevées peut baisser la productivité cellulaire spécifique ou réduire la phase de production en raison de l'appauvrissement du milieu de culture en glucose/nutriments et/ou de l'accumulation de métabolites. Une stratégie d'alimentation efficace en Fed-batch avant et après induction est indispensable à l'optimisation du procédé de production des cellules CHO inductibles [54]. Malgré l'optimisation de ces stratégies, les cultures Fed-Batch présentent une limite de concentration avant induction cellulaire relativement faible et, potentiellement, une baisse de viabilité avant induction. Une solution à ces problèmes est l'intensification de ces procédés avec, par exemple, un système de culture en perfusion [39].

2.5 Modes de cultures

Différents modes de culture peuvent être utilisés pour la production de protéines recombinantes. Les principaux sont présentés dans la figure 2.8.

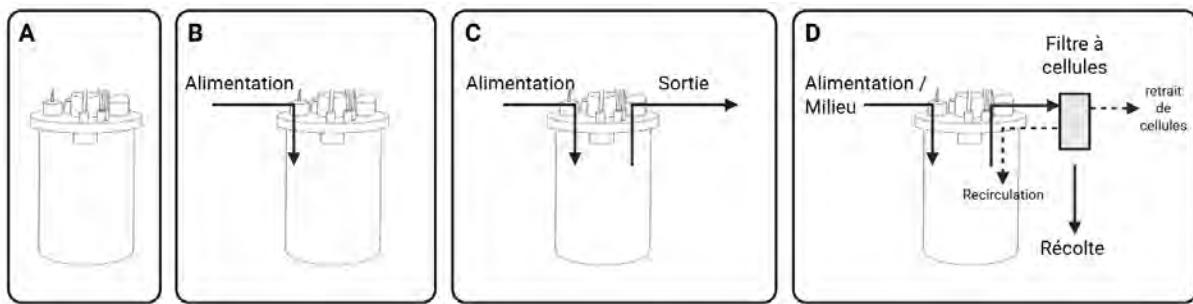


FIGURE 2.8 Principaux modes de culture : (A) cuvée, (B) cuvée alimentée, (C) chémostat et (D) perfusion

2.5.1 Cuvée

Le système de culture le plus simple à implémenter est le mode cuvée. Suite à l'inoculation, aucun ajout ou retrait de cellules, de milieu ou de feed n'est effectué. La culture se produit à volume relativement constant et, à la fin du procédé, tout le contenu du bioréacteur est récolté. Bien que simple à mettre en place, ce type de procédé est rapidement limité à cause de la baisse en nutriments ainsi que de l'accumulation de métabolites au cours de la culture qui entraînent l'arrêt de la croissance cellulaire, limitant la production d'anticorps. Les premières formulations de milieux permettaient d'atteindre des densités cellulaires de $1 - 2 \times 10^6$ cells/mL. Aujourd'hui, une densité de $5 - 10 \times 10^6$ cells/mL est atteignable en culture batch sur des durées de 5 à 10 jours avec des rendements relativement faibles [17].

2.5.2 cuvée alimentée

Dans les cultures en mode cuvée alimentée, des nutriments sont ajoutés soit en continu, soit par ajouts successifs afin de prolonger la phase de croissance, préserver la viabilité des cellules, augmenter la concentration en produit et limiter l'accumulation de métabolites indésirables. Ce type de procédé peut durer plus de 15 jours et permettre d'atteindre des concentrations cellulaires maximales de l'ordre de $10 - 20 \times 10^6$ cells/mL et des rendements finaux de 5 à 10 fois les quantités de protéines obtenues en mode cuvée [17]. La stratégie d'alimentation a pour objectif de fournir les nutriments nécessaires tout en évitant l'accumulation de sous-produits toxiques ou un excès de nutriments, pouvant inhiber la croissance. Sa fiabilité et sa mise en œuvre relativement simple en font l'une des approches les plus couramment utilisées pour la production industrielle de protéines recombinantes [55] [17].

2.5.3 Chémostat

Le chémostat est un mode de culture continu. Un flux constant de milieu frais est ajouté et le même flux de milieu de culture contenant les cellules, produits et déchets, est retiré simultanément. Ce fonctionnement permet de maintenir un volume constant et d'atteindre un état stationnaire, où le taux de croissance cellulaire est contrôlé précisément par le taux de dilution (égal à la vitesse d'ajout et de retrait du milieu sur le volume de culture) [56].

L'un des principaux avantages du chémostat est de pouvoir maintenir des conditions environnementales stables et définies dans le temps et des vitesses de croissance spécifiques, contrairement aux cultures en batch où la croissance varie, les nutriments s'épuisent et les déchets s'accumulent. C'est donc en particulier un outil de recherche très utile pour étudier des conditions bien définies et constantes. Cependant, ce mode de culture ne permet que de faibles rendements en biomasse et les risques de contamination sont plus importants. De plus, il est techniquement plus complexe et plus coûteux à mettre en œuvre que les systèmes batch ou fed-batch plus simples. Il n'est donc pas favorisé pour la production industrielle [56].

2.5.4 Perfusion

La perfusion est une autre stratégie de culture continue dans laquelle le milieu frais est constamment apporté au bioréacteur. La différence avec le chémostat est qu'un système de rétention des cellules est utilisé. Ainsi, seuls les produits et déchets sont retirés de la culture. Dans certains cas, un «cell bleed» est également effectué, permettant de retirer un excès de cellules du réacteur et ainsi favoriser la croissance et une bonne viabilité cellulaire sur de longues durées. Il existe différentes méthodes afin de séparer le milieu des cellules : filtration, centrifugation, etc. Ces systèmes peuvent être placés dans le bioréacteur ou à l'extérieur de celui-ci [13] [57].

Ainsi, les cultures en perfusion sont capables d'être maintenues durant plusieurs mois tout en conservant de bons rendements et permettent d'atteindre les concentrations cellulaires les plus élevées (entre 10^7 et 10^8 cells/mL), avec des rendements beaucoup plus élevés [58] [59] [60].

2.6 Cultures de cellules en Perfusion

2.6.1 Rétention des cellules

Les différents systèmes de rétention cellulaire sont basés dans la plupart des cas sur la taille ou la densité des cellules. De manière générale, les systèmes basés sur la filtration (c'est-à-dire les filtres rotatifs internes et externes, les systèmes ATF et TFF), les sédimentateurs et les filtres acoustiques sont largement utilisés dans l'industrie et en recherche [57]. L'encapsulation des cellules dans des billes ou fibres pourrait également, en principe, constituer une méthode efficace pour retenir les cellules à l'intérieur d'un bioréacteur, mais leur mise en œuvre et leur manipulation sont souvent peu pratiques [17].

Chaque méthode possède des avantages et des inconvénients. La séparation par taille se fait souvent par une barrière physique comme un filtre pour séparer à la fois les cellules vivantes et mortes du milieu sans distinction, ce qui permet une haute performance. Cependant, ces systèmes ont tendance à se boucher ou s'obstruer. En ce qui concerne la séparation via la densité, celle-ci ne nécessite pas de filtre et est donc plus robuste sur de longues durées de culture. Cependant, elle entraîne un temps de résidence élevé des cellules dans le système de séparation à cause de la faible différence de densité entre cellules et milieu. En effet, l'environnement non contrôlé au sein du dispositif peut nuire de façon irréversible à la performance des cellules, ce qui exige de limiter le temps de résidence. [61].

Une rétention cellulaire fiable doit donc satisfaire à plusieurs exigences. Premièrement, une rétention complète des cellules, la récupération du produit, des débits de perfusion raisonnables, peu de contraintes de cisaillement, un temps de résidence relativement court et un fonctionnement à long terme sans défaillance.

Les dispositifs de filtration tangentielle dont l'alternating tangential flow (ATF) et la tangential flow filtration (TFF) à fibres creuses constituent les technologies standard les plus utilisées pour la perfusion. Dans le système TFF, une pompe fait circuler en continu le milieu de culture depuis le bioréacteur vers le filtre (typiquement avec des pores de $0,22\mu\text{m}$), avant de le renvoyer dans le bioréacteur. Le liquide s'écoule tangentiellement à la surface de la membrane, ce qui réduit l'accumulation de particules et limite le colmatage. Le système ATF repose sur le même principe de filtration tangentielle, avec une différence : une pompe à diaphragme effectue des mouvements alternés, changeant la direction du flux. Ceci crée un effet autonettoyant sur la membrane, ce qui diminue encore les risques de colmatage et prolonge la durée d'opération. L'ATF est donc souvent préféré pour les cultures longues et intensives [13].

De nombreuses études comparent l'efficacité de ces deux systèmes. Ces comparaisons dé-

pendent du système exact employé, notamment de la lignée cellulaire, de la concentration cellulaire, du milieu et du type de produit. Généralement, il est observé que les deux systèmes offrent des performances similaires en termes de croissance cellulaire, d'activité métabolique et de qualité du produit. Cependant, le système ATF impose moins de contraintes de cisaillement (maximales) sur les cellules lors de la filtration. Le système TFF semble quant à lui retenir une plus grande quantité de protéine dans le bioréacteur (nommée fuite de produit) [62]. D'autres études démontrent que l'utilisation d'une pompe centrifuge ou d'une pompe à lévitation magnétique à faible cisaillement avec un système TFF permet de résoudre le problème de la fuite de produit ainsi que le colmatage. En effet, le cisaillement serait majoritairement responsable du colmatage par lyse cellulaire [63]. Pour aller plus loin, un système de TFF inversé a été développé en utilisant deux pompes à lévitation magnétique fonctionnant en alternance. Ce système a permis d'atteindre des taux très similaires à un système ATF [60]. Il a également été montré qu'à très fortes densités cellulaires, le système ATF est limité avant le système TFF. Pour le système TFF, la densité cellulaire a été limitée par la capacité de la membrane face à la viscosité élevée du milieu de culture ainsi que la pCO_2 . Pour le système ATF, la densité cellulaire a été limitée par la capacité à faire le vide du diaphragme de la pompe, incapable d'aspirer le fluide hautement visqueux. Les densités cellulaires maximales atteintes avant échec pour les systèmes ATF et TFF étaient respectivement de $1,32 \times 10^8 \frac{\text{cells}}{\text{mL}}$ et $2,14 \times 10^8 \frac{\text{cells}}{\text{mL}}$ [58]. Ces résultats restent néanmoins inférieurs (d'un facteur 5) à la densité cellulaire maximale théorique calculée par Ozturk (1996) [64].

Les résultats de ces études soulignent le rôle central de la rétention cellulaire dans la conception des bioréacteurs en mode perfusion, les technologies ATF et TFF s'imposant aujourd'hui comme des solutions de référence, tant pour les essais en laboratoire que pour la production à grande échelle.

2.6.2 Caractérisation du procédé

Taux de perfusion

Introduisons les paramètres décrivant un processus de culture en perfusion. Le renouvellement du milieu de culture peut être exprimé en taux de perfusion P , exprimé en volume de réacteur par jour ($\frac{V_R}{j}$). Il correspond au rapport entre le débit volumique de perfusion, Q_{perf} , et le volume total du bioréacteur, V_R .

$$P = \frac{Q_{\text{perfusion}}}{V_R} \quad \left[\frac{V_R}{j} \right] \quad \text{ou} \quad \left[\frac{L_{\text{milieu}}}{L_R \cdot j} \right] \quad (2.1)$$

Il est plus souvent exprimé en taux de perfusion spécifique par cellule, ou en anglais cell

specific perfusion rate (CSPR). Exprimé en picolitres par cellule par jour ($\frac{pL_{milieu}}{cell \cdot j}$). Il relie le taux de perfusion à la densité cellulaire viable (Viable cell density), VCD .

$$\text{CSPR} = \frac{P}{VCD} \quad [\frac{pL_{milieu}}{cell \cdot j}] \quad (2.2)$$

Le CSPR en particulier représente la consommation du milieu normalisée par la concentration cellulaire. Ainsi, le CSPR donne une information sur la performance du milieu utilisé. Un CSPR plus faible indique qu'il est possible de subvenir aux besoins d'une plus grande quantité de cellules avec une même quantité de milieu.

Afin de maintenir un volume constant dans le bioréacteur, la somme du débit de récolte sans cellules (taux de récolte, H) et du débit de purge cellulaire (bleed, B), s'il est présent, doit être égale au taux de perfusion :

$$P = H + B \quad (2.3)$$

Pour maintenir une densité cellulaire viable fixe, il est faut fournir une quantité suffisante de nutriments. Cela implique l'existence d'une valeur minimale du CSPR en dessous de laquelle le fonctionnement devient instable et la viabilité diminue. C'est pourquoi le CSPR représente une variable clé dans la conception, l'optimisation et le contrôle des bioréacteurs en perfusion, et doit être maintenu au-dessus de cette valeur minimale. En maintenant un CSPR constant, le métabolisme cellulaire et les concentrations de métabolites devraient rester stables, conduisant à un comportement de culture stable [13]. Les taux de CSPR rapportés dans la littérature varient de 15 à 500 pL/cell/j [65] [13] [66] [58]. Des opérations récentes réalisées à des CSPR très faibles, autour de 10–20 pL/cellule/jour, témoignent des améliorations des formulations de milieux au cours des dernières années [59] [67].

2.6.3 Contrôles

Au vu des hautes densités cellulaires et de leurs besoins métaboliques, les procédés en perfusion sont très dynamiques et demandent une stratégie de contrôle efficace.

Taux de perfusion spécifique

Comme mentionné dans la section 2.6.2, le CSPR définit la quantité de nutriments apportés à chaque cellule par jour. C'est donc une variable critique pour l'opération de la culture. Par exemple, pour une phase N-1, un haut taux de perfusion permet d'induire une grande croissance cellulaire et d'atteindre de très hautes concentrations. Cependant, ce gain se fait

au coût d'une plus grande consommation de milieu. Pour une culture N, un plus faible CSPR induira un ralentissement de la croissance mais aussi, souvent, un meilleur titre et une utilisation du milieu de perfusion plus efficace.

Pour développer un procédé de perfusion, il est nécessaire de suivre précisément la VCD, les taux de perfusion et le CSPR pour une culture, un système d'expression ou encore un milieu de perfusion spécifique. Maintenir un CSPR désiré pendant la culture est important pour la stabilité et l'efficacité, mais il n'est pas forcément nécessaire d'utiliser une boucle de contrôle avec un CSPR fixe. Différentes stratégies sont envisageables et sont explorées dans la littérature. Par exemple, des stratégies basées sur le contrôle du taux de perfusion ou de la VCD, dont la valeur de consigne satisfait au final le CSPR. D'autres stratégies sont encore possibles. [13].

Biomasse

Comme mentionné précédemment, pour contrôler la VCD, une purge de cellules est effectuée (cell bleed). Il existe plusieurs méthodes directes pour mesurer la VCD basées sur la densitométrie, la conductivité et la mesure optique. Il existe également des méthodes indirectes comme la mesure du taux de consommation d'oxygène [68] [69]. Actuellement, l'une des méthodes les plus efficaces consiste en une mesure de la capacitance en temps réel [70].

Pour opérer à VCD constante, il existe deux stratégies. Premièrement, effectuer un cell bleed de manière semi-continue lorsqu'il n'est pas possible d'obtenir de mesures en ligne. On retire alors une quantité définie de la culture une fois ou deux par jour en fonction de la mesure de VCD. Une autre approche nécessite des mesures en ligne de la VCD. Avec celles-ci, un contrôle automatique de la stratégie de cell bleed peut être implémenté [13].

2.6.4 Modèles à échelle réduite

Dans ce chapitre sont décrits les systèmes permettant une opération à l'échelle du millilitre (mL) et facilitant le développement précoce des procédés en perfusion, tels que le criblage de clones, la définition de milieux, et la détermination de conditions opératoires adaptées à une échelle plus grande. Ces modèles sont particulièrement importants car les procédés en perfusion sont plus complexes, longs et coûteux que les procédés en batch ou fed-batch.

Bioréacteurs de laboratoire

Les bioréacteurs de laboratoire (bench-scale) consistent en des cuves en verre ou en plastique à usage unique, d'un volume typique de 1 à 10 litres. Ces modèles sont les plus utilisés et

servent souvent de référence pour la montée en échelle clinique ou commerciale. Dans un laboratoire classique, une unité centrale de contrôle reçoit les données des capteurs en ligne et pilote les différents paramètres du procédé. Ils offrent actuellement le meilleur compromis entre taille, productivité et niveau de contrôle. Des paramètres tels que l'aération, l'apport d'énergie de mélange, le contrôle de l'oxygène dissous et du pH peuvent être bien adaptés à l'échelle de production. La mise en place à cette échelle correspond à ce qui a été décrit dans les chapitres précédents.

Un autre système d'échelle similaire, les bioréacteurs "Wavebag", est très classique en culture cellulaire et constitue une catégorie à part. Comme leur nom l'indique, ce sont des sacs remplis de milieu de culture, posés sur une surface plane qui oscille continuellement entre deux angles. Bien que les Wavebags aient été utilisés par le passé pour des cultures en perfusion, ils servent surtout pour la phase de montée en échelle (seed train) plutôt que pour le développement de procédé. Certaines applications de Wavebags en culture perfusion avec filtration tangentielle ont été rapportées dans la littérature [71] [58].

Dispositifs placés en incubateur

En incubateur, la température, l'humidité et le CO_2 sont contrôlés directement et l'agitation est utilisée pour favoriser le mélange et le transfert d'oxygène à la culture. Les dispositifs de culture sont fermés pour maintenir la stérilité, et une membrane perméable aux gaz permet le transfert d'oxygène et de dioxyde de carbone. Le transport de l'oxygène de l'air vers la suspension liquide est contrôlé par l'agitation dans la phase liquide et par la surface de l'interface gaz-liquide. Comme ces deux facteurs sont limités, l'apport en oxygène dans ces dispositifs peut devenir un problème. Dans ces systèmes, le pH n'est généralement ni surveillé ni contrôlé, mais un système tampon basé sur l'équilibre entre le bicarbonate de sodium et le CO_2 présent dans l'air est utilisé. Les équations suivantes décrivent ce système tampon [13] :



L'élimination du CO_2 de la suspension de culture n'est pas très efficace dans ces dispositifs, car l'effet d'extraction dû aux bulles d'air remontant dans un bioréacteur est absent. L'agitation, elle, est suffisante pour assurer un transfert de chaleur efficace et une homogénéité satisfaisante de la suspension cellulaire.

Parmi ces dispositifs, on compte : les flacons agités et les tubes agités. Leurs caractéristiques

sont résumées dans le tableau 2.1. Les manipulations comme l'échantillonnage, l'inoculation, l'alimentation, etc. sont réalisées manuellement par un opérateur sous une hotte à flux laminaire afin de garantir la stérilité. Le volume de culture de ces modèles est suffisant pour une caractérisation approfondie de la culture cellulaire en termes de densité cellulaire, de concentration en métabolites, d'osmolalité, d'analyse des milieux usés et de quantification du produit.

Les plaques à puits profonds existent en différents formats (de 6 à 96 puits). Avec un si grand nombre d'expériences en parallèle, des plateformes robotiques doivent être utilisées pour la gestion des liquides. Ces dispositifs peuvent être programmés pour échantillonner, inoculer et alimenter chaque plaque. Cependant, le volume réduit peut poser des limites en termes d'analyses. Le contrôle de qualité nécessite souvent une quantité importante de protéines, ce qui n'est pas toujours obtenable dans des volumes aussi petits. Ainsi, ce format est souvent limité aux applications de criblage ou à l'étude des milieux de culture [72].

Ces systèmes sont bien connus pour l'étude des systèmes batch et Fed-batch mais ne permettent pas une culture véritablement continue pour la perfusion. L'alternative consiste, à réaliser une perfusion semi-continue. À intervalles de temps réguliers, la culture est filtrée, par exemple par centrifugation pour séparer les cellules du milieu ou par sédimentation. Le surnageant peut alors être remplacé par un milieu frais afin de simuler un procédé de perfusion. Par exemple, l'article [73] présente une perfusion réalisée par sédimentation en plaque à micro-puits avec un volume de 1,2 mL et des taux de perfusion de 0,5 - 18 RV. Une concentration maximale de 42×10^6 (4,2 fois plus qu'en fed-batch) a pu être atteinte, avec une augmentation de production d'un facteur 1,9. Ces résultats ont pu être confirmés en réacteur de 5 L et ont montré une comparabilité des profils métaboliques et de croissance.

L'article [74] propose une méthode de perfusion par centrifugation en tubes à 300g durant 5 minutes. Les cultures sont réalisées en flasques de 125 à 1000 mL avec un volume de culture de 25–200 mL. Cette stratégie a permis d'atteindre des densités supérieures à 40×10^6 cellules/mL, sans impacter la viabilité (>98%). Cette procédure a été réalisée pour inoculer des réacteurs à haute densité.

Les modèles réduits de cultures en perfusion sont des alternatives intéressantes aux bio-réacteurs, particulièrement utiles pour les phases de criblage et de développement précoce des procédés. Cependant, ces systèmes présentent des limites importantes : la nature semi-continue empêche souvent d'atteindre de très fortes densités cellulaires, car une fréquence d'échange de milieu supérieure à une fois par jour est difficile à gérer. De plus, des limitations en transfert d'oxygène et un contrôle du pH insuffisant peuvent altérer la qualité du produit ou les performances globales de la culture.

Bioréacteurs miniatures

Les bioréacteurs miniatures (de 15 à 250 mL) représentent aussi une option pour les modèles réduits. Ils permettent le suivi et le contrôle en ligne du pH et de l'oxygène dissous (DO), et sont abordés dans plusieurs publications [75–77]. Une plateforme robotisée peut être programmée pour réaliser diverses tâches, telles que le prélèvement, l'alimentation, ainsi que le suivi et le contrôle des paramètres de culture. Bien que ces systèmes aient été initialement conçus pour des cultures en batch et Fed-batch, leur adaptation à la perfusion est possible mais reste complexe. En général, la méthode de perfusion pour ces systèmes est la sédimentation. Pour répondre au besoin d'un véritable dispositif de perfusion, un nouveau type de bioréacteurs miniatures a été développé pour l'ambr 250. Ces bioréacteurs sont équipés de modules à fibres creuses, utilisables en mode TFF ou ATF [77].

TABLEAU 2.1 Modèles à petite échelle pour le développement de procédé et leurs caractéristiques.

Paramètres	Plaque à puits	Tubes agités	Flasques agitées
Mélange	Orbitale	Orbitale	Orbitale
Contrôle du pH	Non	Non	Non
Contrôle de la DO	Non	Non	Non
Contrôle du pCO ₂	Non	Non	Non
Aération	Passive	Passive	Passive
Volume (mL)	0,5–5	5–100	25–800

Paramètres	Micro-bioréacteurs	Bioréacteurs de laboratoire
Mélange	Mécanique	Mécanique
Contrôle du pH	Oui (limité)	Oui
Contrôle de la DO	Oui (limité)	Oui
Contrôle du pCO ₂	Parfois	Oui
Aération	Active	Active
Volume (mL)	15–250	1000–10 000

CHAPITRE 3 INTENSIFICATION DE PROCÉDÉ : FED-PERFUSION À FAIBLE TAUX AVEC UNE LIGNÉE CHO INDUCTIBLE AU CUMATE POUR LA PRODUCTION DE PALIVIZUMAB

3.1 Matériels et méthodes

3.1.1 Lignée cellulaire et conditions de culture en flasque

Une lignée cellulaire CHO glutamine synthétase (CHO^{BRI}/rcTA) permettant l'expression inductible au cumate du Palivizumab (PLVZM), un anticorps monoclonal (IgG), a été utilisée dans cette étude. Cette lignée cellulaire, produite à partir d'un seul clone (clone 1389), provient du NRC (National Research Council Canada). La lignée cellulaire CHO^{BRI}/rcTA exprime de manière stable le cymene repressor (CymR) et le transactivateur inverse du cumate (rcTA) [10].

Les cellules sont cultivées dans un milieu basal BalanCD Growth A (Irvine Scientific, États-Unis), complété par 50 µM de méthionine sulfoximine (MSX), 0,1 % de Kolliphor P188 (Sigma Aldrich, États-Unis) et jusqu'à 10 mL/L d'antibiotique Penicillin-Streptomycin P0781 (Sigma Aldrich, États-Unis). L'alimentation des cultures a été effectuée avec une formulation commerciale BalanCD CHO Feed 4 (Irvine Scientific, États-Unis), complétée par 50 µM de MSX, 0,1 % de Kolliphor (Sigma Aldrich, États-Unis) et jusqu'à 10 mL/L d'antibiotique Penicillin-Streptomycin P0781 (Sigma Aldrich, États-Unis). La composition exacte est présentée à l'annexe A.2. La stratégie développée dans cette étude combine l'ajout régulier d'alimentation avec la solution concentrée CHO Feed à une perfusion de milieu de culture moins concentré. L'alimentation ainsi que la perfusion sont supplémentées après trois ou quatre jours de culture.

Les cellules stockées dans de l'azote liquide sont d'abord décongelées dans un bain-marie (3 min à 37 °C) puis remises en suspension dans 9 mL de milieu frais. Une étape de centrifugation à 200g pendant 10 minutes permet de séparer les cellules de la phase liquide, contenant du diméthylsulfoxyde (DMSO). Ensuite, le culot est remis en suspension avec du milieu frais, qui avait été préalablement placé dans un incubateur à 37 °C et 5% de CO₂. Une maintenance cellulaire de 25 mL est alors réalisée dans une flasque de 125 mL, avec une agitation orbitale de 170 à 200 rpm. Des passages sont effectués tous les deux jours pour préparer l'inoculation de la prochaine expérience.

Deux campagnes d'expérimentations sont réalisées en flasques. Les paramètres étudiés et spécificités de celles-ci sont expliqués dans les sections correspondantes. Ces cultures sont

incubées à 37 °C et 5 % de CO₂ dans des flasques de 125 mL avec un volume initial de 25 mL de milieu et une agitation orbitale de 200 rpm. Les cultures ont été induites avec 2 µg/mL de cumate (Sigma Aldrich, États-Unis) et, au moment de l'induction, la température a été réduite à 32 °C sur la base de précédents travaux [39, 41, 54]. Pour réaliser la perfusion en flasques agitées, un échange discontinu quotidien toutes les 24h du milieu a été effectué avec du milieu frais par transfert de la culture en Falcon de 50mL, centrifugation (200g, 10min), retrait du surnageant et re-suspension. Une stratégie d'alimentation visant à maintenir la concentration en glucose supérieure à 3 mM a été mise en œuvre à l'aide d'ajout de la solution d'alimentation et d'une solution concentrée (2M) de glucose. Pour la première campagne, une stratégie d'alimentation fixe est définie, sur la base de précédents travaux en fed-batch [41]. Ensuite, une stratégie dynamique basée sur la concentration cellulaire quotidienne est développée. L'ajout de glucose, si nécessaire, se base sur la concentration quotidienne et le taux de consommation de celui-ci (voir équation 3.3).

Les cultures sont maintenues pendant 21 jours ou jusqu'à ce que la viabilité passe en dessous de 30 %.

3.1.2 Culture en bioreacteur

Montage pour cellules inductibles

Le montage développé pour cellules inductibles contient toutes les entrées et sorties classiques d'un système en perfusion : sonde DO, sonde pH, sortie pour filtration, sonde de température, bulleur, aération (headspace), condenseur, entrée pour glucose et base, sortie pour échantillonnage.

La différence avec les systèmes classiques réside en premier lieu dans l'utilisation d'une solution de feed séparée de la solution de perfusion, permettant de contrôler la quantité de milieu pour perfusion et de feed séparément, plutôt que d'utiliser un milieu concentré. De plus, chacune de ces solutions est présente avec et sans cumate à concentration identique. Ces quatre solutions sont connectées au port du bioréacteur à l'aide de tubes et de pinces de serrage. Les pinces permettent de sélectionner uniquement la bouteille souhaitée au moment voulu, en évitant tout mélange ou reflux non désiré depuis les autres bouteilles. Ce système illustré aux figures 3.1 et 3.2 permet une gestion efficace malgré un nombre de ports limité. De plus, deux bouteilles de récolte sont employées, permettant de séparer la récolte avant induction (censée ne contenir aucune production) et la récolte après induction.

Les expériences en mode fed-batch et fed-perfusion ont été réalisées avec un système DASGIP® Parallel Bioreactor Systems (Eppendorf), en utilisant un volume initial de 0,4 L. La densité

d'inoculation était de $0,3\text{--}0,5 \times 10^6$ cellules/mL. Pour l'opération en perfusion, le milieu de culture a été retiré par filtration en continu à l'aide d'une sonde d'échantillonnage FISP® (Flownamics), équipée d'une membrane céramique d'une taille de pore de 0,2 µm, immergée dans le milieu de culture [39] (voir figure 3.2). Le milieu, la solution d'alimentation et la stratégie d'alimentation ont été identiques à celles utilisées en flasques agitées.

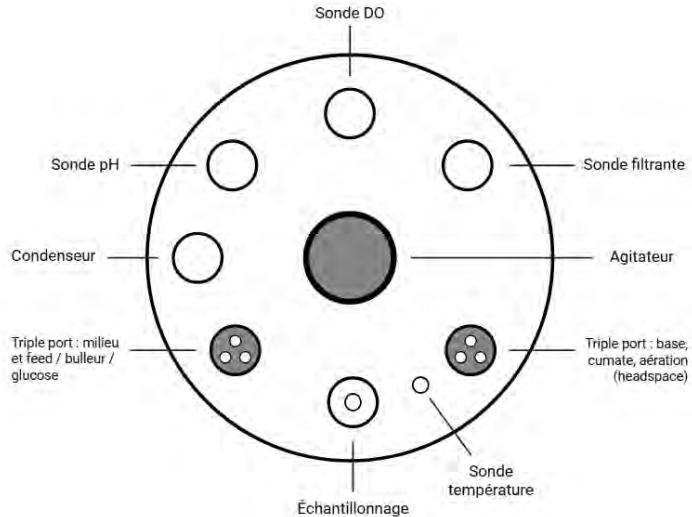


FIGURE 3.1 Vue d'ensemble du montage du bioréacteur, schéma de la configuration de la plaque supérieure (headplate)

L'oxygène dissous a été maintenu à 40 % de la saturation en air à l'aide d'un mélange d'air, d'oxygène et d'azote, fourni par bullage via microsperger au besoin. De plus, un mélange de 21 % d' O_2 , 5 % de CO_2 et d'azote est utilisé en aération de surface avec un débit de 2 L/h. Le pourcentage de CO_2 est réduit avec l'acidification du milieu et la croissance cellulaire. Un pH cible de $7,05 \pm 0,15$ a été employé. Le pH a été régulé par bullage de CO_2 ou ajout de base NaOH 2 M. Les cultures ont été agitées à 205 rpm et maintenues à une température de 37 °C. Lors de l'induction, la température a été réduite à 32 °C.

3.1.3 Analyse de la viabilité cellulaire, des nutriments, des métabolites et du produit

Pour chaque expérience, les comptages cellulaires et la viabilité ont été déterminés par la méthode d'exclusion au bleu trypan. Des échantillons ont été prélevés chaque jour (3mL pour les bioreacteurs et 150 µL en flasques), centrifugés (5000 g, 5 min) et le surnageant a été récupéré pour l'analyse des métabolites avant d'être stocké à -30 °C (voir figure 3.3).

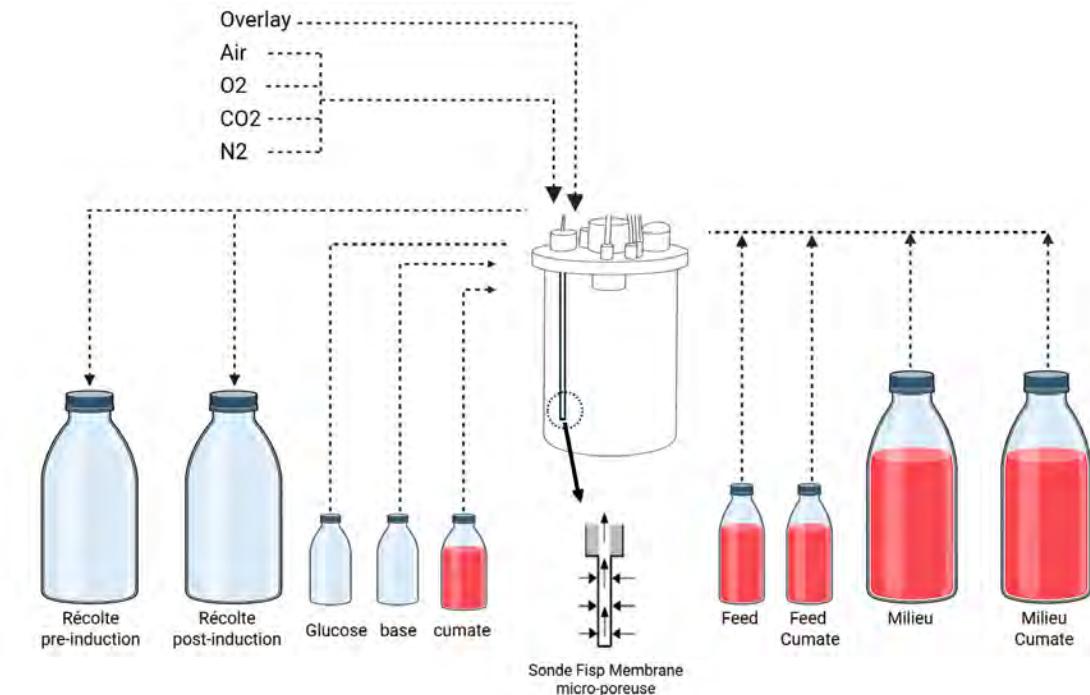


FIGURE 3.2 Vue d'ensemble du montage du bioréacteur, vue latérale

Les concentrations en anticorps monoclonal (mAb), glucose, lactate et ammoniac ont été mesurées par un analyseur Roche Cedex Bio (Roche diagnostics, Québec).

3.1.4 Croissance, production, consommation et taux spécifique cellulaires

La concentration cellulaire viable intégrée (IVCC) et le taux de croissance (μ) ont été calculés à l'aide des équations suivantes.

$$\begin{aligned} IVCC &= \sum \Delta IVCC \\ &= \sum_{i=1}^n \frac{(VCD_i \times V_i) + (VCD_{i-1} \times V_{i-1})}{2} \times \frac{(t_i - t_{i-1})}{V_i} \quad \left[\frac{\text{cellules} \cdot \text{jours}}{\text{mL}} \right] \end{aligned} \quad (3.1)$$

où VCD est la densité cellulaire viable, V le volume de culture [mL], et t le temps [h].

$$\mu = \frac{\ln(VCD_i/VCD_0)}{(t_i - t_{\text{initial}}) * 24} \quad [\text{h}^{-1}] \quad (3.2)$$

où VCD_0 est la densité cellulaire initiale, VCD_i celle au temps t_i .

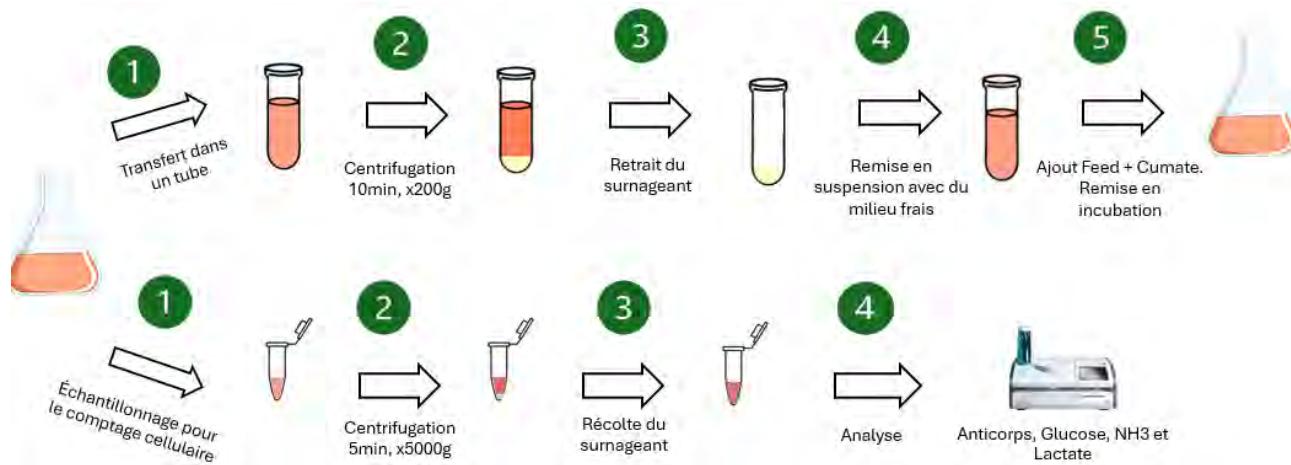


FIGURE 3.3 Schéma de la procédure pour simuler une culture en perfusion dans des flasques agitées (pseudo-perfusion) et pour l'échantillonnage. **Haut** : (1) chaque jour, le contenu de la flasque est transféré dans un tube, (2) centrifugé (10 min, 200 × g), (3) le surnageant est retiré, et (4) les cellules sont remises en suspension dans du milieu frais avant (5) l'ajout du feed et du cumate, puis remises en incubation. **Bas** : (1) un échantillonnage est effectué quotidiennement pour analyse. (2) Après centrifugation (5 min, 5000 × g), (3) le surnageant est récolté pour (4) des mesures dont anticorps, glucose et lactate.

Le taux d'un métabolite consommé ou produit par jour (q_t) est calculé à partir de l'équation suivante :

$$q_{t,M} = \frac{([M]_{n-1} + [M_{\text{ali}}]_{n-1} + \frac{[M_{\text{perf,in}}]_{n-1} \cdot V_{\text{perf,in}} - [M_{\text{perf,out}}]_{n-1} \cdot V_{\text{perf,out}}}{V_{n-1}}) - [M]_n}{t_n - t_{n-1}} \quad [\text{mmol/L/j}] \quad (3.3)$$

où $[M]$ est la concentration mesurée du métabolite M , $[M_{\text{ali}}]$ est la concentration de M apportée par l'alimentation, $[M_{\text{perf,in}}]$ est la concentration de M dans le milieu frais de perfusion (entrant), $[M_{\text{perf,out}}]$ est la concentration mesurée dans le milieu perfusé sortant, et V est le volume de culture.

Une valeur positive de $q_{t,M}$ indique une consommation nette du métabolite M , tandis qu'une valeur négative correspond à une production nette.

Les taux spécifiques de production (q_P), de consommation de glucose (q_{Glc}) et de production de lactate (q_{Lac}) et d'ammoniaque (q_{NH_3}) ont été calculés en utilisant les équations :

$$\begin{aligned}
 q_{\text{Glc}} &= \frac{q_{t,\text{Glc}}}{\Delta IVCC} & [\text{pmol/cellules/jours}] \\
 q_{\text{Lac}} &= \frac{q_{t,\text{Lac}}}{\Delta IVCC} & [\text{pmol/cellules/jours}] \\
 q_{\text{NH}_3} &= \frac{q_{t,\text{NH}_3}}{\Delta IVCC} & [\text{pmol/cellules/jours}] \\
 q_{\text{P}} &= \frac{q_{t,\text{P}}}{\Delta IVCC} & [\text{pg/cellules / jours}]
 \end{aligned}$$

3.1.5 Gestion et nature des erreurs expérimentales

Erreur de mesure sur la concentration en produit et en métabolites.

L'incertitude instrumentale des mesures de produits et métabolites a été caractérisée au préalable par la réalisation de triplicatas sur un même échantillon. L'écart-type obtenu a été appliqué à l'ensemble des mesures réalisées au cours de l'étude. Cette incertitude a été propagée dans le calcul des indicateurs dérivés tels que la production totale, le rendement volumétrique et la productivité. Les erreurs associées proviennent essentiellement de la précision de l'analyseur biochimique utilisé pour ces mesures, combinées à des fluctuations aléatoires liées aux manipulations.

Incertitude sur la concentration cellulaire.

Afin d'évaluer l'incertitude sur la concentration cellulaire, chaque échantillon a été compté en duplicita, et l'écart-type entre les comptages est reporté. Ce traitement permet de quantifier la variabilité liée à la manipulation et au comptage visuel.

Nature des réplicas expérimentaux.

Les erreurs et déviations présentées ne proviennent pas de réplicats biologiques indépendants, mais de réplicats techniques. Par conséquent, les incertitudes reportées rendent compte de la précision des mesures expérimentales, mais ne permettent pas d'évaluer la variabilité d'une expérience biologique à l'autre. De plus, des erreurs de manipulation peuvent également survenir. Lors de la réalisation des perfusions à petite échelle, la méthode de retrait de surnageant peut entraîner l'aspiration accidentelle d'une fraction de cellules, en particulier lorsque le volume prélevé est proche de 100 % du surnageant. Cette perte potentielle de cellules peut contribuer à une variabilité supplémentaire dans les résultats.

3.2 Première campagne : taux de perfusion fixe

Lors de cette campagne, deux expériences sont réalisées, chacune avec trois flasques en parallèle. L'objectif est d'explorer la faisabilité d'une perfusion pseudo-continue par centrifugation à petite échelle comme expliqué précédemment et d'évaluer son intérêt pour l'intensification d'une culture Fed-batch de référence.

3.2.1 Paramètres étudiés

Expérience 1

La première expérience s'intéresse à l'impact de l'ajout d'une perfusion quotidienne à taux fixe de 1 volume de réacteur (RV) par rapport au mode fed-batch, ainsi qu'à l'effet de la densité cellulaire au moment de l'induction. Trois conditions sont mises en place :

- **FB** : un fed-batch de référence avec induction à 2×10^6 cellules/mL
- **P1** : une perfusion avec induction à 2×10^6 cellules/mL
- **P2** : une perfusion avec induction à 8×10^6 cellules/mL

Pour chacune des conditions, la perfusion est réalisée à partir du troisième jour. Le régime d'alimentation est maintenu identique pour les trois conditions explorées : 7 % du volume initial de culture tous les deux jours (1,75 mL) et aucun glucose n'est ajouté. Les cultures sont inoculées à 0.25×10^6 cellules/mL. Ces conditions sont reprises à la table 3.1.

Expérience 2

La seconde expérience s'intéresse à l'impact du taux de perfusion sur la culture. La concentration cellulaire à l'induction est identique pour toutes les cultures : 8×10^6 cellules/mL.

Trois conditions de perfusion quotidienne à taux fixe sont mises en place :

- **P25** : 0.25 RV par jour
- **P50** : 0.5 RV par jour
- **P100** : 1 RV par jour

Pour chacune des conditions, la perfusion est réalisée à partir du troisième jour. La stratégie d'alimentation est fixée à 3 % du volume initial tous les deux jours (0,75 mL), sauf pour la condition P25, où elle est portée à 3 % par jour afin de compenser le faible apport de perfusion. Aucun glucose n'est ajouté au cours des cultures. Les cultures sont inoculées à 0.25×10^6 cellules/mL. Ces conditions sont reprises à la table 3.1.

TABLEAU 3.1 Conditions expérimentales testées pour la première campagne

EXP1	Fed-Batch	P1	P2
Feed (v/v)	7% / 2 jour	7% / 2 jour	7% / 2 jour
Perfusion (v/v)	0%	100%	100%
Induction (cell/mL)	2M	2M	8M

EXP2	P25	P50	P100
Feed (v/v)	3% / jour	3% / 2 jour	3% / 2 jour
Perfusion (v/v)	25%	50%	100%
Induction (cell/mL)	8M	8M	8M

3.2.2 Résultats et discussion

Impact de la perfusion et de la concentration à l'induction

Les résultats concernant le suivi de la biomasse au cours de la culture pour FB, P1 et P2 sont reportés à la figure 3.4.

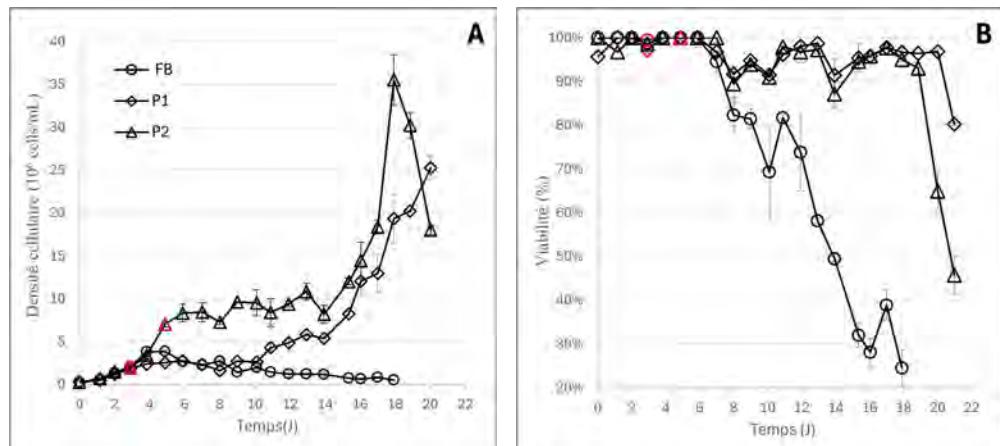
Pour les conditions FB et P1, l'induction a été réalisée au jour 3, tandis qu'elle a été retardée au jour 5 pour la condition P2 afin d'atteindre les concentrations cellulaires visées. Les cultures en perfusion ont montré une croissance cellulaire après induction. Le taux spécifique de croissance cellulaire moyen avant induction était similaire dans toutes les conditions, avec une valeur de $0.029 - 0.032 \text{ h}^{-1}$. Ce maintien d'un taux constant, malgré un décalage de deux jours pour P2 par rapport à FB, suggère qu'une induction à plus haute concentration est envisageable en perfusion, tout en prolongeant la croissance exponentielle.

La densité cellulaire maximale atteinte a été de 36×10^6 cellules/mL (table 3.2), soit près de dix fois celle obtenue en Fed-batch et 3,6 fois celle rapportée dans des conditions optimisées précédemment en Fed-batch avec la même lignée [78]. Cette amélioration pourrait être attribuée à la dilution accrue des métabolites dans les cultures en perfusion. Le taux de perfusion spécifique minimum obtenu pour chaque culture est ≈ 0.04 et $0.03 \text{ nL/cellule/j}$. Cette donnée est importante pour définir un système en perfusion avec un CSPR fixe.

Concernant la viabilité cellulaire, elle est restée supérieure à 80 % pendant 10 jours en Fed-batch, tandis qu'elle a pu être maintenue durant 20 et 21 jours respectivement en conditions de perfusion.

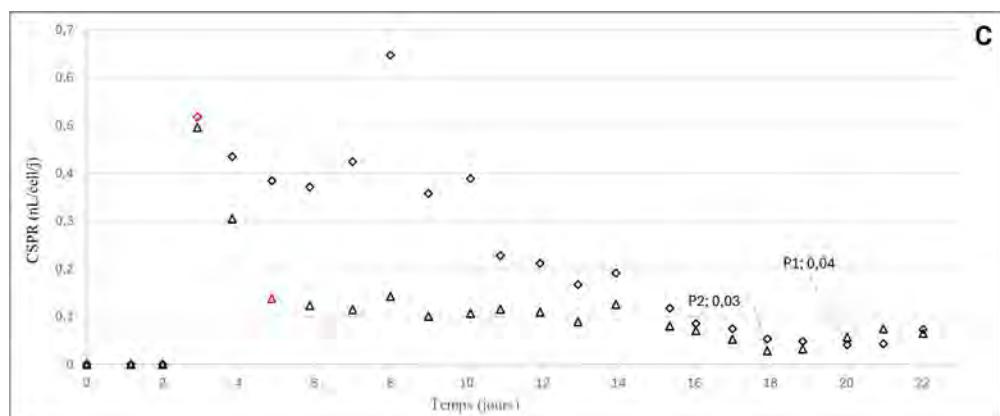
TABLEAU 3.2 Effet de la concentration cellulaire à l'induction et de la perfusion sur la croissance et la productivité

Induction (cell/mL)	FB (2×10^6)	P1 (2×10^6)	P2 (8×10^6)
μ avant induction (h^{-1})	0.032	0.030	0.029
VCD_{\max} (10^6 cellules/mL)	3.8	25	36
IVCC (10^6 cellules·j/mL)	30.3	191	229
q_P^{moy} (pg/cellule/j)	15.39	35.13	40
$CSPR_{\min}$ (nL/cellule/j)	.	0.0408	0.0289
Durée de culture (j)	18	21	21



(a) Densité cellulaire

(b) Viabilité cellulaire



(c) Taux de perfusion spécifique (CSPR)

FIGURE 3.4 Résultats campagne 1 expérience 1 : (a), (b) : Indicateurs de croissance cellulaire en fonction de la présence de perfusion et de la concentration à l'induction. 0%-2M (rond), 100%-2M (losange), 100%-8M (triangle). Les marqueurs en rouge indiquent le jour d'induction et la diminution de la température. Les barres d'erreurs indiquent l'écart type (SD) sur la mesure par duplicita. (c) : taux de perfusion spécifique (CSPR)

Les profils de concentration en glucose (voir figure 3.5a) montrent que la stratégie d'alimentation était suffisante pour maintenir la concentration de glucose pendant la durée de culture. Cependant, la baisse importante pour P1 et en particulier P2 due aux hautes concentrations en fin de culture indique potentiellement le besoin d'une stratégie d'alimentation de glucose supplémentaire pour maintenir la culture sur de plus longues durées. La culture FB présente une accumulation de glucose après la diminution de la viabilité. Les profils de consommation spécifique en glucose (voir figure 3.5b) confirment cette tendance. Une activité métabolique élevée est observée au début de culture pour toutes les conditions, mais elle se maintient plus longtemps en perfusion, notamment pour P2.

Les profils de lactate (voir figure 3.5c et 3.5d) montrent une accumulation progressive tout au long de la culture. La perfusion a permis de limiter la concentration maximale de lactate atteinte (26 mM pour FB et 18-19 mM pour P1, P2), mais aucune re-consommation n'a été observée, probablement en raison de la concentration élevée en glucose.

Concernant l'ammoniac, les tendances observées pour les conditions P1 et P2 sont similaires en début et en fin de culture. Toutefois, entre les jours 6 et 10, la concentration en ammoniac est environ deux fois plus élevée pour P2, ce qui est cohérent avec la croissance et la densité cellulaire plus élevées observées. En fed-batch, une accumulation rapide de l'ammoniac est observée, atteignant des concentrations jusqu'à deux fois supérieures à celles mesurées en perfusion, avec un maximum de 10 mM. Les profils de productivité spécifique montrent néanmoins que les conditions P1 et P2 induisent une production accrue, mais que la perfusion permet de maintenir leurs concentrations à des niveaux bien inférieurs (2,5 - 4 mM).

Les profils de concentration en anticorps (voir figure 3.6a et 3.6c) montrent que la condition Fed-batch (FB) présente une production limitée, avec une concentration maximale en protéine autour de 0,5 g/L et un titre total d'environ 16 mg. Les cultures en perfusion (P1 et P2) offrent des performances nettement supérieures. P1 maintient une concentration moins élevée que FB, bien qu'induite à la même concentration, grâce à la perfusion. La condition P2 permet d'atteindre un titre final bien supérieur (186 mg contre 108 mg pour P1) et une concentration maximale en protéine de 0,75 g/L.

La productivité spécifique q_P (voir figure 3.6b) est nettement améliorée en conditions de perfusion par rapport au fed-batch, avec des valeurs atteignant jusqu'à 40-50 pg/cellule/jour, contre moins de 30 pour FB. Néanmoins, en fin de culture, q_P diminue pour atteindre des valeurs similaires à celles du FB.

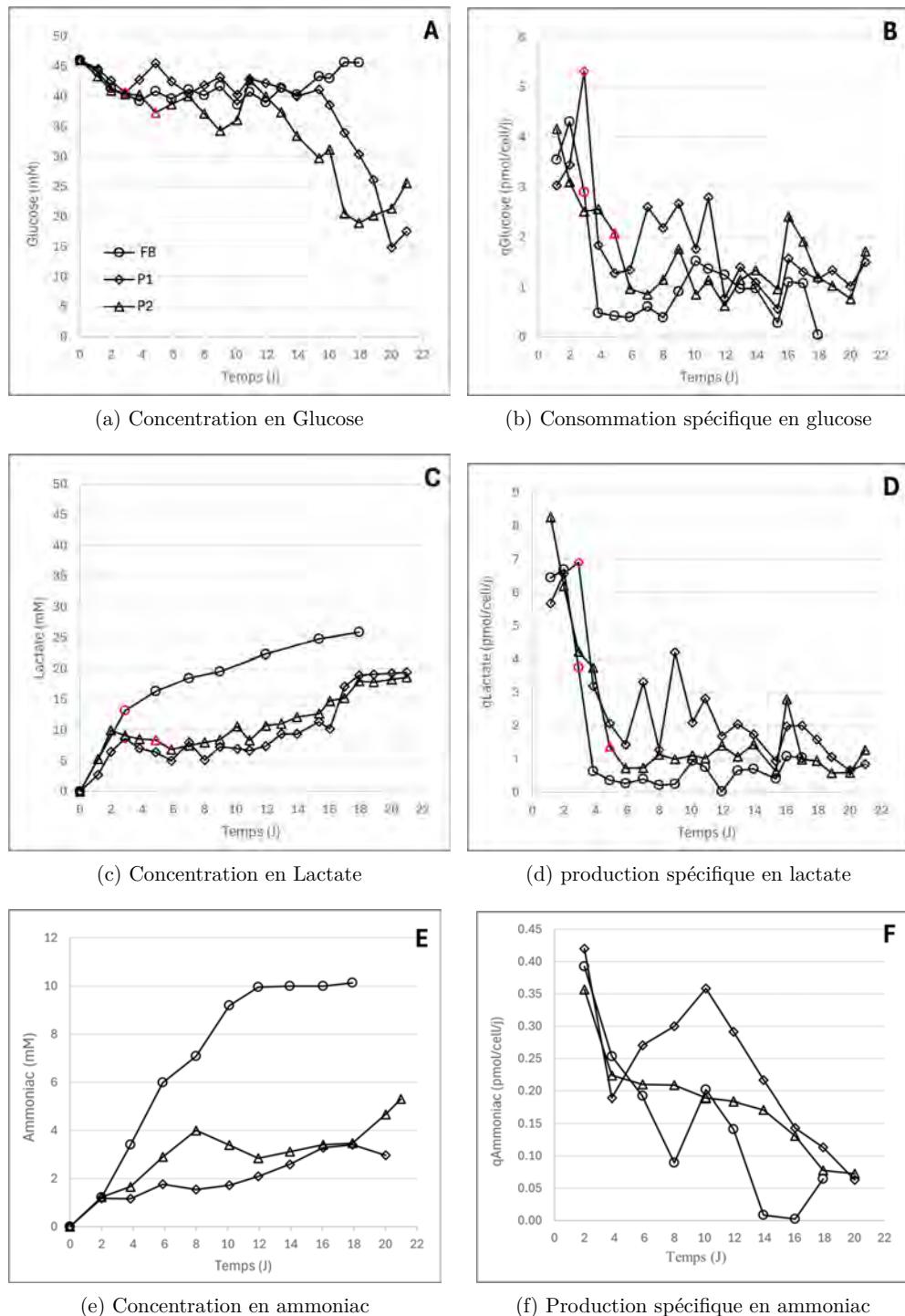


FIGURE 3.5 Résultats campagne 1 expérience 1 : (a), (b) : Concentration et consommation spécifique en glucose. SD : $\pm 0,05$ mmol/L. (c), (d) : Concentration et production spécifique en lactate. SD : $\pm 0,02$ mmol/L. Ceci en fonction de la présence de perfusion et de la concentration à l'induction. 0%-2M (rond), 100%-2M (losange), 100%-8M (triangle). Les marqueurs en rouge indiquent le jour d'induction et la diminution de la température.

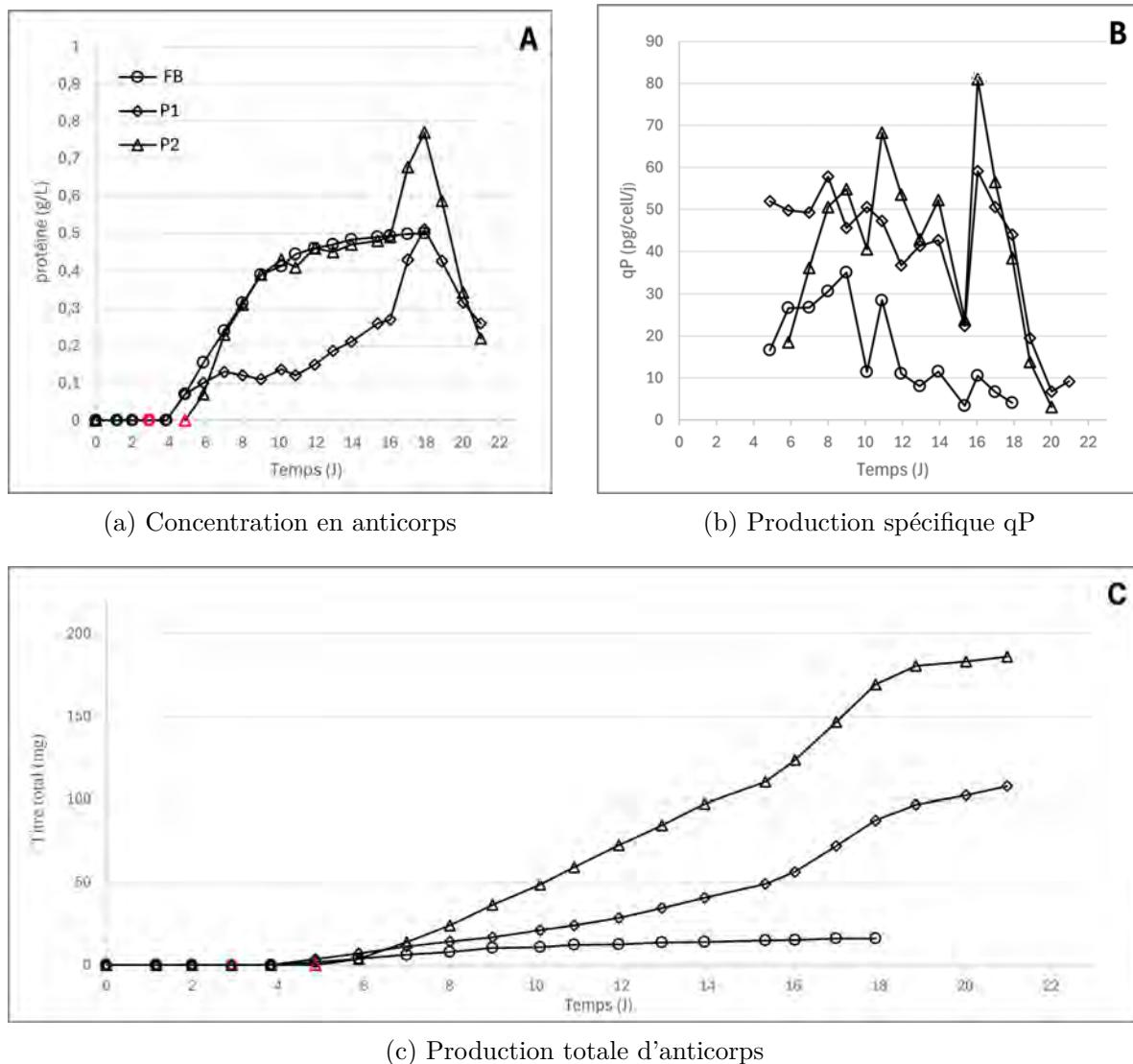


FIGURE 3.6 Résultats campagne 1 expérience 1 : (a), (b) : Concentration et production spécifique en anticorps. SD : $\pm 0,01$ g/L. (c) : Production totale en anticorps sur toute la culture. Ceci en fonction de la présence de perfusion et de la concentration à l'induction. 0%-2M (rond), 100%-2M (losange), 100%-8M (triangle). Les marqueurs en rouge indiquent le jour d'induction et la diminution de la température.

Impact du taux de perfusion

Les résultats concernant le suivi de la biomasse au cours de la culture pour P100, P50 et P25 sont reportés à la figure 3.7.

L'induction a été réalisée au jour 5 pour l'ensemble des cultures. Une forte croissance cellulaire a été observée après induction, de manière similaire à l'expérience précédente. Par ailleurs, le taux de croissance cellulaire spécifique moyen avant induction est resté constant entre les différentes conditions, avec une valeur de $0,029 - 0,030 \text{ h}^{-1}$. La phase de croissance exponentielle a donc été maintenue plus longtemps avec le délai d'induction.

Les cultures en perfusion élevées (P50 et P100) atteignent des densités cellulaires significativement plus élevées que P25. La densité cellulaire maximale atteinte a été de 45×10^6 cellules/mL pour la condition P100 (table 3.3), environ douze fois celle observée en fed-batch lors de l'expérience 1, et environ 3,5 fois celle obtenue avec P25, validant que l'augmentation du taux de perfusion permet de maintenir un environnement favorable à la prolifération cellulaire. Ces résultats suggèrent également qu'une stratégie d'alimentation plus faible (3 % par 2 jours vs 7 %) est suffisante, voire plus optimale. Le taux de perfusion spécifique minimum obtenu pour chaque culture est $\approx 0.020, 0.017$ et $0.023 \text{ nL/cellule/j}$.

Enfin, la viabilité cellulaire est restée supérieure à 80 % tout au long des cultures, à l'exception de la condition P50, qui a présenté une chute ponctuelle de viabilité au jour 15. Les cultures ont été maintenues pendant 21 jours à l'exception de P25 qui a dû être arrêtée plus tôt en raison d'une erreur de manipulation (17 jours).

TABLEAU 3.3 Effet de la perfusion sur la croissance et la productivité.

	P100	P50	P25
μ avant induction (h^{-1})	0.031	0.029	0.030
VCD_{\max} (10^6 cellules/mL)	45	29	13
IVCC (10^6 cellules·j/mL)	479	299	129
q_P^{moy} (pg/cellule·j)	20.65	18.69	19.44
Durée de culture (j)	21	21	17

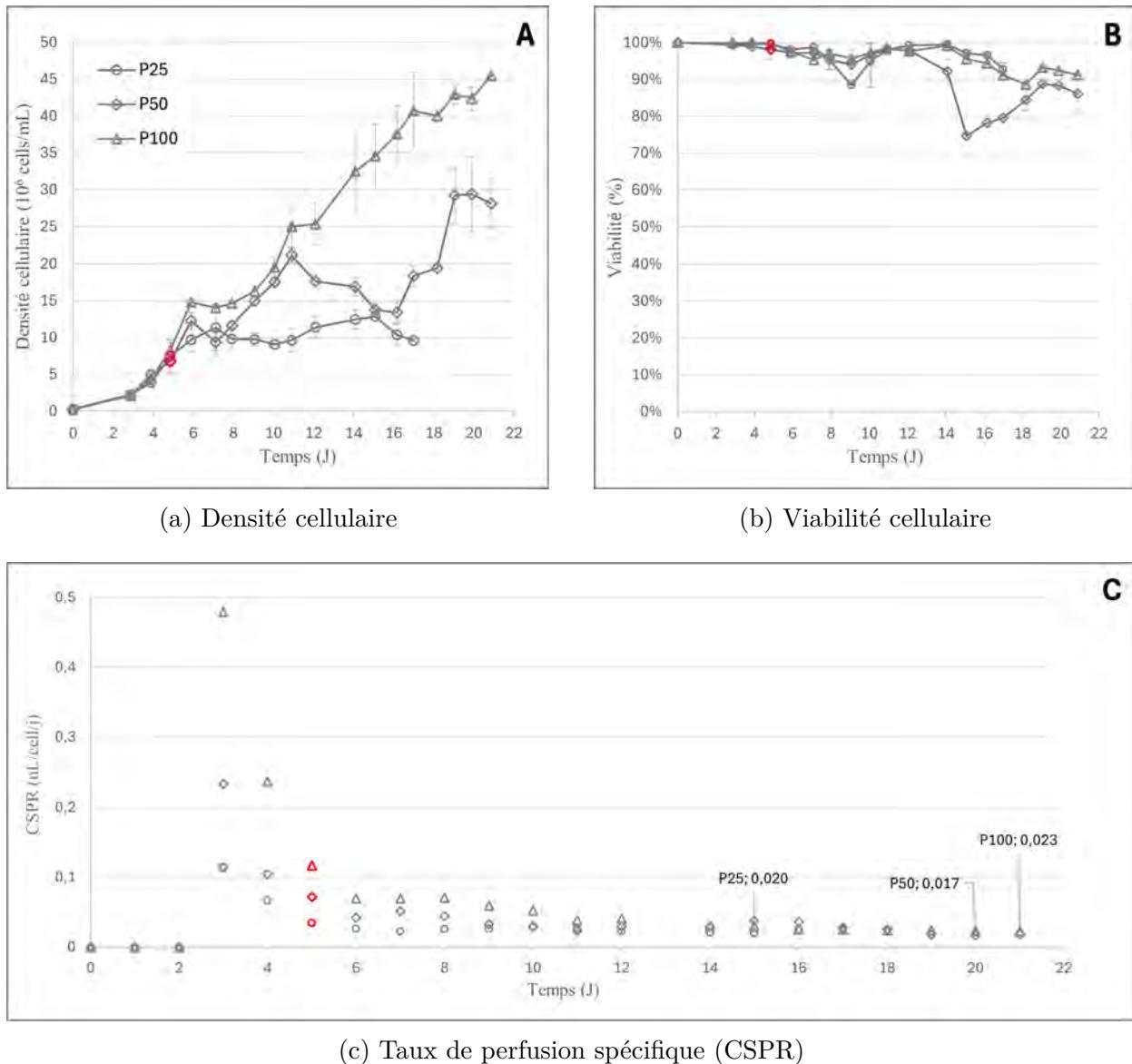


FIGURE 3.7 Résultats campagne 1 expérience 2 : Croissance cellulaire et taux de perfusion spécifique (CSPR) en fonction du taux de perfusion, 25% (rond), 50% (losange), 100% (triangle). Le marqueur en rouge indique le jour d'induction et la diminution de la température. Les barres d'erreurs indiquent l'écart type (SD) sur la mesure par duplicita.

Les profils de concentration en glucose (figure 3.8a) présentent une décroissance similaire dans toutes les conditions, soulignant le besoin d'une méthode de régulation supplémentaire, en particulier au-delà de 14 jours. Le prolongement des cultures aurait probablement conduit à un manque de glucose et causé la mort cellulaire. P50 présente une variation de glucose ralentie lorsque sa viabilité a chuté. La consommation spécifique en glucose (voir figure 3.8b) montre une activité métabolique intense en début de culture, plus durable en perfusion, notamment pour P25 comme observé précédemment.

En ce qui concerne le lactate (voir figures 3.5c et 3.5d), une accumulation est observée dans toutes les cultures. La perfusion a permis de limiter la concentration maximale atteinte pour P50 et P100. Après le pic, une phase de reconsommation apparaît pour P25, indiquant un changement métabolique. Pour P50 et P100, bien que la production diminue, le lactate n'est véritablement reconsommé qu'en fin de culture.

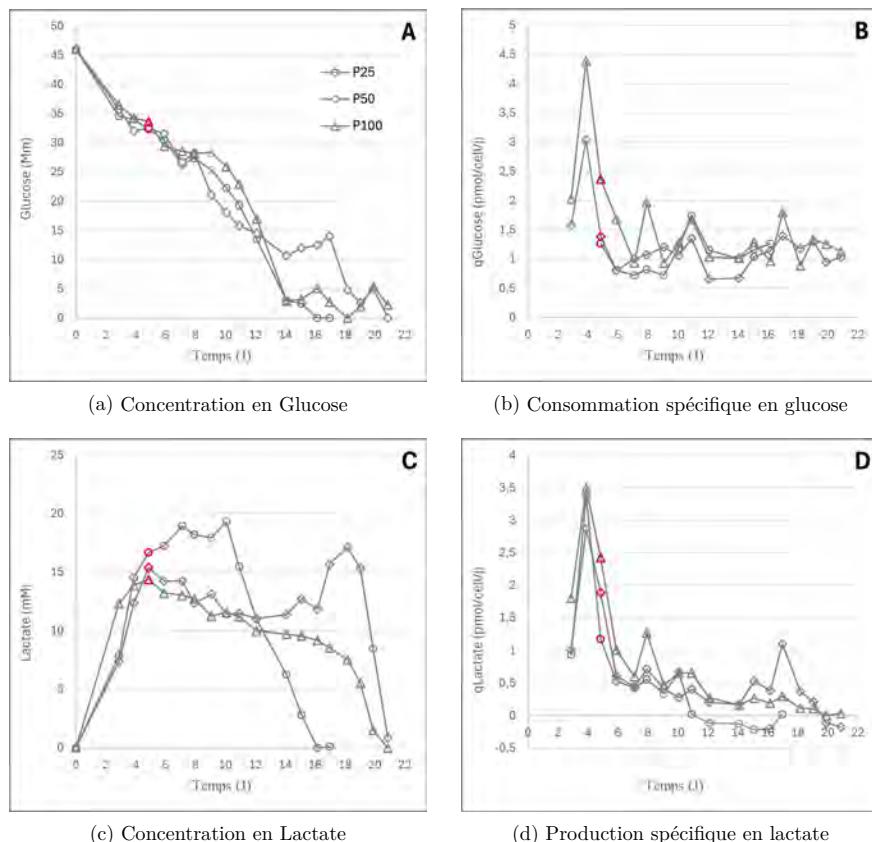


FIGURE 3.8 Résultats campagne 1 expérience 2 : (a), (b) : Concentration et consommation spécifique en glucose. SD : $\pm 0,05$ mmol/L. (c), (d) : Concentration et production spécifique en lactate. SD : $\pm 0,02$ mmol/L. Ceci en fonction du taux de perfusion. 25% (rond), 50% 2M (losange), 100% (triangle). Les marqueurs en rouge indiquent le jour d'induction et la diminution de la température.

Les profils de production (voir figures 3.9a et 3.9c) montrent une nette influence de la perfusion. P25 présente une accumulation de protéine supérieure aux autres en raison d'un retrait de protéine plus faible. P50 et P100 présentent une courbe similaire, mais P100 ayant une perfusion bien plus élevée, on en déduit que la quantité produite est bien supérieure à P50, ce qui est confirmé par le titre total. Peu importe le taux de perfusion, qP est similaire entre les différentes conditions. Cela indique que la densité cellulaire fait la différence sur la production totale. Cependant, le gain en densité cellulaire et IVCC observé pour la condition P100 se fait au détriment de la production spécifique. Le taux spécifique mesuré est de 20,65 pg/cell/j, soit près de deux fois inférieur à ceux obtenus pour P1 et P2 (37 et 40 pg/cell/j respectivement) lors de l'expérience précédente, et ce, pour un même taux de perfusion.

Au final, P100 atteint une production d'environ 250 mg, soit trois fois plus que P50 sur une même durée de culture, et environ 30% de plus que dans l'expérience 1 (figure 3.6c) malgré un taux de perfusion et une induction identiques. La stratégie d'alimentation semble donc plus efficace.

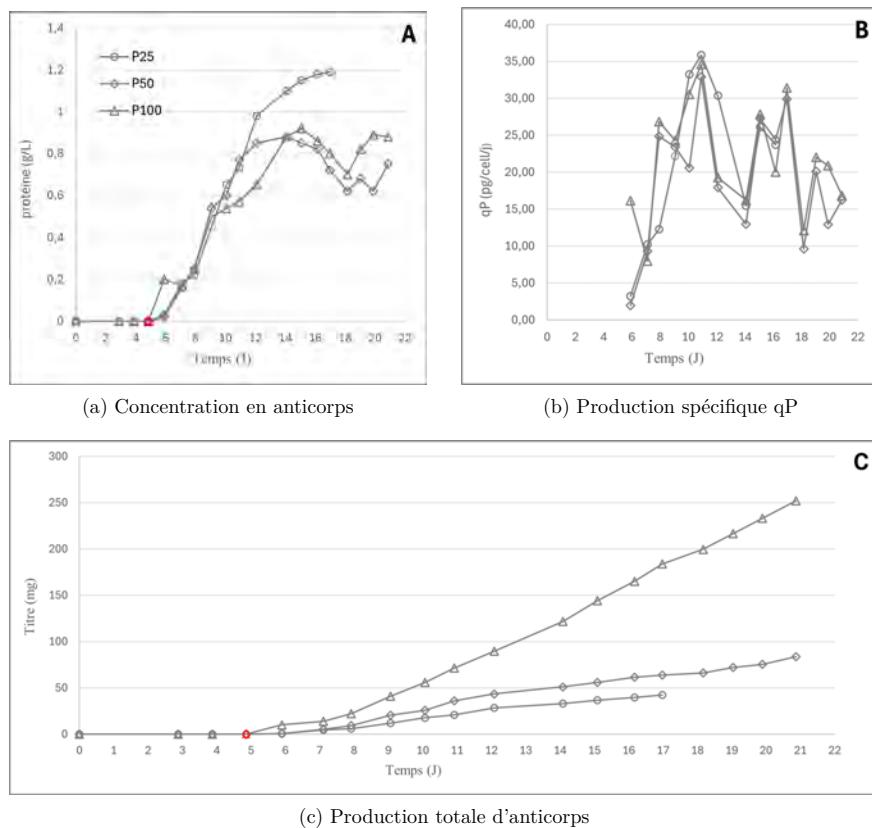


FIGURE 3.9 Résultats campagne 1 expérience 2 : (a), (b) : Concentration et production spécifique en anticorps. SD : $\pm 0,01$ g/L. (c) : Production totale en anticorps sur toute la culture. Ceci en fonction du taux de perfusion. 25% (rond), 50%-2M (losange), 100%- (triangle). Les marqueurs en rouge indiquent le jour d'induction et la diminution de la température.

3.3 Seconde campagne : taux de perfusion spécifique fixe et montée en échelle

L'objectif de cette campagne est d'optimiser la stratégie de perfusion à faible taux (≤ 1 RV) testée précédemment, et de réaliser la montée en échelle en bioréacteur. Un taux de perfusion spécifique (CSPR) est défini sur la base des résultats précédemment obtenus. Cette approche permet de tenir compte de l'évolution de la biomasse au cours du temps, évitant ainsi une suralimentation en début de culture ou, au contraire, une sous-alimentation aux densités cellulaires élevées. De plus, l'alimentation est ajustée de manière similaire selon un taux par cellule, afin de garantir un apport nutritif cohérent et maîtrisé tout au long de la culture.

Ce mode hybride présente l'avantage de dissocier le renouvellement du milieu et l'apport nutritif. Il permet ainsi de contrôler finement l'environnement cellulaire tout en s'ajustant à la concentration croissante.

3.3.1 Paramètres étudiés

Expériences 1, 2 et 3

La première et la seconde expérience étudient l'effet d'une perfusion à CSPR fixe et à faible taux spécifique dans l'objectif de déterminer un taux optimal et de comparer les résultats avec les taux fixes précédemment testés.

Deux conditions de CSPR sont évaluées : **1-P025**, **2-P025** et **1-P010**, **2-P010** correspondant respectivement à un CSPR de 0,025 et 0,010 nL/cell/j. Un contrôle en Fed-batch est également réalisé : **2-FB**.

La troisième expérience a pour objectif de réaliser la montée en échelle du procédé en bioréacteur et d'évaluer les performances de production avec un régime d'alimentation et de perfusion identiques. Les conditions sont nommées : **U1-FB** et **U2-P025**.

Pour chacune des conditions, la perfusion est initiée à partir d'une concentration de 2×10^6 cellules/mL. Le régime d'alimentation appliqué est de $3,75 \times 10^{-7}$ μ L/cell/j. Le contrôle de la concentration en glucose est assuré par l'ajout de glucose concentré. Les cultures sont inoculées à une densité cellulaire initiale de $0,4 \times 10^6$ cellules/mL

Pour l'expérience 1, l'induction est réalisée lorsque la concentration cellulaire atteint 25×10^6 cellules/mL pour l'une des cultures. En revanche, pour les expériences 2 et 3, l'induction des cultures en perfusion a lieu au septième jour de culture, lorsque la concentration atteint respectivement 30×10^6 cellules/mL pour 2-P025 et 18×10^6 cellules/mL pour U2-P025. Pour les cultures en fed-batch, l'induction est réalisée au cinquième jour de culture, à 12×10^6 cellules/mL pour 2-FB et $7,2 \times 10^6$ cellules/mL pour U1-FB.

Ces conditions sont résumées dans le tableau 3.4.

TABLEAU 3.4 Conditions expérimentales testées pour la seconde campagne (expériences 1 à 3)

Expérience 1			Expérience 2			
	1-P025	1-P010		2-P025	2-P010	2-FB
Feed ($\mu\text{L}/\text{cell} \cdot \text{j}$)	$3,75 \times 10^{-7}$	$3,75 \times 10^{-7}$	Feed ($\mu\text{L}/\text{cell} \cdot \text{j}$)	$3,75 \times 10^{-7}$	$3,75 \times 10^{-7}$	$3,75 \times 10^{-7}$
Perfusion (nL/cell · j)	0,025	0,010	Perfusion (nL/cell · j)	0,025	0,010	0
Induction (cell/mL)	25M (j9)	14M (j9)	Induction (cell/mL)	30M (j7)	18M (j7)	12M (j5)

Expérience 3		
	U2-P025	U1-FB
Feed ($\mu\text{L}/\text{cell} \cdot \text{j}$)	$3,75 \times 10^{-7}$	$3,75 \times 10^{-7}$
Perfusion (nL/cell · j)	0,025	0
Induction (cell/mL)	18M (j7)	7.2M (j5)

3.3.2 Résultats

Expérience 1

Les résultats concernant le suivi de la biomasse au cours de la culture pour 1-P025, 1-P010 sont reportés à la figure 3.10.

L'induction a été réalisée au jour 9 pour l'ensemble des cultures. Après induction, la concentration cellulaire s'est stabilisée. Par ailleurs, le taux de croissance cellulaire spécifique moyen avant induction est supérieur pour 1-P025, avec une valeur de $0,020 \text{ h}^{-1}$ contre $0,016 \text{ h}^{-1}$ pour 1-P010 (tableau 3.5). La phase de croissance exponentielle n'a pas pu être maintenue pendant 9 jours pour 1-P010, contrairement à 1-P025.

La culture au taux plus élevé a atteint une densité cellulaire significativement plus élevée que 1-P010. La densité cellulaire maximale atteinte a été de 28×10^6 cellules/mL pour la condition 1-P025 (tableau 3.5), soit 1,6 fois inférieure à celle de P100 lors de l'expérience 1, et similaire à P50. En comparaison, 1-P010 a atteint 17×10^6 cellules/mL. Le CSPR impacte significativement la concentration cellulaire maximale et l'IVCC. Cette méthode permet de maintenir la croissance exponentielle en début de culture tout en utilisant un volume de perfusion réduit par rapport aux conditions précédentes (0.1-0.2 RV et jusqu'à 0.7 RV).

Enfin, la viabilité cellulaire est restée supérieure à 80 % tout au long de la culture pour la condition 1-P025. En revanche, pour la condition 1-P010, la viabilité a chuté de manière constante dès le pic de concentration cellulaire. Ceci est probablement dû à un apport nutritif insuffisant pour maintenir la concentration atteinte. Les cultures ont été maintenues pendant 21 jours.

TABLEAU 3.5 Effet du taux de perfusion spécifique sur la croissance et la productivité

	1-P025	1-P010
μ avant induction (h^{-1})	0.020	0.016
VCD_{\max} (10^6 cellules/mL)	28	17
IVCC (10^6 cellules·j/mL)	368	179
q_P^{moy} (pg/cellule/j)	30.47	32.83
Durée de culture (j)	21	21

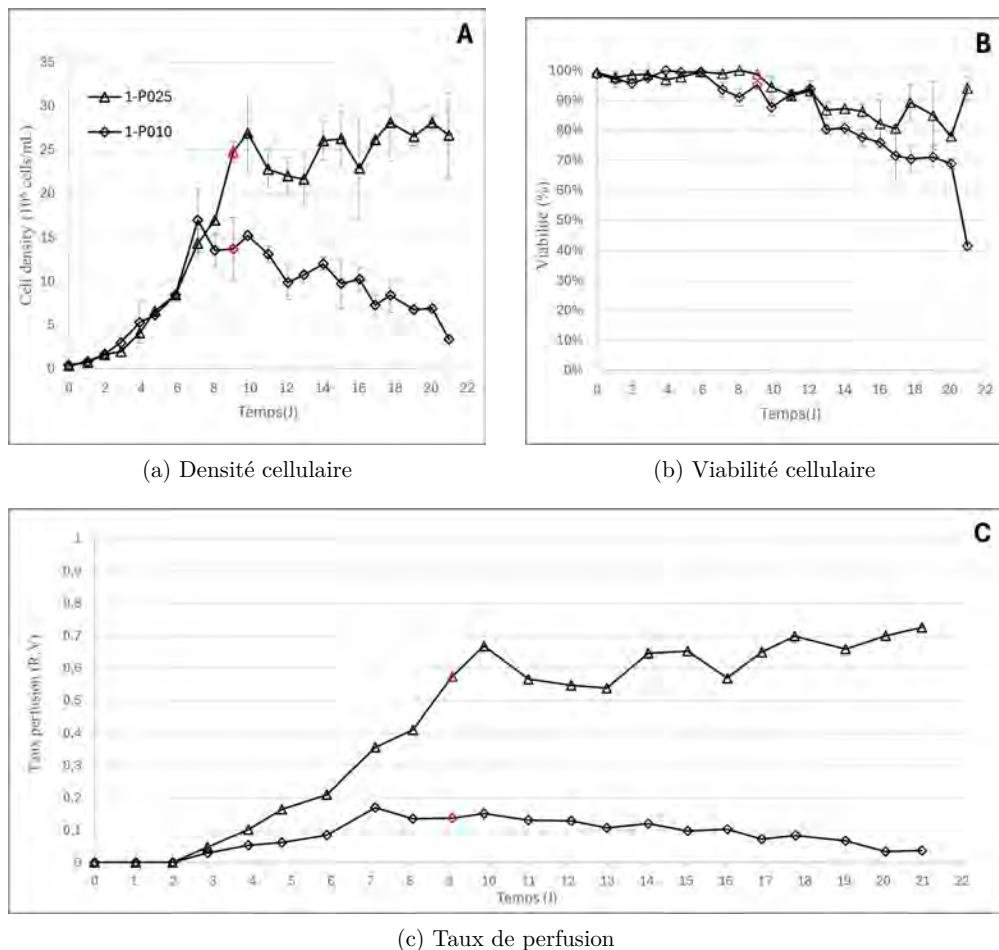


FIGURE 3.10 Résultats campagne 2 expérience 1 : Croissance cellulaire et taux de perfusion en fonction du taux de perfusion spécifique (0.025 (Triangle) 0.010 (Losange) $\text{nL}/\text{cell} \cdot \text{j}$). Le marqueur en rouge indique le jour d'induction et la diminution de la température. Les barres d'erreurs indiquent l'écart type (SD) sur la mesure par duplicata.

Les profils de concentration en glucose (figure 3.11a) présentent une décroissance similaire pour les deux conditions. La stratégie d'alimentation en glucose permet d'éviter la déplétion tout en maintenant une concentration faible. La consommation spécifique en glucose (figure 3.11b) montre une activité métabolique intense en début de culture, suivie d'une stabilisation autour de 1 pmol/cellule/jour. Les deux conditions suivent une tendance similaire.

Concernant le lactate (figures 3.11c et 3.11d), une accumulation rapide est observée pendant les quatre premiers jours de culture. Le lactate est ensuite rapidement reconsummé, indiquant un changement métabolique, jusqu'à sa déplétion complète. Pour la condition 1-P025, un ajout excessif de glucose a entraîné une nouvelle production de lactate, avec l'apparition d'un second pic, suivi à nouveau d'une phase de reconsummation.

La concentration en ammoniac (figure 3.11e) est identique pour les deux conditions jusqu'au jour 12. Le taux de perfusion permet à 1-P025 de maintenir une concentration plus faible, malgré une concentration cellulaire plus élevée, jusqu'à la fin de la culture. La production spécifique d'ammoniac, q_{NH_3} (figure 3.11f), est similaire pour les deux conditions, bien qu'elle soit légèrement supérieure pour la condition 1-P025.

Les profils de production (voir figures 3.12a et 3.12c) montrent une nette influence de la perfusion. Les deux cultures présentent initialement un profil de concentration similaire, malgré une densité cellulaire bien plus élevée pour la condition 1-P025. La perfusion a donc permis de maintenir des concentrations de produit raisonnables tout en augmentant la capacité de production, ce qui est attendu. L'augmentation de la densité cellulaire combinée à la diminution du taux de production spécifique entraîne une réduction de la concentration de protéine en fin de culture pour 1-P025. À l'inverse, la condition 1-P010 montre une accumulation de protéine jusqu'en fin de culture. Dans ce cas, le faible taux de perfusion ne suffit pas à prévenir l'accumulation de protéines dans le milieu. Néanmoins, en fin de culture, la diminution du taux de production spécifique (comme dans la condition précédente) entraîne un ralentissement de l'accumulation, jusqu'à l'arrêt complet lié à la mort cellulaire.

La production spécifique quotidienne (voir figure 3.12b) de 1-P010 est similaire à celle de 1-P025 tout au long de l'expérience, avec une moyenne de 32,83 pg/cellule/jour contre 30,47 pg/cellule/jour durant la phase de production. Le déclin observé dans la production spécifique au cours des deux cultures pourrait être attribué à l'accumulation de produit et de métabolites, dont le NH₃, qui atteint des concentrations de 4 et 5,49 mM respectivement, malgré la perfusion. En comparaison avec la campagne 1, les q_P moyens observés sont plus élevés. Cela peut refléter des conditions de culture plus optimales, mais également résulter d'une durée de production plus courte, ne laissant pas le temps à la production spécifique d'entrer en phase de déclin (12 jours vs 16 jours).

Au final, la condition 1-P025 a permis d'atteindre une production d'environ 250 mg, soit environ 2,7 fois plus que la condition 1-P010. Ce résultat est comparable à celui obtenu avec P100 lors de la première campagne, alors même que les volumes de perfusion et d'alimentation utilisés sont nettement inférieurs ainsi qu'une durée de production plus courte.

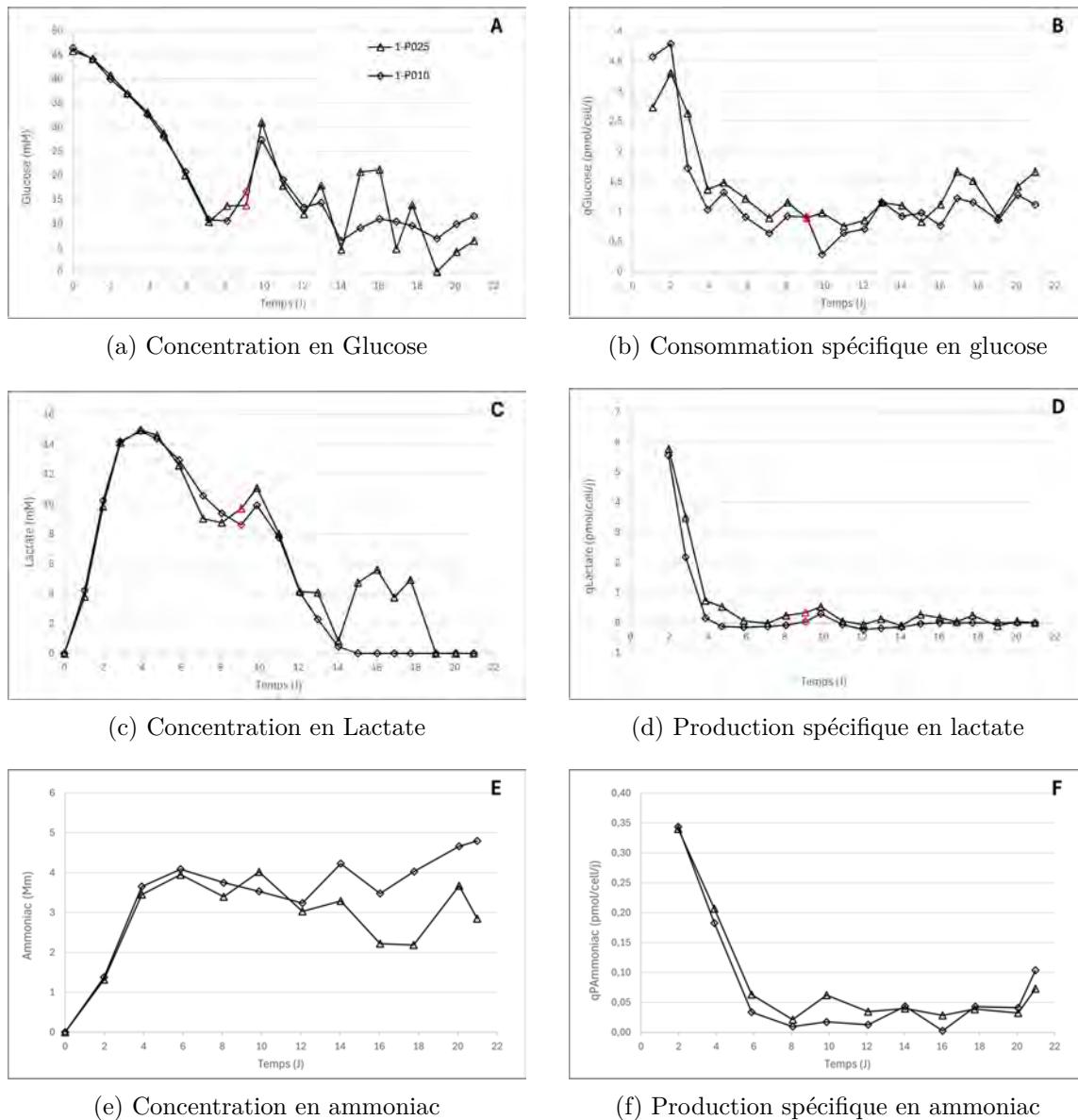


FIGURE 3.11 Résultats campagne 2 expérience 1 : (a), (b) : Concentration et consommation spécifique en glucose. SD : $\pm 0,05$ mmol/L. (c), (d) : Concentration et production spécifique en lactate. SD : $\pm 0,02$ mmol/L. (e), (f) : Concentration et production spécifique en ammoniac. SD : $\pm 0,01$ mmol/L. Ceci en fonction du taux de perfusion spécifique : (0.025 (Triangle) 0.010 (Losange) nL/cell · j. Les marqueurs en rouge indiquent le jour d'induction et la diminution de la température.

Ces résultats soulignent l'efficacité de la stratégie d'intensification mise en place, dans laquelle les flux d'alimentation et de perfusion sont ajustés proportionnellement à la densité cellulaire via un taux prédéfini. Cette approche permet d'accompagner la croissance tout en optimisant les apports, menant à des rendements élevés avec une consommation réduite de milieu. Ils confirment également l'observation faite lors de la campagne précédente : retarder l'induction afin d'atteindre une densité cellulaire plus élevée permet d'obtenir de meilleurs rendements, et ce, pour une durée de culture identique. Cela démontre la faisabilité d'une intensification efficace en conditions de perfusion à bas taux, offrant un compromis intéressant entre performance et consommation de ressources.

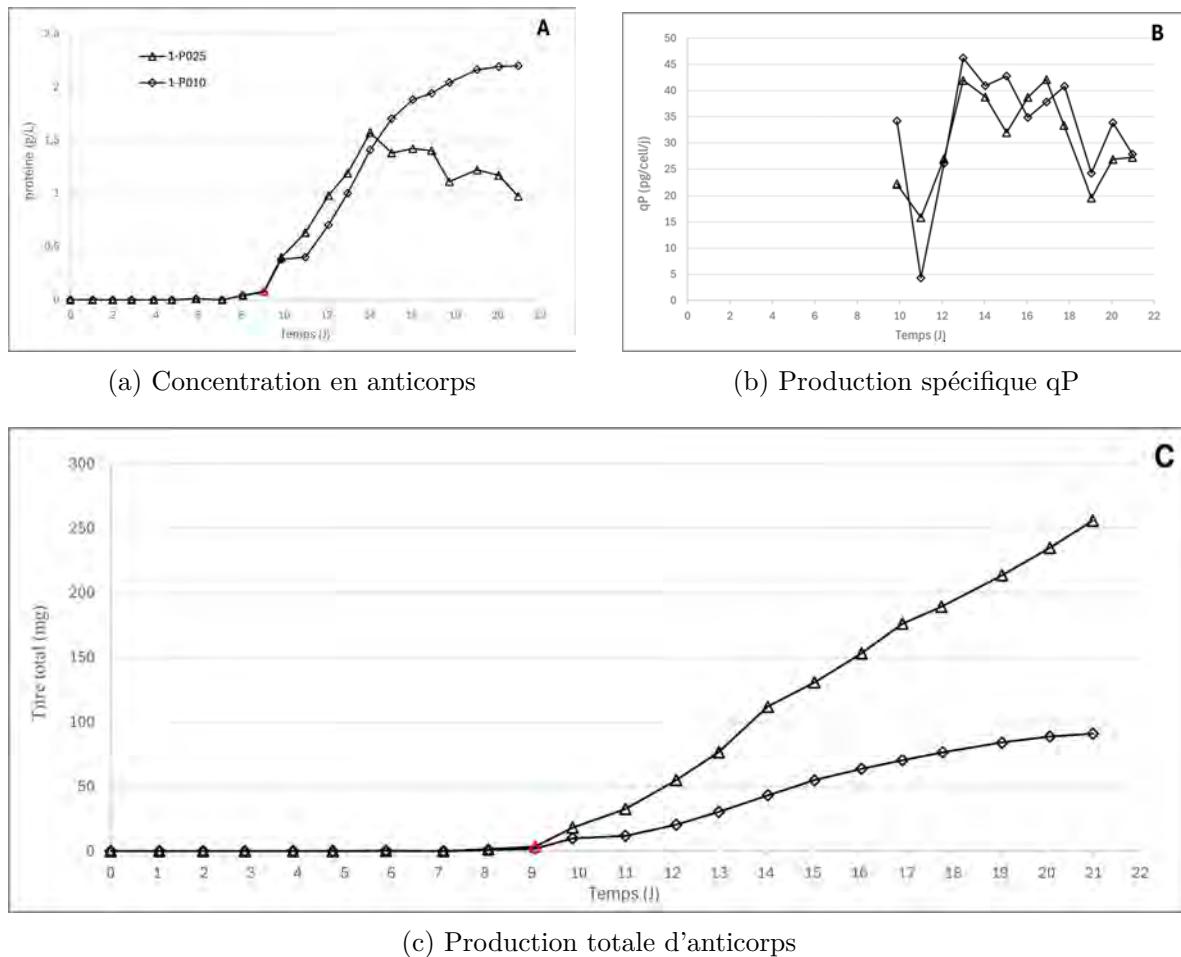


FIGURE 3.12 Résultats campagne 2 expérience 1 : (a), (b) : Concentration et production spécifique en anticorps. SD : $\pm 0,01$ g/L. (c) : Production totale en anticorps sur toute la culture. Ceci en fonction du taux de perfusion spécifique : (0.025 (Triangle) 0.010 (Losange) nL/cell · j. Les marqueurs en rouge indiquent le jour d'induction et la diminution de la température.

Expérience 2 et 3

Les résultats concernant le suivi de la biomasse au cours de la culture pour les flasques 2-P025, 2-P010 et 2-FB ainsi que pour les bioréacteurs U1-FB et U2-P025 sont reportés à la figure 3.13.

L'induction a été réalisée au jour 7 pour les cultures en perfusion et au jour 5 pour les cultures en fed-batch.

Concernant les flasques, après induction, la concentration cellulaire s'est stabilisée pour la condition 2-P025, tandis qu'une chute a été observée pour les autres conditions. Par ailleurs, le taux de croissance cellulaire spécifique moyen avant induction (tableau 3.6) est similaire en perfusion, avec des valeurs de $0,023 \text{ h}^{-1}$ et $0,024 \text{ h}^{-1}$ et plus élevé en FB à $0,027 \text{ h}^{-1}$. La phase de croissance exponentielle est donc légèrement ralentie, 9 jours contre 5 jours en mode Fed-batch. En bioréacteur, la concentration cellulaire n'a pas pu être maintenue après l'induction, quelle que soit la condition testée. De plus, les taux spécifiques de croissance observés ($\mu = 0,022$ et $0,023 \text{ h}^{-1}$) sont inférieurs à ceux obtenus en flasques.

En flasque, la tendance des profils de densité cellulaire est très similaire à celle observée lors de l'expérience 1, ce qui est attendu. Toutefois, les densités maximales atteintes sont plus élevées. La densité cellulaire maximale a été de 40×10^6 cellules/mL pour la condition 2-P025 (tableau 3.5), soit 1,6 fois supérieure à celle de 2-P010, et 1,4 fois supérieure à celle de 1-P025 pour des conditions identiques. La culture en flasque 2-FB a également présenté une densité cellulaire élevée, atteignant $16,5 \times 10^6$ cellules/mL, soit 4,3 fois plus que lors de la première campagne, grâce au régime d'alimentation utilisé. L'atteinte rapide de la concentration maximale avant induction a permis d'optimiser l'IVCC pour toutes les cultures.

En bioréacteur, les profils de concentration cellulaire sont significativement inférieurs à conditions équivalentes, avec $20,3 \times 10^6$ cellules/mL pour U2-P025 et $10,2 \times 10^6$ cellules/mL pour U1-FB, soit respectivement 2 fois et 1,6 fois moins qu'en flasque. L'effet de la perfusion reste néanmoins notable, avec une concentration cellulaire environ deux fois plus élevée en condition perfusée (U2-P025) qu'en fed-batch (U1-FB).

Enfin, en flasque la viabilité cellulaire a pu être maintenue au-dessus de 80 % pendant 10 jours pour la condition 2-FB et pendant 13 jours pour les cultures en perfusion. Les conditions FB et 2-P010 présentent ensuite une chute rapide de la viabilité, atteignant 20 à 30 %, tandis que la condition 2-P025 se stabilise autour de 60 à 70 %. Au contraire, la viabilité a chuté rapidement en bioréacteur pour U1-FB et U2-P025, de manière similaire malgré la perfusion. Elle n'a pu être maintenue au-dessus de 80 % que pendant une dizaine de jours.

Ces résultats confirment que le taux de perfusion de 0,01 nL/cellule/jour, associé au régime

d'alimentation utilisé, n'est pas suffisant pour maintenir une viabilité élevée sur une longue durée, comme observé précédemment.

La condition 2-P025 semble avoir atteint les limites du système de culture tel que défini dans cette étude. Bien que la densité cellulaire maximale ait été significativement plus élevée que dans l'expérience précédente, cette surperformance initiale s'est accompagnée d'une chute rapide de la viabilité. Ce phénomène pourrait résulter de l'accumulation des métabolites, en particulier l'ammoniac (voir 3.14), d'un appauvrissement en nutriments, ou encore d'une limitation en oxygène, particulièrement critiques à forte densité cellulaire. Les cultures ont été maintenues 14 (FB) et 21 (perfusion) jours .

La montée en échelle vers le bioréacteur donne des résultats mitigés. Bien que l'effet de la perfusion reste notable, permettant de doubler la densité cellulaire maximale par rapport au mode Fed-batch, ces conditions ne permettent pas de maintenir une viabilité élevée sur la durée (seulement trois jours de plus qu'en Fed-batch). Par ailleurs, en comparaison avec les expériences précédentes en flasques agitées, les performances observées en bioréacteur restent nettement inférieures. Cette différence pourrait s'expliquer par des contraintes spécifiques au système à plus grande échelle, telles qu'un stress hydrodynamique accru ou une distribution moins homogène des nutriments et de l'oxygène, malgré le contrôle du pH et de la DO.

TABLEAU 3.6 Effet du taux de perfusion spécifique sur la croissance et la productivité en flasque et bioréacteur.

	2-P025	2-P010	2-FB	U2-P025	U1-FB
μ avant induction (h^{-1})	0.024	0.023	0.027	0.022	0.023
VCD_{\max} (10^6 cellules/mL)	40	24.5	16.5	20.3	10.2
IVCC (10^6 cellules·j/mL)	488	250	121	155	82.6
q_P^{moy} (pg/cellule·j)	26.76	21.06	17.33	22.21	22.16
Durée de culture (j)	21	21	14	16	13

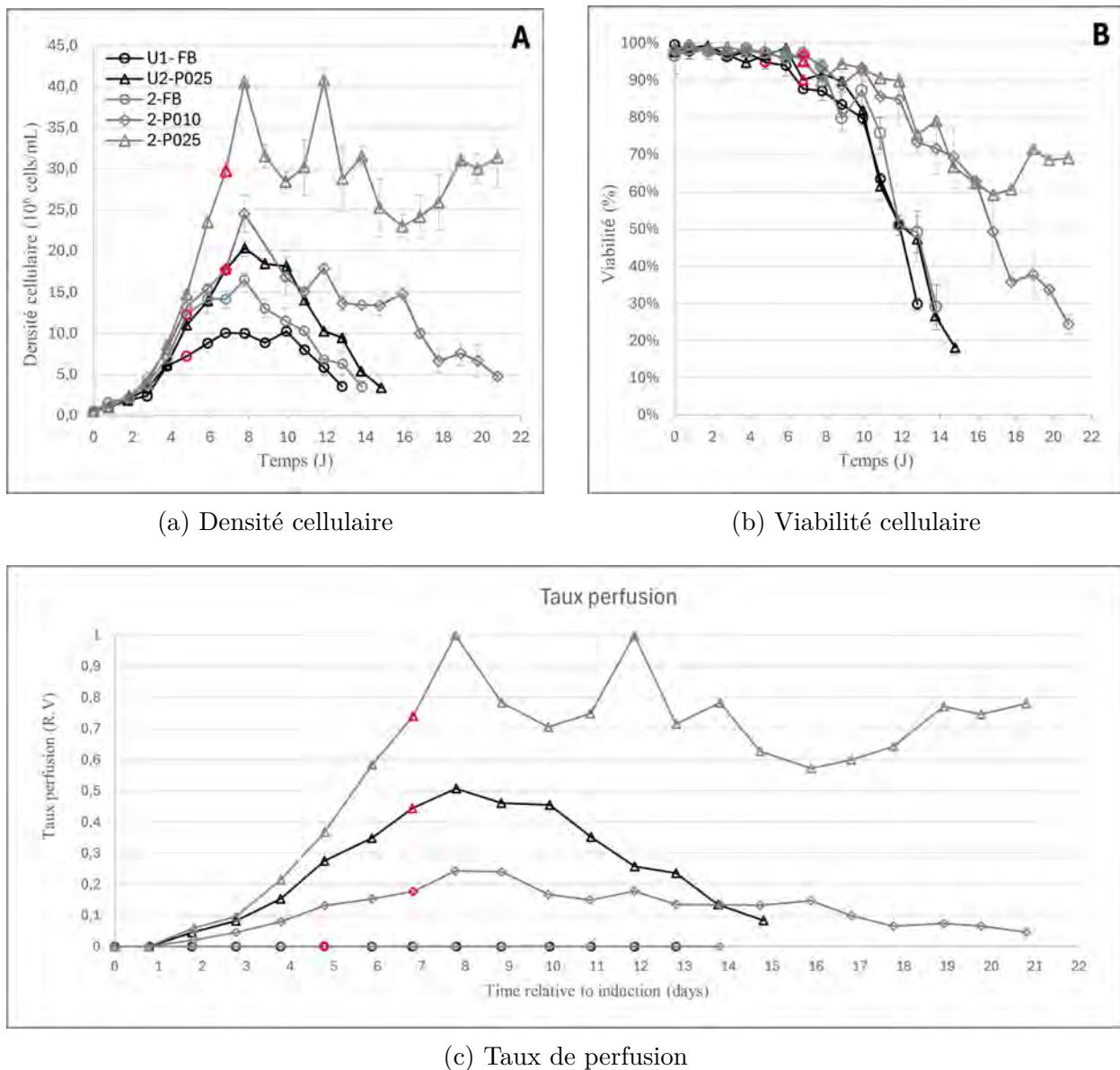


FIGURE 3.13 Résultats campagne 2 expérience 2 : Croissance cellulaire et taux de perfusion en fonction du taux de perfusion spécifique (0 (Rond), 0,025 (Triangle), 0,010 (Losange) $\text{nL}/\text{cell} \cdot \text{j}$). En gris les flasques et en noir les bioréacteurs. Le marqueur en rouge indique le jour d'induction et la diminution de la température. Les barres d'erreurs indiquent l'écart type (SD) sur la mesure par duplicita.

En flasques, les profils de concentration en glucose (figure 3.14a) sont similaires à ceux observés lors de l'expérience précédente. Toutefois, la consommation est plus rapide en raison d'une densité cellulaire plus élevée. En bioréacteur, malgré une densité cellulaire inférieure, la consommation de glucose est légèrement plus rapide, tout en présentant un profil globalement similaire.

Par moments, la stratégie d'alimentation mise en place pour la condition 2-P025 s'est révélée insuffisante, notamment en fin de culture, en lien avec l'augmentation du q_{glc} . La consommation spécifique en glucose (figure 3.14b) suit également la même tendance que l'expérience 1. Elle révèle une activité métabolique intense en début de culture, suivie d'une stabilisation autour de 0,5 pmol/cellule/jour pour la condition FB et de 1 pmol/cellule/jour pour les cultures en perfusion, avant d'augmenter pour atteindre jusqu'à 1,5 pmol/cellule/jour en fin de culture pour la condition 2-P025. À nouveau, en bioréacteur, les profils de consommation restent similaires, mais la consommation spécifique de glucose est plus élevée, en particulier en début et en fin de culture.

Concernant le lactate en flasques (figures 3.14c et 3.14d), une tendance similaire à celle observée lors de l'expérience 1 est retrouvée. Pour la condition 1-P025, une seconde production de lactate, moins marquée, est également observée, avec l'apparition d'un second pic suivi d'une nouvelle phase de reconsommation, probablement liée à une concentration de glucose plus élevée. Pour la condition fed-batch, la reconsommation est plus rapide, accompagnée de taux de consommation spécifique plus élevés. En bioréacteur, la production spécifique de lactate est plus importante en début de culture, menant à des concentrations maximales environ 1,7 fois plus élevées : 24,1 mM (U2-P025) et 23 mM (U1-FB), contre 13,72 mM (U2-P025) et 13,99 mM (2-FB). Pour la condition Fed-batch, la reconsommation spécifique du lactate est nettement plus élevée, permettant son élimination complète du milieu. À l'inverse, pour U2-P025, une reconsommation partielle est observée, suivie d'un nouveau pic de production, similaire à celui observé en flasque mais à une concentration environ deux fois plus élevée également probablement liée à une concentration de glucose plus élevée.

La concentration en ammoniac (figure 3.11e) suit également une tendance similaire à celle observée précédemment. Le taux de perfusion permet, une fois encore, aux conditions 2-P025 et U2-P025 de maintenir une concentration plus faible que les conditions 2-P010, 2-FB et U1-FB, et ce, malgré une densité cellulaire plus élevée, jusqu'à la fin de la culture. Pour 2-P025, cette concentration varie entre 2,5 et 4 mM du jour 8 au jour 21, et correspond à la concentration finale observée en condition Fed-batch. En bioréacteur, pour la condition U2-P025, la concentration en ammoniac reste stable autour de 3 mM. Cette concentration plus faible est probablement due à la densité cellulaire inférieure.

La production spécifique quotidienne d'ammoniac, q_{NH_3} (figure 3.11f), est supérieure pour la condition 2-P025, comparée à 2-FB et 2-P010. Il en va de même pour la condition U2-P025, dont les valeurs dépassent celles observées pour U1-FB. Ces résultats suggèrent qu'un taux de perfusion plus élevé pourrait conduire à une production spécifique accrue d'ammoniac.

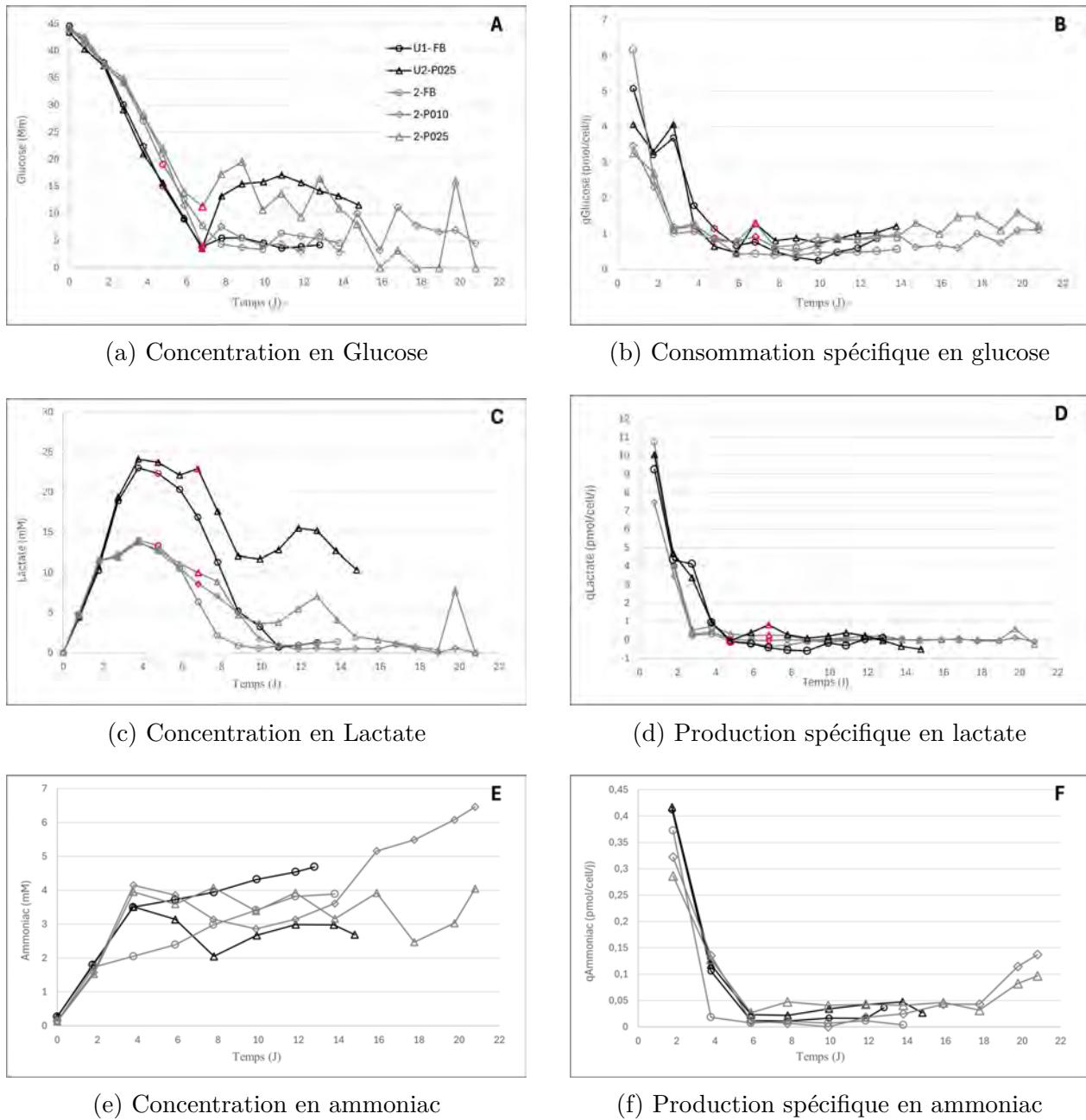


FIGURE 3.14 Résultats campagne 2 expérience 2 : (a), (b) : Concentration et consommation spécifique en glucose. SD : $\pm 0,05$ mmol/L. (c), (d) : Concentration et production spécifique en lactate. SD : $\pm 0,02$ mmol/L. Concentration et production spécifique en ammoniac. SD : $\pm 0,01$ mmol/L. Ceci en fonction du taux de perfusion spécifique : (0 (Rond), 0.025 (Triangle), 0.010 (Losange) nL/cell · j. En gris les flasques et en noir les bioréacteurs. Les marqueurs en rouge indiquent le jour d'induction et la diminution de la température.

Les profils de production (voir figures 3.15) sont également très similaires à ceux observés lors de l'expérience 1 pour les flasques. Les deux cultures en perfusion présentent initialement un profil de concentration comparable, malgré une densité cellulaire nettement plus élevée pour la condition 2-P025, ce qui montre à nouveau que la perfusion a permis de maintenir des concentrations de produit raisonnables tout en augmentant la capacité de production. Les concentrations maximales atteintes sont respectivement de 1,44 g/L, 2,24 g/L et 1,73 g/L pour les conditions 2-P025, 2-P010 et FB. L'augmentation de la densité cellulaire, combinée à une diminution du taux de production spécifique, contribue à limiter l'accumulation de protéine en fin de culture pour 2-P025. À l'inverse, la baisse de viabilité et le faible taux de perfusion observés pour 2-P010 entraînent une accumulation de protéine dans le milieu, atteignant une concentration finale proche de celle mesurée en FB (1,8 g/L). En réacteur, le profil de concentration observé en condition Fed-batch est similaire à celui obtenu en flasque, malgré une densité cellulaire plus faible. Cela s'explique par une production spécifique plus élevée. À l'inverse, la condition U2-P025 présente un profil de concentration inférieur, limité par sa densité cellulaire plus basse.

La production spécifique quotidienne (voir figure 3.15b) de la condition 2-P010 est similaire à celle de 2-P025 pendant les 14 premiers jours, avant de chuter drastiquement pour 2-P010. La moyenne observée durant la phase de production est de 26,76 pg/cellule/jour pour 2-P025 contre 21,06 pg/cellule/jour pour 2-P010. Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus lors de l'expérience 1 (30,47 et 32,83 pg/cellule/jour), suggérant à nouveau qu'une concentration cellulaire plus élevée peut induire une diminution du taux spécifique de production. Le déclin observé en fin de culture dans la production spécifique pourrait être attribué à l'accumulation de produit et de métabolites, notamment de NH_3 , dont les concentrations atteignent respectivement 4,16 mM et 6,15 mM, malgré la mise en œuvre de la perfusion. En réacteur Fed-batch, des taux spécifiques nettement plus élevés sont observés en début de culture, avant de suivre progressivement la même tendance que la condition 2-FB. Ainsi le taux moyen est plus élevé (22,16 contre 17,33 pg/cellule/jour en flasque). Pour la condition U2-P025, les taux spécifiques restent similaires à ceux mesurés en flasque, bien qu'une diminution soit observée en fin de culture, probablement liée à la perte de viabilité significative observée. Le taux moyen est donc légèrement inférieur (22,21 contre 26,76 pg/cellule/jour en flasque).

Au final, la condition 2-P025 a permis d'atteindre une production totale de 282 mg, soit environ 2,5 fois plus que la condition 2-P010 et 6,5 fois plus que la condition FB. Ce résultat est supérieur à celui obtenu lors de l'expérience précédente pour une durée de culture identique. Toutefois, l'induction a été réalisée deux jours plus tôt pour 2-P025 en comparaison à 1-P025.

En comparant les deux expériences en flasques sur une durée de production identique (12 jours), le titre total obtenu est de 256 mg pour 1-P025 contre 252 mg pour 2-P025. Malgré une densité cellulaire et un IVCC plus élevés pour 2-P025, la baisse de production spécifique compense cet avantage, conduisant à un rendement total équivalent entre les deux expériences.

Concernant les bioréacteurs, la production totale obtenue en perfusion atteint 885 mg pour U2-P025, contre 618 mg pour U1-FB. Ainsi, la stratégie de perfusion a permis d'augmenter le rendement global d'un facteur 1,4.

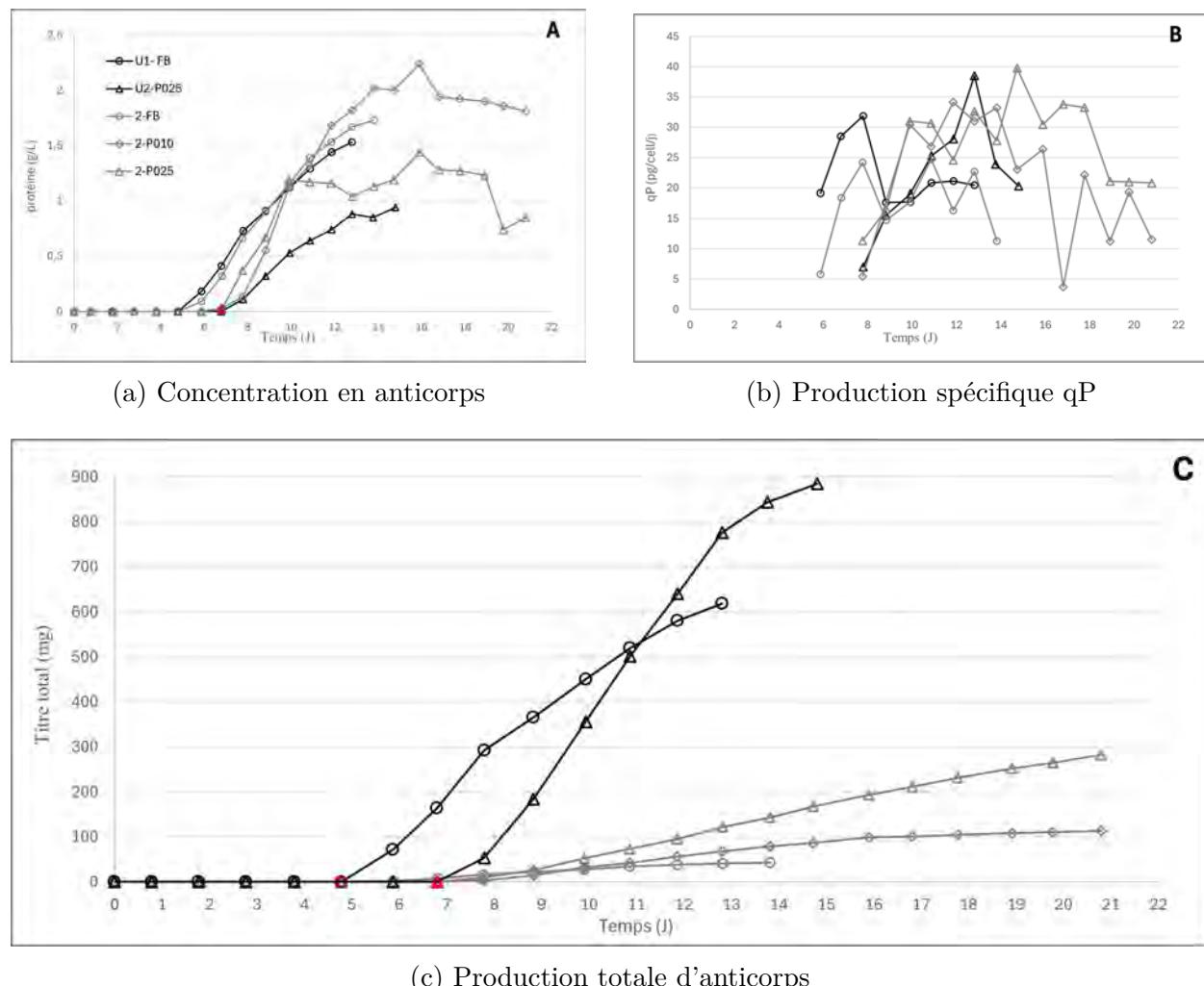


FIGURE 3.15 Résultats campagne 2 expérience 2 : (a), (b) : Concentration et production spécifique en anticorps. SD : $\pm 0,01$ g/L. (c) : Production totale en anticorps sur toute la culture. Ceci en fonction du taux de perfusion spécifique : (0 (Rond), 0.025 (Triangle) 0.010 (Losange) nL/cell · j. En gris les flasques et en noir les bioréacteurs. Les marqueurs en rouge indiquent le jour d'induction et la diminution de la température.

Bilan de production

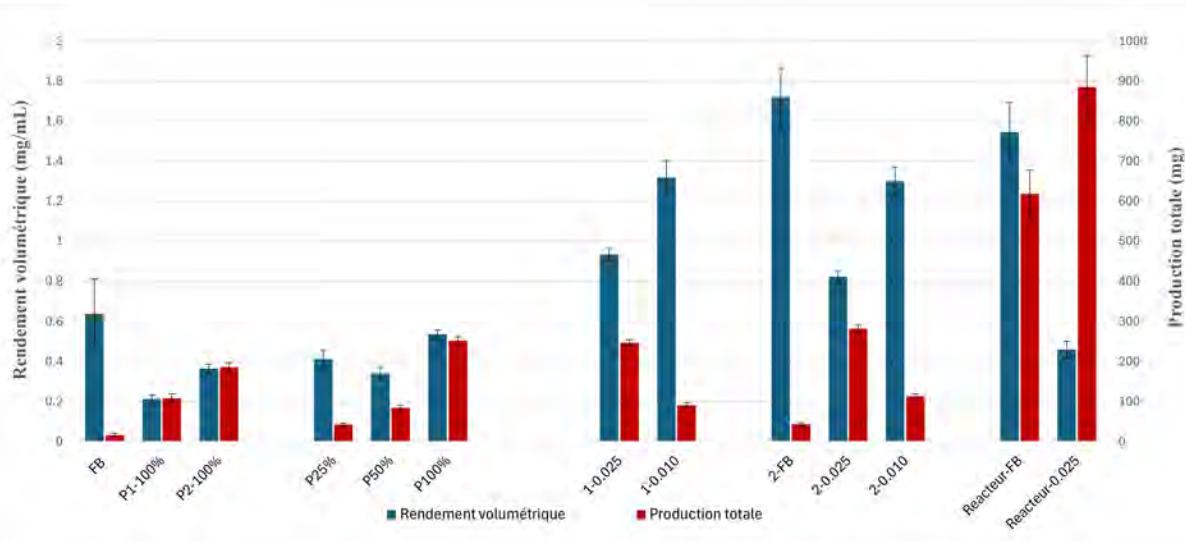


FIGURE 3.16 Production totale (rouge) et rendement volumétrique (bleu) pour l'ensemble des expériences. Les erreurs sur la concentration en produit ont été propagées sur la production totale et le rendement volumétrique.

La figure 3.16 présente la production totale ainsi que le rendement volumétrique pour l'ensemble des expériences réalisées. Le rendement volumétrique correspond à la quantité totale de produit obtenue divisée par le volume total de milieu de perfusion utilisé au cours de la culture.

Comme observé précédemment, la perfusion a permis d'augmenter la production totale. Des taux de perfusion similaires conduisent à des productions totales comparables. De plus, en comparant les résultats de la première campagne avec ceux de la seconde, on constate que les stratégies de perfusion basées sur le CSPR permettent de maintenir une production totale équivalente, voire supérieure, tout en minimisant le volume de perfusion.

Cette amélioration se reflète également sur le rendement volumétrique. En effet, la seconde campagne présente des rendements volumétriques jusqu'à deux fois supérieurs à ceux de la première campagne. Enfin, en comparant les conditions en cuve alimentée (FB et 2-FB) avec les conditions en perfusion, on observe des rendements volumétriques nettement plus élevés en cuve alimentée pour une même campagne. Cela n'est pas surprenant : en cuve alimentée, très peu de milieu de culture est utilisé (uniquement le volume initial), les cellules exploitent au maximum les nutriments présents, et la culture se poursuit jusqu'à la mort cellulaire, permettant ainsi un rendement volumétrique élevé. Cependant, cette approche se fait au prix d'une production totale beaucoup plus faible.

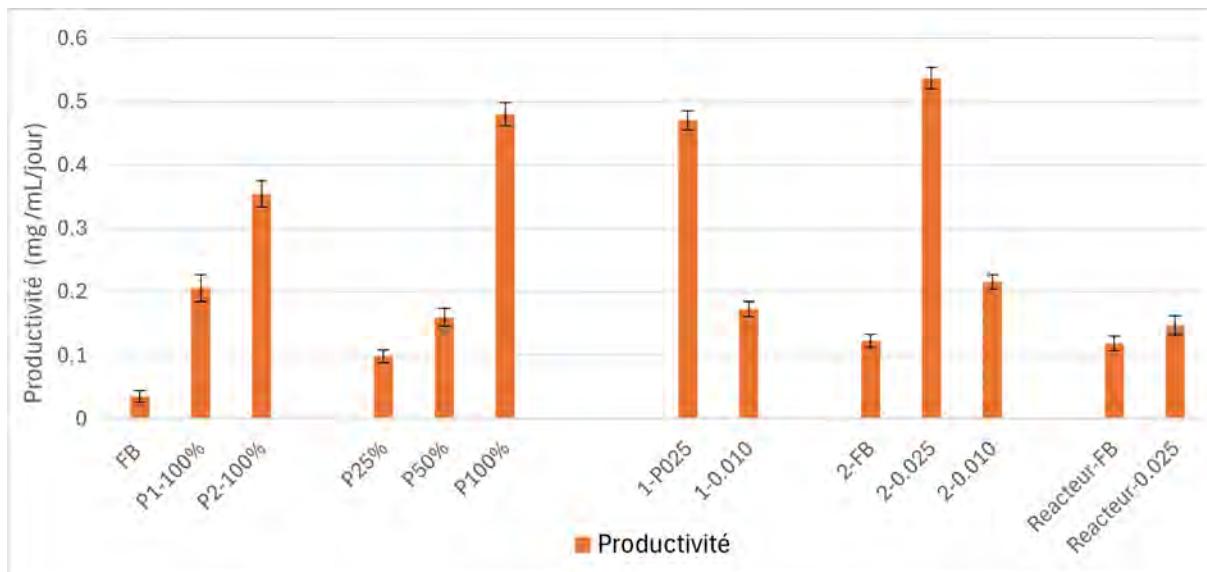


FIGURE 3.17 Productivité quotidienne pour l'ensemble des expériences. La productivité a été calculée comme la production totale divisée par le volume de culture et par le nombre de jours de culture. Les erreurs sur la concentration en produit ont été propagées sur la productivité.

La figure 3.17 présente la productivité quotidienne par volume de culture pour chacune des expériences. On observe que la perfusion permet d'atteindre des productivités supérieures. En effet, le renouvellement du milieu favorise une production plus importante pour un même volume de culture et une même durée. La stratégie de perfusion basée sur le CSPR à 0,025 nL/cell/jour a permis de maintenir une productivité similaire, voire supérieure, aux perfusions à 100%, tout en réduisant le volume total de perfusion de 28%.

En ce qui concerne les bioréacteurs, les conditions FB présentent une productivité comparable à celle des flasques. Cependant, la condition en perfusion dans le bioréacteur donne un résultat nettement inférieur à son équivalent en flasque. Ce résultat, bien que décevant et inattendu, est en continuité avec les tendances déjà observées concernant la concentration cellulaire et la production totale.

3.4 Discussion

Dans cette étude, nous avons développé un procédé de culture hybride entre fed-batch et pseudo-perfusion à faible taux par centrifugation. Ce procédé a été conçu dans l'objectif d'intensifier une culture fed-batch de référence utilisant une lignée cellulaire CHO-GS inducible. Les systèmes inductibles permettent de dissocier la phase de croissance cellulaire de la phase de production, ce qui apporte à la fois flexibilité et amélioration des rendements. En effet, pour de nombreuses lignées cellulaires, la productivité cellulaire spécifique tend à être plus élevée lorsque les cellules ne sont plus en phase de croissance active [79]. La perfusion apparaît alors comme une stratégie d'intensification idéale. Elle permet non seulement d'atteindre rapidement des densités cellulaires élevées avant induction, mais aussi de maintenir un environnement cellulaire favorable grâce à une limitation de l'accumulation de métabolites ou de déchets inhibiteurs. Cependant, le moment de l'induction, la quantité d'agent inducateur, le régime d'alimentation et le taux de perfusion figurent parmi les paramètres étudiés influençant le rendement volumétrique de ces systèmes [10] [39] [78].

L'objectif de ce travail était de développer une stratégie d'alimentation, de perfusion et d'induction permettant d'optimiser la production de protéines recombinantes à haute densité cellulaire. Le second objectif est de minimiser le volume de perfusion utilisé par rapport à un mode de culture en perfusion classique, afin de limiter la complexité de tels systèmes, notamment au niveau de la gestion des fluides.

3.4.1 Campagne 1

La première campagne visait à évaluer l'effet d'une stratégie de fed-perfusion à taux fixe, ainsi que celui de la concentration cellulaire au moment de l'induction en comparaison avec une culture fed-batch de référence. Les cultures ont été induites à une concentration de 2 ou 8×10^6 cellules/mL pour un volume de perfusion de 0.25, 0.5 et 1 RV par jour. L'ajout d'une pseudo-perfusion à 1 RV a permis d'obtenir un titre total 6,7 fois supérieur à celui mesuré en culture fed-batch. Lorsque cette perfusion a été couplée à une induction à plus haute densité cellulaire, le titre a de nouveau été augmenté par un facteur 1,7 mettant en avant l'importance du moment d'induction. L'amélioration observée s'explique par l'augmentation significative de la densité cellulaire maximale (passant de $3,8 \times 10^6$ cellules/mL à 36×10^6 cellules/mL), de l'IVCC total (de 30,3 à 229×10^6 cellules·j/mL), de la durée de culture (de 18 à 21 jours), ainsi que de la productivité spécifique (de 15,39 à 40 pg/cellule/jour). Ces résultats montrent une amélioration notable par rapport à d'autres travaux rapportés dans la littérature, utilisant

une perfusion en début de culture suivie d'une stratégie d'alimentation, pour une lignée cellulaire similaire [39].

La comparaison entre différents taux de perfusion (P25, P50, P100) met en évidence le lien entre le taux de perfusion et la densité cellulaire maximale. Le doublement du taux de perfusion de 0,25 à 0,5 RV par jour a permis de doubler la densité cellulaire, tandis que l'augmentation de 0,5 à 1 RV par jour n'a conduit qu'à une hausse de 1,5 (45×10^6 cellules/mL). Ceci suggère l'existence d'un seuil au-delà duquel l'augmentation du taux de perfusion devient moins efficace, soulignant ainsi l'intérêt d'une optimisation fine du volume de perfusion afin de maximiser la productivité tout en minimisant la consommation de milieu. En condition P100 (perfusion à 1 RV), l'IVCC plus élevé a permis d'augmenter le titre total, malgré une production spécifique deux fois inférieure par rapport à P1 et P2.

L'accumulation de métabolites est connue pour être potentiellement néfaste pour les cultures cellulaires. Les effets inhibiteurs de l'accumulation du lactate sont généralement rapportés pour des concentrations supérieures à 30-40 mM [48]. Les valeurs atteintes pour P1 et P2 sont largement inférieures à FB, une concentration maximum en fed-batch de 26 mM est observée. La perfusion a permis de réduire sa concentration au cours de la culture de plus de moitié. Cependant, pour les taux de perfusion et régimes d'alimentation les plus élevés (P1 et P2), une production spécifique en lactate bien plus élevée est observée. Ceci est dû à la concentration de glucose maintenue élevée, empêchant également la reconsommation du lactate [50]. L'ammoniac présente un comportement similaire. En condition Fed-batch, son accumulation atteint jusqu'à 10 mM, dépassant le seuil critique au-delà duquel le NH₃ devient毒ique pour les cellules [52] et potentiellement responsable d'une mort cellulaire plus rapide ainsi qu'une croissance ralentie. En revanche, les concentrations mesurées dans les conditions P1 et P2 sont réduites de moitié (5,31 et 6,31 mM, respectivement), grâce à la mise en place de la perfusion, indiquant une meilleure maîtrise des déchets métaboliques. Cependant, les taux de production spécifique d'ammoniac sont restés élevés tout au long de la culture et, en particulier, en condition de perfusion. Ces résultats pourraient indiquer une stratégie d'alimentation en excès, induisant une production excessive de NH₃ et, possiblement, d'autres déchets métaboliques tels que le lactate.

Concernant la comparaison des taux de perfusion P25, P50 et P100, des concentrations en glucose significativement plus faibles ont été observées résultant d'une plus grande densité cellulaire et d'un régime d'alimentation légèrement moins important. Ainsi, bien que les concentrations maximales en lactate soient globalement similaires entre les différentes conditions, une phase de reconsommation est observée, en particulier pour le taux de perfusion le plus bas (P25). Plus le taux de perfusion est élevé, plus le passage vers une reconsom-

mation du lactate est retardé. Ce phénomène résulte probablement de la combinaison d'un apport en glucose plus élevé et d'un retrait accru du lactate par perfusion, qui empêchent le basculement métabolique.

Pour l'ensemble des conditions étudiées, une forte croissance cellulaire est observée après l'induction. L'application d'une hypothermie post-induction (32 °C) semble ralentir la croissance, mais cet effet est temporaire. Ainsi, il pourrait être avantageux de prolonger la phase de croissance exponentielle en retardant l'induction jusqu'à l'atteinte de concentrations cellulaires proches du maximum attendu, afin de maximiser l'IVCC et potentiellement améliorer les rendements de production.

3.4.2 Campagne 2

La seconde campagne visait à optimiser la stratégie de fed-perfusion à faible taux (≤ 1 RV) en définissant un taux de perfusion spécifique (CSPR) et un taux d'alimentation proportionnel à la densité cellulaire. Elle avait également pour objectif de valider la robustesse et la transférabilité du procédé développé en flasques, tout en mesurant les performances globales en bioréacteur. Deux CSPR ont été évalués : 0,025 et 0,010 nL/cellule/jour, avec un taux d'alimentation de 3,75 μ L/cellule/jour.

Flasques

Les cultures en perfusion ont été induites à une concentration comprise entre 14 et 30×10^6 cellules/mL et entre $7,2$ et 12×10^6 cellules/mL en Fedbatch. La condition Fed-batch réalisée en flasque avec ce régime d'alimentation a permis d'atteindre une concentration 4,3 fois supérieure au régime précédent ($16,5 \times 10^6$ cellules/mL) et un titre 2,7 fois plus élevé. Cela s'explique par une alimentation croissante proportionnelle à la densité cellulaire. Les résultats montrent qu'un taux de 0,010 nL/cellule/jour (1-P010 et 2-P010) est insuffisant pour soutenir la viabilité et maintenir de hautes concentrations cellulaires, avec des densités maximales observées de 17 et $24,5 \times 10^6$ cellules/mL. La chute de viabilité est probablement liée à un apport nutritif insuffisant. Néanmoins, ce taux a permis de prolonger la culture de 7 jours par rapport au fed-batch et d'augmenter la densité cellulaire d'un facteur d'au moins 1,5. Cette amélioration se reflète également sur le rendement, avec un titre final jusqu'à 2,6 fois supérieur.

Les perfusions P025 ont atteint des concentrations presque deux fois plus élevées que P010 : (28 et 40×10^6 cellules/mL). De manière surprenante, la condition 2-P025 atteint une concentration maximale 1,4 fois supérieure à celle de 1-P025, bien que les conditions de culture soient identiques. L'analyse des profils de densité cellulaire viable (VCD) révèle une croissance légèrement plus rapide en début de culture pour 2-P025. Cette différence initiale conduit à un taux de perfusion global plus élevé en début de culture, ce qui pourrait expliquer la concentration maximale plus importante observée. Ce résultat met en évidence la dépendance du système développé à la croissance cellulaire et aux conditions de culture dès l'inoculation, introduisant ainsi une certaine variabilité dans les performances du procédé. Cependant, la condition présentant la concentration la plus élevée, 2-P025, a atteint les limites du système de culture. Après avoir atteint sa densité maximale, cette surperformance initiale s'est accompagnée d'une chute rapide de la viabilité, avant stabilisation autour de ($25 - 30 \times 10^6$ cellules/mL). Ce phénomène pourrait résulter de l'accumulation de métabolites, en particulier l'ammoniac, d'un appauvrissement en nutriments, ou encore d'une limitation en oxygène, particulièrement critiques à haute densité cellulaire. Malgré cela, la condition 2-P025 présente le rendement le plus élevé, atteignant 282 mg, soit 2,5 fois plus que 2-P010 et 6,5 fois plus que la condition Fed-batch. Le profil de production est très similaire entre les deux conditions P025 : après 12 jours de production, les rendements sont respectivement de 256 mg pour 1-P025 et 252 mg pour 2-P025. Et ce, malgré une densité cellulaire et un IVCC supérieurs pour 2-P025. Une diminution de la productivité spécifique dans cette dernière condition semble compenser l'avantage lié à la biomasse, conduisant à un rendement total équivalent entre les deux expériences pour une durée de production identique. 2-P025 ayant été induit plus tôt, celle-ci présente le meilleur rendement. L'analyse des métabolites et du glucose mettent en évidence certaines limites de la stratégie d'alimentation adoptée pour la condition 2-P025, en particulier en fin de culture, en lien avec l'augmentation du q_{glc} mettant en avant le besoin d'une meilleure stratégie de régulation du glucose. Pour le lactate,似ilairement aux autres perfusions, une seconde production de lactate, moins marquée, est observée, avec l'apparition d'un second pic suivi d'une nouvelle phase de reconsommation, probablement liée à une concentration de glucose plus élevée. Ce phénomène est d'autant plus accentué que le taux de perfusion est élevé. À l'inverse, dans la condition Fed-batch, une reconsommation spécifique du lactate nettement plus importante est observée, permettant une élimination quasi complète du composé en fin de culture.

En ce qui concerne la concentration en ammoniac, le taux de perfusion appliqué dans les conditions P025 (1-P025 et 2-P025) a permis de maintenir des niveaux plus faibles que ceux observés dans les conditions P010 (1-P010 et 2-P010) et 2-FB, malgré une densité cellulaire significativement plus élevée. Jusqu'à la fin de la culture, les concentrations en ammoniac pour P025 sont restées inférieures à 3–4 mM, tandis qu'elles ont atteint environ 4 mM pour 2-FB et jusqu'à 6,5 mM en P010. Des concentrations inférieures à 10 mM n'impactent généralement pas significativement les rendements avec des cellules CHO [48] [51]. Ces résultats mettent en évidence la meilleure capacité de la stratégie P025 à contrôler l'accumulation des métabolites, contrairement à la condition P010, pour laquelle une incapacité à maintenir des concentrations faibles en déchets métaboliques est observée. Néanmoins, la production spécifique quotidienne de NH₃ (q_{NH_3}) était supérieure en perfusion, ce qui suggère qu'un taux de perfusion plus élevé peut favoriser la production d'ammoniac, en lien avec une activité métabolique plus intense notamment en raison de la consommation fort probablement accrue des acides aminés plus disponibles.

En comparant ces résultats à ceux de l'expérience 1 de la première campagne, on remarque que la production de NH₃ a pu être réduite de moitié avec 2-FB par rapport à FB (4 mM contre 10 mM), alors que les performances en termes de concentration cellulaire et de production ont été maximisées. Cela confirme l'hypothèse selon laquelle le régime d'alimentation excessif précédemment employé n'était pas optimal et a conduit à une surproduction de NH₃. Cette tendance se reflète également au niveau des taux spécifiques, qui ont été fortement réduits avec le nouveau régime d'alimentation (0,146 contre 0,06 pmol/cell/jour en moyenne). Ceci s'observe également en perfusion. Malgré un taux de perfusion global plus élevé lors de la première campagne (1 RV), les concentrations en ammoniac atteignaient 3 à 4 mM. À l'inverse, dans cette deuxième campagne, des taux de perfusion moyens inférieurs permettent d'atteindre des concentrations similaires, suggérant que l'excès d'alimentation appliqué précédemment favorisait une surproduction de NH₃. Cette hypothèse est encore une fois appuyée par les valeurs nettement plus élevées de q_{NH_3} observées lors de l'expérience 1.

Au final, pour la condition optimale 2-P025, des taux de perfusion quotidiens compris entre 0,6 et 1 RV ont été appliqués après la phase de croissance exponentielle, avec une moyenne de 0,74 entre les jours 7 et 21. Ces résultats démontrent la faisabilité d'une stratégie de perfusion à faible taux, capable de soutenir des cultures à haute densité cellulaire tout en maintenant des rendements élevés.

Bioreacteur

Pour les deux conditions testées (U1-FB et U2-P025), les performances cellulaires observées en bioréacteur ont été significativement inférieures à celles mesurées en flasques. La densité cellulaire maximale atteinte était de $20,3 \times 10^6$ cellules/mL pour U2-P025 et de $10,2 \times 10^6$ cellules/mL pour U1-FB, soit respectivement 2 fois et 1,6 fois moins que les cultures correspondantes en flasques. Cela témoigne d'une limitation intrinsèque dans la montée en échelle, malgré le contrôle du pH et de l'oxygène dissous. La viabilité cellulaire a également été impactée : bien qu'elle ait pu être maintenue au-dessus de 80 % pendant 10 jours, une chute rapide est survenue par la suite pour les deux conditions. Contrairement à ce qui a été observé en flasques, la perfusion n'a pas permis de prolonger significativement la durée de culture ni d'éviter le déclin de viabilité. Ces observations suggèrent que d'autres facteurs, n'ayant pas pu être identifiés, ont limité les performances du procédé, tels que le stress hydrodynamique, l'osmolalité, la méthode de perfusion moins efficace ou une stratégie de bullage inadéquate [80] [81].

L'analyse des profils métaboliques confirme ces hypothèses. Malgré une densité cellulaire inférieure, la consommation spécifique de glucose était légèrement plus élevée en bioréacteur. Ce phénomène peut révéler un stress cellulaire plus important ou une dérégulation métabolique. Des concentrations maximales de lactate plus élevées ont été mesurées dans les deux conditions : jusqu'à 24,1 mM pour U2-P025 et 23 mM pour U1-FB, soit environ 1,7 fois plus qu'en flasques. Une reconsummation très faible est observée en condition perfusée, suivie d'un second pic de production comme en flasque. La concentration en ammoniac est restée modérée dans U2-P025 (autour de 3 mM), en lien avec la densité cellulaire plus faible (et donc un volume d'alimentation plus faible également). La production spécifique quotidienne de NH_3 (q_{NH_3}) était supérieure à celle observée pour U1-FB, similairement aux flasques.

Malgré ces limitations, les résultats en termes de production restent prometteurs. La condition perfusée U2-P025 a permis d'atteindre un rendement global de 885 mg, soit 1,4 fois plus que celui observé en mode fed-batch (618 mg pour U1-FB). Le profil de production reste limité par la densité cellulaire plus faible par rapport aux flasques. Les taux de production spécifiques observés sont similaires à ceux mesurés en flasques, avec une légère diminution en fin de culture probablement due à la chute de viabilité. En revanche, en condition fed-batch (U1-FB), une production spécifique initialement plus élevée est observée, compensant partiellement la plus faible densité cellulaire. Le taux moyen de production spécifique est ainsi légèrement supérieur à celui mesuré en flasques (22,16 contre 17,33 pg/cellule/jour).

Au final, pour la condition U2-P025, des taux de perfusion quotidiens compris entre 0,1 et 0,5 RV ont été appliqués, avec une phase de montée progressive entre le jour 0 et le jour 8, suivie d'une décroissance jusqu'à la fin de la culture. Le taux moyen sur la période post-induction (jours 7 à 21) est de 0,33 RV/jour. Les taux de perfusion appliqués en bioréacteur (U2-P025) sont 1,5 à 2,3 fois inférieurs à ceux utilisés pour la condition équivalente en flasque (1-P025 et 2-P025), ce qui montre que l'efficacité de la stratégie développée dépend fortement des conditions de culture initiales et de la croissance observée dès l'inoculation. Une croissance initiale sous-optimale entraîne en effet une densité cellulaire plus faible, limitant le volume perfusé dans une approche basée sur le CSPR, et modifiant ainsi la dynamique globale de culture. Ces observations soulignent l'importance d'un contrôle rigoureux des paramètres de culture dès les premières étapes lors de la montée en échelle, afin d'assurer la reproductibilité et l'efficacité du procédé. Une stratégie de perfusion à taux fixe, indépendante de la densité cellulaire, offre alors une meilleure robustesse face aux variations initiales de croissance et à la variabilité des procédés de culture.

Bilan de production

Les résultats obtenus montrent que la stratégie de fed-perfusion basée sur le CSPR permet d'atteindre des productions totales et des productivités comparables, voire supérieures, à celles obtenues avec des perfusions à 100%, tout en utilisant un volume de perfusion réduit. Cette optimisation du volume de perfusion constitue un avantage majeur, car elle permet de limiter la consommation de milieu tout en maintenant une production élevée, répondant ainsi directement à l'objectif principal de ce travail : optimiser la production de protéines recombinantes tout en réduisant le volume de milieu nécessaire. Bien que les rendements volumétriques soient plus élevés en mode cuve alimentée, cela se fait au prix d'une production totale nettement inférieure. La stratégie de fed-perfusion basée sur le CSPR permet, en revanche, d'atteindre une production totale supérieure tout en optimisant le rendement volumétrique, ce qui la rend compétitive par rapport à la cuve alimentée. De plus, malgré des temps de culture plus longs, la productivité en fed-perfusion reste largement supérieure à celle observée en cuve alimentée. Ainsi, la fed-perfusion permet de produire une plus grande quantité de produit pour un même volume de réacteur et une durée de culture équivalente. En ce qui concerne les bioréacteurs, des résultats décevants et inattendus ont été observés, tant en fed-batch qu'en perfusion, par rapport aux flasques, pour une cause qui n'a pas pu être déterminée. Par conséquent, ces résultats ne permettent pas de valider la transposition de la stratégie développée à plus grande échelle. Néanmoins, l'effet de la perfusion reste observable, avec une production totale et une productivité supérieures dans le bioréacteur perfusé par rapport à la cuve alimentée.

CHAPITRE 4 CONCLUSION

4.1 Synthèse des travaux

Cette étude a permis de développer un procédé de culture hybride entre fed-batch et pseudo-perfusion pour une lignée CHO inductible. Elle démontre que l'ajout d'une perfusion modérée (jusqu'à 1 RV/jour) couplée à une induction à haute densité cellulaire améliore significativement les performances de production : densité cellulaire, IVCC, durée de culture et titre final. L'importance de la concentration à l'induction et du taux de perfusion a été mise en évidence.

L'utilisation d'un taux de perfusion défini via le CSPR, combinée à une alimentation proportionnelle à la densité cellulaire, a permis, en flasques, d'atteindre des rendements jusqu'à 6,5 fois supérieurs à ceux du fed-batch, tout en minimisant le volume de perfusion utilisé. Ceci contribue à réduire la complexité inhérente aux systèmes de perfusion en termes de gestion de volumes tout en assurant un bon contrôle des métabolites inhibiteurs, notamment une réduction par un facteur 2 de l'accumulation de NH_3 .

Finalement, ce procédé a pu être transposé à l'échelle du bioréacteur (400 mL), avec une adaptation réussie du système de perfusion et de la méthode de filtration. Bien que les performances aient été inférieures à celles observées en flasques, pour des raisons qu'il reste à déterminer, l'effet bénéfique de la fed-perfusion a néanmoins été confirmé à cette échelle.

4.2 Limitations

Plusieurs limites ont été identifiées. En particulier, la montée en échelle en bioréacteur a révélé une chute de performances (densité, viabilité, productivité), probablement liée à des facteurs non maîtrisés tels que le stress hydrodynamique, l'oxygénation ou l'efficacité du système de perfusion.

La complexité du procédé peut également constituer une limite importante. En effet, ce mode de culture nécessite la mesure quotidienne de la VCD ainsi que de la concentration en glucose, afin d'adapter précisément les quantités d'alimentation, de perfusion et de glucose ajoutées. L'incertitude associée à la mesure de la VCD peut entraîner des variations dans le taux réel apporté aux cellules, générant ainsi une variabilité des résultats, ce qui peut être problématique dans un contexte de bio-fabrication.

De plus, l'augmentation du débit de perfusion présente un effet limité sur la concentration

cellulaire au-delà d'un certain seuil, soulignant ainsi l'intérêt d'une optimisation fine du volume de perfusion afin de maximiser la productivité tout en minimisant la consommation de milieu.

Finalement, la stratégie d'alimentation et de perfusion basée sur la concentration cellulaire est sensible aux conditions initiales de culture, une croissance sous-optimale en début de procédé pouvant compromettre la dynamique globale et la reproductibilité du procédé. Ces observations soulignent l'importance d'un contrôle rigoureux des paramètres de culture dès les premières étapes, en particulier pour la montée en échelle.

4.3 Améliorations futures

Automatisation du contrôle de la culture

L'une des limitations de ce système de culture réside dans la nécessité d'une surveillance quotidienne de la densité cellulaire viable (VCD) et du glucose. Cela implique la présence constante d'un opérateur, ce qui est inefficace en termes de charge de travail et augmente également le risque de complications telles qu'une contamination, des erreurs de manipulation ou une variabilité accrue. De plus, une seule mesure par jour ne permet pas toujours de capturer fidèlement les dynamiques cellulaires et métaboliques.

Une solution pour cette limitation serait d'automatiser les différents contrôles critiques du procédé. Premièrement, le suivi de la VCD pourrait par exemple être réalisé via la mesure de la bio-capacitance. De nombreux travaux ont démontré sa capacité à suivre en temps réel la densité cellulaire viable sans nécessiter de prélèvements. [70, 82–84]. De manière similaire, il existe des méthodes de suivi en ligne du glucose, comme la spectroscopie Raman, permettant une analyse continue sans prélèvement [85–87]. L'intégration de ces mesures dans des boucles de contrôle automatisées permettrait de développer des stratégies de pilotage adaptatives plus performantes et d'envisager une évolution vers un procédé continu tout en diminuant la charge de travail nécessaire à la surveillance du procédé et en réduisant les risques liés aux interventions manuelles.

Stratégies hybrides et adaptatives de perfusion

Une autre limitation observée réside dans la forte dépendance de l'efficacité de la stratégie développée aux conditions de culture initiales, notamment à la croissance cellulaire dès l'incubation. Dans ce contexte, l'utilisation d'une perfusion à taux fixe semble offrir moins de variabilité.

Il apparaît donc pertinent d'approfondir la comparaison des rendements et des volumes de milieu consommés entre des stratégies à taux fixe et celles basées sur le CSPR.

Il est également possible d'envisager des stratégies d'alimentation et de perfusion combinant un taux fixe avec un ajustement basé sur des paramètres cellulaires ou métaboliques, afin d'améliorer la robustesse du procédé pour la montée en échelle.

Études de différents régimes d'alimentation et de perfusion

Dans cette étude, seuls un régime d'alimentation et deux régimes de perfusion basés sur le CSPR et la densité cellulaire ont été explorés. Il serait pertinent d'élargir cette analyse en testant une gamme plus étendue de taux, afin d'identifier les seuils optimaux en termes de productivité, de viabilité et d'efficacité d'utilisation du milieu. En particulier, la comparaison entre des taux faibles (≤ 1 RV) et des taux plus élevés permettrait de confirmer l'intérêt, les avantages et les inconvénients d'une telle stratégie.

Études de l'impact de la stratégie développée sur la qualité du produit

Bien que cette étude se soit focalisée sur les performances de croissance et de production, l'impact de la stratégie sur la qualité du produit n'a pas été évalué. De manière générale, la perfusion permet un temps de résidence du produit inférieur au sein du réacteur, ce qui constitue un avantage en termes de qualité. Cependant, cette stratégie ne permet pas une récolte totale du produit en continu tout en augmentant la durée de culture. Ainsi, des analyses complémentaires sont nécessaires pour caractériser les attributs critiques de qualité, tels que le profil de glycosylation, la pureté, la présence d'agrégats ou encore la structure fonctionnelle de la protéine. Cela permettra de s'assurer que l'intensification du procédé ne dégrade pas les standards requis pour un produit biopharmaceutique.

Fusion entre induction contrôlée et perfusion

Les stratégies de culture en perfusion ont connu un regain d'intérêt au cours de la dernière décennie, grâce aux avancées technologiques en capteurs en ligne, contrôle automatisé et systèmes de séparation cellulaire. La perfusion est aujourd'hui envisagée comme une alternative viable aux procédés fed-batch classiques, notamment dans le contexte des procédés continus et intensifiés.

Parallèlement, les lignées cellulaires inductibles ont gagné en maturité, permettant de moduler finement l'expression génique, de différer la production à un stade spécifique de la culture,

et d'optimiser la croissance avant de déclencher l'expression de la protéine. Leur usage dans les procédés industriels reste toutefois encore relativement marginal.

La fusion des deux techniques ouvre la voie à une nouvelle génération de procédés où chaque phase de culture est exploitée au maximum de son potentiel. Actuellement, peu d'études sur le sujet existent et se concentrent principalement sur le gain de densité cellulaire ainsi que l'élimination des métabolites [39, 88–92].

Une idée pourrait être l'alternance entre des phases de production et des phases de croissance/régénération de la culture, notamment dans le cas de la production d'une molécule cytotoxique. La perfusion permettrait de retirer l'agent inducteur du milieu, offrant ainsi la possibilité de maintenir la culture sur de très longues durées tout en contrôlant la viabilité et le métabolisme cellulaires. Cette approche permettrait de choisir le moment de production selon les besoins, dans des conditions optimales, et éviterait de répéter fréquemment les étapes de préparation et montée en échelle, ce qui représente un gain de temps considérable.

RÉFÉRENCES

- [1] J. Puetz et F. M. Wurm, “Recombinant proteins for industrial versus pharmaceutical purposes : A review of process and pricing,” *Processes*, vol. 7, n°. 88, p. 476, août 2019.
- [2] A. M. R. <https://www.alliedmarketresearch.com>, “Protein Therapeutics Market Size, Share, Forecast Up to 2030.” [En ligne]. Disponible : <https://www.alliedmarketresearch.com/protein-therapeutics-market>
- [3] [En ligne]. Disponible : <https://www.imarcgroup.com/protein-therapeutics-market>
- [4] A. Jayakrishnan, W. R. Wan Rosli, W. Rosli, F. Syafiq, A. Razak, P. E. Kee, H. S. Ng, Y.-L. Chew, S.-K. Lee, M. Ramasamy, T. Siang, K. B. Liew et A. R. Mohamed Tahir, “Evolving paradigms of recombinant protein production in pharmaceutical industry : A rigorous review,” *Sci*, vol. 6, 01 2024.
- [5] M. Combe et S. Sokolenko, “Quantifying the impact of cell culture media on cho cell growth and protein production,” *Biotechnology Advances*, vol. 50, p. 107761, 2021.
- [6] K. Liang, H. Luo et Q. Li, “Enhancing and stabilizing monoclonal antibody production by chinese hamster ovary (cho) cells with optimized perfusion culture strategies,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 11, janv. 2023. [En ligne]. Disponible : <https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2023.1112349/full>
- [7] M. Butler et M. Spearman, “The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 30, p. 107–112, déc. 2014.
- [8] J. Y. Kim, Y.-G. Kim et G. M. Lee, “Cho cells in biotechnology for production of recombinant proteins : Current state and further potential - applied microbiology and biotechnology,” *SpringerLink*, Dec 2011. [En ligne]. Disponible : <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-011-3758-5#citeas>
- [9] A. Mullick, Y. Xu, R. Warren, M. Koutroumanis, C. Guilbault, S. Broussau, F. Malenfant, L. Bourget, L. Lamoureux, R. Lo, A. W. Caron, A. Pilote et B. Massie, “The cumate gene-switch : a system for regulated expression in mammalian cells,” *BMC Biotechnology*, vol. 6, n°. 1, p. 43, nov. 2006.
- [10] A. Poulaing, S. Perret, F. Malenfant, A. Mullick, B. Massie et Y. Durocher, “Rapid protein production from stable cho cell pools using plasmid vector and the cumate gene-switch,” *Journal of Biotechnology*, vol. 255, p. 16–27, août 2017.

- [11] R. W. Eaton, “p-cymene catabolic pathway in *pseudomonas putida* f1 : cloning and characterization of dna encoding conversion of p-cymene to p-cumate,” *Journal of Bacteriology*, vol. 179, n°. 10, p. 3171–3180, mai 1997.
- [12] A. Poulain, A. Mullick, B. Massie et Y. Durocher, “Reducing recombinant protein expression during cho pool selection enhances frequency of high-producing cells,” *Journal of Biotechnology*, vol. 296, p. 32–41, avr. 2019.
- [13] M. Wolf, J.-M. Bielser et M. Morbidelli, *Perfusion Cell Culture Processes for Biopharmaceuticals : Process Development, Design, and Scale-up*, ser. Cambridge Series in Chemical Engineering. Cambridge : Cambridge University Press, 2020. [En ligne]. Disponible : <https://www.cambridge.org/core/books/perfusion-cell-culture-processes-for-biopharmaceuticals/5C650AD26D52B2435E7796D382ECE5DA>
- [14] L. Arnold, K. Lee, J. Rucker-Pezzini et J. H. Lee, “Implementation of fully integrated continuous antibody processing : Effects on productivity and cogm,” *Biotechnology Journal*, vol. 14, n°. 2, p. e1800061, févr. 2019.
- [15] J. Walther, R. Godawat, C. Hwang, Y. Abe, A. Sinclair et K. Konstantinov, “The business impact of an integrated continuous biomanufacturing platform for recombinant protein production,” *Journal of Biotechnology*, vol. 213, p. 3–12, nov. 2015.
- [16] J. Coronel, C. Heinrich, S. Klausing, T. Noll, A. Figueredo-Cardero et L. R. Castilho, “Perfusion process combining low temperature and valeric acid for enhanced recombinant factor viii production,” *Biotechnology Progress*, vol. 36, n°. 1, p. e2915, 2020.
- [17] S. Ozturk et W.-S. Hu, *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies*. Boca Raton : CRC Press, août 2005.
- [18] L. Sanchez-Garcia, L. Martín, R. Mangues, N. Ferrer-Miralles, E. Vázquez et A. Villa-verde, “Recombinant pharmaceuticals from microbial cells : a 2015 update,” *Microbial Cell Factories*, vol. 15, n°. 1, p. 33, févr. 2016.
- [19] G. L. Rosano et E. A. Ceccarelli, “Recombinant protein expression in *escherichia coli* : advances and challenges,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 5, avr. 2014. [En ligne]. Disponible : <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2014.00172/full>
- [20] A. L. Demain et P. Vaishnav, “Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms,” *Biotechnology Advances*, vol. 27, n°. 3, p. 297–306, 2009.
- [21] S. Hellwig, J. Drossard, R. M. Twyman et R. Fischer, “Plant cell cultures for the production of recombinant proteins,” *Nature Biotechnology*, vol. 22, n°. 11, p. 1415–1422, nov. 2004.

- [22] J. Y. Kim, Y.-G. Kim et G. M. Lee, "Cho cells in biotechnology for production of recombinant proteins : current state and further potential," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 93, n°. 3, p. 917–930, févr. 2012.
- [23] F. M. Wurm, "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells," *Nature Biotechnology*, vol. 22, n°. 11, p. 1393–1398, nov. 2004.
- [24] W.-J. Xu, Y. Lin, C.-L. Mi, J.-Y. Pang et T.-Y. Wang, "Progress in fed-batch culture for recombinant protein production in cho cells," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 107, n°. 4, p. 1063–1075, 2023.
- [25] S. Jain, S. Gupta, S. Patiyal et G. P. S. Raghava, "Thpdbl2 : compilation of fda approved therapeutic peptides and proteins," *Drug Discovery Today*, vol. 29, n°. 7, p. 104047, juill. 2024.
- [26] F. T. Kao et T. T. Puck, "Genetics of somatic mammalian cells, vii. induction and isolation of nutritional mutants in chinese hamster cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 60, n°. 4, p. 1275–1281, août 1968.
- [27] N. E. Lewis, X. Liu, Y. Li, H. Nagarajan, G. Yerganian, E. O'Brien, A. Bordbar, A. M. Roth, J. Rosenbloom, C. Bian, M. Xie, W. Chen, N. Li, D. Baycin-Hizal, H. Latif, J. Forster, M. J. Betenbaugh, I. Famili, X. Xu, J. Wang et B. O. Palsson, "Genomic landscapes of chinese hamster ovary cell lines as revealed by the cricetus griseus draft genome," *Nature Biotechnology*, vol. 31, n°. 8, p. 759–765, août 2013.
- [28] M.-E. Lalonde et Y. Durocher, "Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells," *Journal of Biotechnology*, vol. 251, p. 128–140, juin 2017.
- [29] X. Xu, H. Nagarajan, N. E. Lewis, S. Pan, Z. Cai, X. Liu, W. Chen, M. Xie, W. Wang, S. Hammond, M. R. Andersen, N. Neff, B. Passarelli, W. Koh, H. C. Fan, J. Wang, Y. Gui, K. H. Lee, M. J. Betenbaugh, S. R. Quake, I. Famili, B. O. Palsson et J. Wang, "The genomic sequence of the chinese hamster ovary (cho)-k1 cell line," *Nature Biotechnology*, vol. 29, n°. 8, p. 735–741, 2011.
- [30] N. Romanova et T. Noll, "Engineered and natural promoters and chromatin-modifying elements for recombinant protein expression in cho cells," *Biotechnology Journal*, vol. 13, n°. 3, p. 1700232, 2018.
- [31] J.-S. Maltais, S. Lord-Dufour, A. Morasse, M. Stuible, M. Loignon et Y. Durocher, "Repressing expression of difficult-to-express recombinant proteins during the selection process increases productivity of cho stable pools," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 120, n°. 10, p. 2840–2852, 2023.
- [32] P. Eisenhut, N. Marx, G. Borsi, M. Papež, C. Ruggeri, M. Baumann et N. Borth, "Manipulating gene expression levels in mammalian cell factories : An outline of synthetic

- molecular toolboxes to achieve multiplexed control,” *New Biotechnology*, vol. 79, p. 1–19, mars 2024.
- [33] B. Gaillet, R. Gilbert, R. Amziani, C. Guilbault, C. Gadoury, A. W. Caron, A. Mullick, A. Garnier et B. Massie, “High-level recombinant protein production in cho cells using an adenoviral vector and the cumatate gene-switch,” *Biotechnology Progress*, vol. 23, n°. 1, p. 200–209, 2007.
 - [34] B. Gaillet, R. Gilbert, S. Broussau, A. Pilote, F. Malenfant, A. Mullick, A. Garnier et B. Massie, “High-level recombinant protein production in cho cells using lentiviral vectors and the cumatate gene-switch,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 106, n°. 2, p. 203–215, juin 2010.
 - [35] T. Lai, Y. Yang et S. K. Ng, “Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production,” *Pharmaceuticals*, vol. 6, n°. 5, p. 579–603, avr. 2013.
 - [36] K. Furukawa et K. Ohsuye, “Effect of culture temperature on a recombinant cho cell line producing a c-terminal alpha-amidating enzyme,” *Cytotechnology*, vol. 26, n°. 2, p. 153–164, mars 1998.
 - [37] N. Kumar, P. Gammell et M. Clynes, “Proliferation control strategies to improve productivity and survival during cho based production culture : A summary of recent methods employed and the effects of proliferation control in product secreting cho cell lines,” *Cytotechnology*, vol. 53, n°. 1–3, p. 33–46, avr. 2007.
 - [38] H. S. Kim et G. M. Lee, “Differences in optimal ph and temperature for cell growth and antibody production between two chinese hamster ovary clones derived from the same parental clone,” *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 17, n°. 5, p. 712–720, mai 2007.
 - [39] K. Mellahi, “Procédés de culture cellulaire pour un système cho inductible : cuvée-alimentée et perfusion,” phd, École Polytechnique de Montréal, nov. 2018. [En ligne]. Disponible : <https://publications.polymtl.ca/3696/>
 - [40] L. Lemire, S.-J. Reyes, Y. Durocher, R. Voyer, O. Henry et P. L. Pham, “N-1 semi-continuous transient perfusion in shake flask for ultra-high density seeding of cho cell cultures in benchtop bioreactors,” *Biotechnology Progress*, p. e70029, avr. 2025.
 - [41] S.-J. Reyes, L. Lemire, Y. Durocher, R. Voyer, O. Henry et P. L. Pham, “Investigating the metabolic load of monoclonal antibody production conveyed to an inducible cho cell line using a transfer-rate online monitoring system,” *Journal of Biotechnology*, vol. 399, p. 47–62, mars 2025.
 - [42] T. Hogiri, H. Tamashima, A. Nishizawa et M. Okamoto, “Optimization of a ph-shift control strategy for producing monoclonal antibodies in chinese hamster ovary cell

- cultures using a ph-dependent dynamic model," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 125, n°. 2, p. 245–250, févr. 2018.
- [43] M. C. Borys, D. I. Linzer et E. T. Papoutsakis, "Culture ph affects expression rates and glycosylation of recombinant mouse placental lactogen proteins by chinese hamster ovary (cho) cells," *Bio/Technology (Nature Publishing Company)*, vol. 11, n°. 6, p. 720–724, juin 1993.
- [44] D. R. Gray, S. Chen, W. Howarth, D. Inlow et B. L. Maiorella, "Co(2) in large-scale and high-density cho cell perfusion culture," *Cytotechnology*, vol. 22, n°. 1–3, p. 65–78, janv. 1996.
- [45] V. Restelli, M.-D. Wang, N. Huzel, M. Ethier, H. Perreault et M. Butler, "The effect of dissolved oxygen on the production and the glycosylation profile of recombinant human erythropoietin produced from cho cells," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 94, n°. 3, p. 481–494, juin 2006.
- [46] M. W. Handlogten, M. Zhu et S. Ahuja, "Intracellular response of cho cells to oxidative stress and its influence on metabolism and antibody production," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 133, p. 12–20, mai 2018.
- [47] J. van der Valk, K. Bieback, C. Buta, B. Cochrane, W. G. Dirks, J. Fu, J. J. Hickman, C. Hohensee, R. Kolar, M. Liebsch, F. Pistollato, M. Schulz, D. Thieme, T. Weber, J. Wiest, S. Winkler et G. Gstraunthaler, "Fetal bovine serum (fbs) : Past - present - future," *ALTEX*, vol. 35, n°. 1, p. 99–118, 2018.
- [48] M. S. Lao et D. Toth, "Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant chinese hamster ovary cell culture," *Biotechnology Progress*, vol. 13, n°. 5, p. 688–691, 1997.
- [49] T. Fu, C. Zhang, Y. Jing, C. Jiang, Z. Li, S. Wang, K. Ma, D. Zhang, S. Hou, J. Dai, G. Kou et H. Wang, "Regulation of cell growth and apoptosis through lactate dehydrogenase c over-expression in chinese hamster ovary cells," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, n°. 11, p. 5007–5016, juin 2016.
- [50] F. Hartley, T. Walker, V. Chung et K. Morten, "Mechanisms driving the lactate switch in chinese hamster ovary cells," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 115, n°. 8, p. 1890–1903, 2018.
- [51] P. Chen et S. W. Harcum, "Effects of amino acid additions on ammonium stressed cho cells," *Journal of Biotechnology*, vol. 117, n°. 3, p. 277–286, mai 2005.
- [52] M. S. Lao et D. Toth, "Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant chinese hamster ovary cell culture," *Biotechnology Progress*, vol. 13, n°. 5, p. 688–691, 1997.

- [53] P. Chen et S. W. Harcum, "Effects of elevated ammonium on glycosylation gene expression in cho cells," *Metabolic Engineering*, vol. 8, n°. 2, p. 123–132, mars 2006.
- [54] A. Poulain, "Caractérisation du système inductible au cumate pour la production de protéines thérapeutiques en cellules cho," avr. 2018. [En ligne]. Disponible : <http://hdl.handle.net/1866/21200>
- [55] T. A. Bibila et D. K. Robinson, "In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production," *Biotechnology Progress*, vol. 11, n°. 1, p. 1–13, 1995.
- [56] N. Ziv, N. J. Brandt et D. Gresham, "The use of chemostats in microbial systems biology," *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, n°. 80, p. 50168, oct. 2013.
- [57] F. Tapia, D. Vázquez-Ramírez, Y. Genzel et U. Reichl, "Bioreactors for high cell density and continuous multi-stage cultivations : options for process intensification in cell culture-based viral vaccine production," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, p. 2121–2132, 2016.
- [58] M.-F. Clincke, C. Mölleryd, Y. Zhang, E. Lindskog, K. Walsh et V. Chottea, "Very high density of cho cells in perfusion by atf or tff in wave bioreactor™. part i. effect of the cell density on the process," *Biotechnology Progress*, vol. 29, n°. 3, p. 754–767, mai 2013.
- [59] D. J. Karst, F. Steinebach, M. Soos et M. Morbidelli, "Process performance and product quality in an integrated continuous antibody production process," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 114, n°. 2, p. 298–307, févr. 2017.
- [60] M. Pappenreiter, H. Schwarz, B. Sissolak, A. Jungbauer et V. Chottea, "Product sieving of mab and its high molecular weight species in different modes of atf and tff perfusion cell cultures," *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 98, n°. 7, p. 1658–1672, 2023.
- [61] D. Voisard, F. Meuwly, P.-A. Ruffieux, G. Baer et A. Kadouri, "Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 82, n°. 7, p. 751–765, 2003.
- [62] D. J. Karst, E. Serra, T. K. Villiger, M. Soos et M. Morbidelli, "Characterization and comparison of atf and tff in stirred bioreactors for continuous mammalian cell culture processes," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 110, p. 17–26, juin 2016.
- [63] S. Wang, S. Godfrey, J. Ravikrishnan, H. Lin, J. Vogel et J. Coffman, "Shear contributions to cell culture performance and product recovery in atf and tff perfusion systems," *Journal of Biotechnology*, vol. 246, p. 52–60, mars 2017.
- [64] S. S. Ozturk, "Engineering challenges in high density cell culture systems," *Cytotechnology*, vol. 22, n°. 1–3, p. 3–16, janv. 1996.

- [65] J. E. Dowd, A. Jubb, K. E. Kwok et J. M. Piret, "Optimization and control of perfusion cultures using a viable cell probe and cell specific perfusion rates," *Cytotechnology*, vol. 42, n°. 1, p. 35–45, mai 2003.
- [66] S. Xu, J. Gavin, R. Jiang et H. Chen, "Bioreactor productivity and media cost comparison for different intensified cell culture processes," *Biotechnology Progress*, vol. 33, n°. 4, p. 867–878, juill. 2017.
- [67] H. Schwarz, Y. Zhang, C. Zhan, M. Malm, R. Field, R. Turner, C. Sellick, P. Varley, J. Rockberg et V. Chottea, "Small-scale bioreactor supports high density hek293 cell perfusion culture for the production of recombinant erythropoietin," *Journal of Biotechnology*, vol. 309, p. 44–52, févr. 2020.
- [68] R. R. Deshpande et E. Heinze, "On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of animal cell culture using microplates with integrated oxygen sensors," *Biotechnology Letters*, vol. 26, n°. 9, p. 763–767, mai 2004.
- [69] J. E. Dowd, A. Jubb, K. E. Kwok et J. M. Piret, "Optimization and control of perfusion cultures using a viable cell probe and cell specific perfusion rates," *Cytotechnology*, vol. 42, n°. 1, p. 35–45, mai 2003.
- [70] A. Bergin, J. Carvell et M. Butler, "Applications of bio-capacitance to cell culture manufacturing," *Biotechnology Advances*, vol. 61, p. 108048, déc. 2022.
- [71] Z. Lang, S. Yan, Q. Xiong et G. Chen, "Wave-based intensified perfusion cell culture for fast process development," *Biotechnology Letters*, vol. 45, n°. 9, p. 1117–1131, sept. 2023.
- [72] A. Neuss, T. Steimann, J. S. Tomas Borges, R. Dinger et J. B. Magnus, "Scale-up of cho cell cultures : from 96-well-microtiter plates to stirred tank reactors across three orders of magnitude," *Journal of Biological Engineering*, vol. 19, n°. 1, p. 5, janv. 2025.
- [73] M. Tregidgo, C. Lucas, M. Dorn et M. Micheletti, "Development of ml-scale pseudo-perfusion methodologies for high-throughput early phase development studies," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 195, p. 108906, juin 2023.
- [74] L. Lemire, S.-J. Reyes, Y. Durocher, R. Voyer, O. Henry et P. L. Pham, "N-1 semi-continuous transient perfusion in shake flask for ultra-high density seeding of cho cell cultures in benchtop bioreactors," *Biotechnology Progress*, p. e70029, avr. 2025.
- [75] M. Fink, M. Cserjan-Puschmann, D. Reinisch et G. Striedner, "High-throughput microbioreactor provides a capable tool for early stage bioprocess development," *Scientific Reports*, vol. 11, n°. 1, p. 2056, janv. 2021.
- [76] D. J. Sewell, R. Turner, R. Field, W. Holmes, R. Pradhan, C. Spencer, S. G. Oliver, N. K. Slater et D. Dikicioglu, "Enhancing the functionality of a microscale bioreactor

- system as an industrial process development tool for mammalian perfusion culture," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 116, n°. 6, p. 1315–1325, juin 2019.
- [77] M. Klimpel, B. Pflüger-Müller, M. A. Cascallana, S. Schwingal, N. I. Lal, T. Noll, V. Pirzdas et H. Laux, "Perfusion process intensification for lentivirus production using a novel scale-down model," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 122, n°. 2, p. 344–360, févr. 2025.
- [78] C. Guay, "Optimisation de la productivité des cellules cho inductibles au cumate pour la production de l'anticorps monoclonal palivizumab," Thèse de doctorat, Université Claude Bernard – Lyon 1, Faculté de Pharmacie, 2024, thèse d'exercice non publiée, Diplôme d'État de docteur en pharmacie, Filière Pharmacien-Ingénieur.
- [79] E. Suzuki et D. F. Ollis, "Enhanced antibody production at slowed growth rates : Experimental demonstration and a simple structured model," *Biotechnology Progress*, vol. 6, n°. 3, p. 231–236, 1990.
- [80] S. Alhuthali, P. Kotidis et C. Kontoravdi, "Osmolality effects on cho cell growth, cell volume, antibody productivity and glycosylation," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, n°. 77, p. 3290, janv. 2021.
- [81] J. T. Keane, D. Ryan et P. P. Gray, "Effect of shear stress on expression of a recombinant protein by chinese hamster ovary cells," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 81, n°. 2, p. 211–220, 2003.
- [82] S. Metze, S. Ruhl, G. Greller, C. Grimm et J. Scholz, "Monitoring online biomass with a capacitance sensor during scale-up of industrially relevant cho cell culture fed-batch processes in single-use bioreactors," *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 43, n°. 2, p. 193–205, févr. 2020.
- [83] I. Surowiec et J. Scholz, "Capacitance sensors in cell-based bioprocesses : online monitoring of biomass and more," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 83, p. 102979, oct. 2023.
- [84] E. S. C. Rittershaus, M. S. Rehmann, J. Xu, Q. He, C. Hill, J. Swanberg, M. C. Borys, Z.-J. Li et A. Khetan, "N-1 perfusion platform development using a capacitance probe for biomanufacturing," *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, vol. 9, n°. 4, p. 128, mars 2022.
- [85] M. Lederle, M. Tric, T. Roth, L. Schütte, A. Rattenholl, D. Lütkemeyer, S. Wölfli, T. Werner et P. Wiedemann, "Continuous optical in-line glucose monitoring and control in cho cultures contributes to enhanced metabolic efficiency while maintaining darbepoetin alfa product quality," *Biotechnology Journal*, vol. 16, n°. 8, p. e2100088, août 2021.
- [86]

- [87] T. De Beer, A. Burggraeve, M. Fonteyne, L. Saerens, J. P. Remon et C. Vervaet, “Near infrared and raman spectroscopy for the in-process monitoring of pharmaceutical production processes,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 417, n°. 1, p. 32–47, 2011.
- [88] L. Lemire, S.-J. Reyes, Y. Durocher, R. Voyer, O. Henry et P. L. Pham, “N-1 semi-continuous transient perfusion in shake flask for ultra-high density seeding of cho cell cultures in benchtop bioreactors,” n°. Compendex, 2025.
- [89] M. L. Lipscomb, M. C. Mowry et D. S. Kompala, “Production of a secreted glycoprotein from an inducible promoter system in a perfusion bioreactor,” *Biotechnology Progress*, vol. 20, n°. 5, p. 1402–1407, 2004.
- [90] R. Ohashi, E. Mochizuki, Y. Kamoshita et T. Suzuki, “High-level expression of the methanol-inducible -galactosidase gene by perfusion culture of recombinant pichia pastoris using a shaken ceramic membrane flask,” *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 86, n°. Compendex, p. 44–48, 1998.
- [91] A. Venereo-Sanchez, M. Simoneau, S. Lanthier, P. Chahal, L. Bourget, S. Ansorge, R. Gilbert, O. Henry et A. Kamen, “Process intensification for high yield production of influenza h1n1 gag virus-like particles using an inducible hek-293 stable cell line,” *Vaccine*, vol. 35, n°. 33, p. 4220–4228, 2017.
- [92] A. P. Manceur, H. Kim, V. Misic, N. Andreev, J. Dorion-Thibaudeau, S. Lanthier, A. Bernier, S. Tremblay, A.-M. Gélinas, S. Broussau, R. Gilbert et S. Ansorge, “Scalable lentiviral vector production using stable hek293sf producer cell lines,” *Human Gene Therapy Methods*, vol. 28, n°. 6, p. 330–339, déc. 2017.

**ANNEXE A : COMPOSITION DU MILIEU ET SOLUTION
D'ALIMENTATION**

TABLEAU .1 Composition du milieu BalanCD

Composant	Quantité
Milieu BalanCD	1 L
Kolliphor P188	1 g
MSX (50 mM)	1 mL
Antibiotiques	jusqu'à 10 mL

TABLEAU .2 Composition de la solution feed

Composant	Quantité
BalanCD CHO Feed 4	89,76 g
Bicarbonate de sodium	2200 mg
Kolliphor P188	1000 mg
MSX (50 mM)	1 mL
Antibiotique (optionnel)	jusqu'à 10 mL
Eau MilliQ	944 mL
Volume final	1000 mL