

# **Principes de base des systèmes de contrôle des processus et de l'automatisation - Types de méthodes d'analyse et comptage des cellules**

## Vos objectifs:

À la fin de la leçon, vous devriez être en mesure de déterminer l'importance du comptage des cellules.

**Les méthodes analytiques de contrôle en cours de fabrication (IPC)** peuvent être organisées en deux groupes :

- 1) en ligne ou on-line
- 2) hors-ligne ou off-line

Les premières (1) seront discutées, et ce sont des techniques utilisées pour suivre le processus en temps réel (par exemple, la température, le pH, l'oxygène dissous). Les secondes (2) sont utilisées dans le cadre du CQA (contrôle qualité analytique) pour suivre le même processus et déterminer s'il se situe dans les limites acceptables.

## **Pourquoi avoir besoin de plusieurs méthodes d'analyse?**

**Le CQA** fait partie des **cGMP** (current Good Manufacturing Practices : Bonnes Pratiques de Fabrication actuelles) qui concernent :

- l'échantillonnage
- la spécification
- les essais
- la documentation
- les procédures de libération

L'ensemble de ces éléments garantit que les tests nécessaires et pertinents sont effectués afin que les produits puissent être mis en circulation, mais seulement une fois que la qualité requise est atteinte.

## **Évaluations scientifiques pour les produits biologiques**

Les normes de test des produits précisées au paragraphe 21CFR 610/ICHQ6B des cGMP englobent pour la sécurité de la fabrication :

- la stérilité
- les mycoplasmes
- la pureté
- les agents viraux fortuits

et les évaluations **d'autres** caractéristiques du produit, notamment

- l'identité
- la viabilité
- la puissance

### Méthodes de IPC en ligne

Les méthodes analytiques quantitatives sont nécessaires pour :

- le comptage des cellules
- l'analyse des métabolites
- la quantification du produit
- la qualité du produit
- la détermination des contaminants

### Méthodes de comptage des cellules

- comptage au microscope
- Vi-Cell
- absorbance (par exemple, à 600nm)
- extrait à sec des cellules (pour les micro-organismes)
- unités formant colonies (pour les micro-organismes).

### Pourquoi le comptage des cellules est-il nécessaire ?

Nous devons connaître le nombre total de cellules, le nombre de cellules viables et la viabilité, afin de déterminer la **cinétique de croissance**. Chaque cellule produit une certaine quantité de protéines, appelée productivité spécifique (g de produit/nombre de cellules/h). Par conséquent, plus le nombre de cellules présentes est élevé, plus la quantité de produit formée sera importante.

Nous devons savoir dans quelle mesure la culture est reproductible (stable) d'une culture à l'autre.

Nous devons connaître l'état de santé de la culture, c'est-à-dire savoir combien de cellules sont présentes et combien d'entre elles sont réellement viables.

Nous devons savoir quand ajouter des inducteurs potentiels. Nous devons savoir quand récolter le produit.

La numération cellulaire peut être utilisée pour contrôler le taux d'alimentation d'un milieu frais afin d'obtenir une culture définie par lots, en continu ou par perfusion. Il est relativement facile de mesurer le nombre de cellules dans les cultures en suspension, mais pas aussi facile pour les cultures de cellules immobilisées. Comme il existe un risque important d'erreur dans

les techniques de comptage cellulaire, nous essayons d'automatiser ou de standardiser les techniques afin d'éviter toute variabilité.

### **Techniques de comptage cellulaire :**

#### **En ligne / on-line**

Pour les méthodes utilisées directement dans le bioréacteur, où aucun échantillonnage n'est nécessaire, ces méthodes peuvent fournir des mesures continues adaptées à la surveillance et au contrôle (technologie analytique des procédés, ou PAT) :

- Les méthodes directes consistent à mesurer les cellules en tant qu'objets solides (par exemple, turbidité / absorbance ; spectroscopie diélectrique ; spectroscopie NIR ; spectroscopie MIR).

Les méthodes indirectes mesurent un composant donné d'une cellule par rapport à son nombre de cellules (par exemple, la spectroscopie de fluorescence (mesure du NADH, ou hydrogène du nicotinamide adénine dinucléotide) ; la détermination du glucose ou d'autres produits ; les mesures de l'O<sub>2</sub> ou du CO<sub>2</sub>).

Les principales faiblesses de ces méthodes sont les suivantes

- la robustesse
- l'instabilité sur de longues périodes
- les interférences des autres composants de la cellule
- l'étalonnage des méthodes

#### **Hors ligne**

Cette méthode ne fait pas intervenir le bioréacteur, d'où la nécessité d'un échantillonnage (c'est-à-dire la nécessité de rompre la frontière stérile).

- Les méthodes directes impliquent la mesure des cellules en tant qu'objets solides (par exemple, poids sec des cellules ; comptage au microscope ; Vi-Cell® ; turbidité / absorbance ; spectroscopie diélectrique ; NIR ; MIR).
- Les méthodes indirectes mesurent certains composants d'une cellule qui sont liés au nombre de cellules (par exemple, la spectroscopie de fluorescence, qui mesure le NADH ; la détermination du glucose ou d'autres produits ; les mesures d'O<sub>2</sub> ou de CO<sub>2</sub>).

Les avantages et les inconvénients de la méthode indirecte sont les suivants... :

- facile à calibrer
- faible variation d'une personne à l'autre
- elle prend du temps
- fort besoin de main-d'œuvre

La principale faiblesse de cette méthode est la nécessité de rompre la frontière stérile et d'obtenir un échantillon caractéristique de **la culture entière**.