



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA)
Ecole doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)
Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP)
Laboratoire **Lipidomix**

THESE

Présentée à l'INPL par

Marie-Françoise CLINCKE

Ingénieur de l'Université de Technologie de Compiègne (UTC)

en vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE SUR LA QUANTITE ET LA QUALITE DE L'IFN- γ RECOMBINANT PRODUIT PAR DES CELLULES CHO AU COURS DE PROCEDES DISCONTINUS

Soutenue publiquement le 8 juillet 2010 devant la commission d'examen

Membres du jury :

Président du jury :	M. Yves-Jacques SCHNEIDER	Professeur à l'UCLouvain, Louvain-la-Neuve
Rapporteurs :	Mme Véronique CHOTTEAU	Directeur de Recherche au KTH, Royal Institute of Technology, Stockholm
	M. Yves-Jacques SCHNEIDER	Professeur à l'UCLouvain, Louvain-la-Neuve
Examineurs :	M. Jean-Louis GOERGEN	Professeur à l'ENSAIA-INPL, Nancy
	Mme Frances YEN POTIN	Directeur de Recherche INSERM, Lipidomix, Vandoeuvre-lès-Nancy
	Mme Virginie OGIER	Ingénieur, Responsable Recherche & Développement, Genclis, Vandoeuvre-lès-Nancy
	Mme Anne GREGOIRE	Directeur Scientifique, Cytheris, Issy-lès-Moulineaux
Invité :	M. Emmanuel GUEDON	Chargé de Recherche CNRS, LRGP, Nancy

Remerciements

Les travaux qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisés au sein du Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, dans le groupe « Bioprocédés – Biomolécules ». Je remercie M. Gabriel Wild, directeur du LRGP, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Ce projet ayant été effectué sous le dispositif Cifre, je tiens également à remercier la société Genclis et l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie.

J'aimerais exprimer ma reconnaissance envers Mme Frances Yen Potin du Laboratoire Lipidomix, pour avoir accepté d'encadrer cette thèse en qualité de Directrice. Je vous remercie pour votre contribution au bon déroulement de cette thèse ainsi que pour votre disponibilité et votre sympathie.

Je tiens à exprimer tout particulièrement ma reconnaissance envers mes co-directeurs de thèse, M. Jean-Louis Goergen et M. Emmanuel Guedon. A vous deux, merci pour la patience et la gentillesse que vous avez eues à mon égard. Je tiens à souligner que vos conseils, votre rigueur et vos connaissances scientifiques m'ont beaucoup apporté. Je vous suis reconnaissante du temps que vous avez su me consacrer pour répondre à mes nombreuses questions, mais également de l'autonomie et de la confiance que vous m'avez accordées.

J'exprime ma profonde gratitude à Mme Véronique Chotteau et M. Yves-Jacques Schneider pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Mes remerciements vont également à Mme Virginie Ogier et à Mme Anne Grégoire pour avoir accepté d'examiner ce travail et de participer au jury de thèse.

Au sein de Genclis, merci à Virginie pour avoir suivi ce travail, à Olivier pour ses conseils avisés en purification et un grand merci à Dagmar, Marie et Christelle pour m'avoir initiée au Western-blot et pour votre gentillesse. Merci aussi à Audrey et Nathalie pour le travail administratif.

Je voudrais sincèrement remercier tous les membres du groupe « Bioprocédés – Biomolécules », qui, chacun à leur façon, ont contribué à ce travail.

Je remercie vivement Mathilde, Caroline, Amal, Frédérique B., Emma, Naziha, Jean-Matthieu, Claudia, Françoise, Kenza, Evelyne et Fabrice pour les très bons moments que j'ai passés

avec eux dans la salle blanche (pour certains), au labo, au bureau ou tout simplement à Nancy. Un grand merci, tout particulièrement, à Kenza, Mathilde, Caroline, Amal, Françoise et Stéphanie pour votre soutien au cours de ces derniers mois et puis surtout pour nos inlassables discussions !

Je ne voudrais surtout pas oublier mes deux stagiaires, Frédérique M. et Iréna, qui ont fortement contribué à ces travaux de thèse. Un grand merci également aux étudiantes de 3^e année de l'ENSAIA de la Spé Biotech, Audrey, Ludmila et Iréna (Spé 2008), et Catherine, Fanny, Anaïs et Chloé (Spé 2009) pour leur enthousiasme et leur sympathie. Merci aussi à Fabrice, pour son savoir-faire technique et à Mickael, pour son aide en statistiques.

Mes pensées vont à mes amies de longue date, Camille, Elodie, Amélie, Suzanne, Karen et Caroline. Je ne pouvais pas faire de remerciements sans vous mentionner ! Merci de m'avoir permis de passer quelques mémorables vacances, week-end ou soirées tout au long de cette période de thèse.

Pour finir, mes derniers remerciements se tournent vers ma famille et vers Laurent.

Tout d'abord, je remercie du fond du cœur mes parents, et Anne-Sophie et J-E pour m'avoir écoutée durant ces trois années et puis, tout simplement, merci d'être toujours là pour moi. A Laurent, je sais que ces derniers mois furent assez fatigants mais grâce à une solidarité et un soutien sans faille, tu m'as aidée à aborder et terminer cette thèse de façon sereine. Je t'en suis, parmi tant d'autres choses, reconnaissante.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC : antibody-dependant cellular cytotoxicity	FucT : fucosyltransférase
ADN : acide désoxyribonucléique	GalNAc : N-acétylgalactosamine
ADNc : acide désoxyribonucléique codant	GlcNAc : N-acétylglucosamine
ADP : adénosine-5'-diphosphate	Glc : glucose
AMM : autorisation de mise sur le marché	Gln : glutamine
AMP : adénosine-5'-monophosphate	GMEM : Glasgow's modification of Eagle's medium
APMA : acide para-aminophenylmercurique	GnTIII : acétylglucosaminyltransférase III
ARN : acide ribonucléique	GPI : glycosyl-phosphatidylinositol
Asn : asparagine	GRAS : Generally Recognized as Safe
ATP : adénosine-5'-triphosphate	GUS : β -D-glucuronidase
BDM : protein-free basal defined medium (PF-BDM)	hCG : gonadotropine chronique humaine
BHK : baby hamster kidney	HCl : acide chlorhydrique
BME : Eagle's basal medium	HEK : Human embryonic kidney
BSA : bovine serum albumin	HLA-DR : antigènes d'histocompatibilité de classe II
CDG : congenital disorder of glycosylation	HLy : Hydroxylysine
CHO : Chinese hamster ovary	HMW : High molecular weight
CMC : Concentration micellaire critique	HPLC : chromatographie liquide à haute performance
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	HPr : Hydroxyproline
CMRL : Connaught Medical Research Laboratories	HS : Héparane Sulfate
CNX : calnexine	IFN : interféron
CRT : calréticuline	IFN-γR : récepteur à l'interféron-gamma
Dhfr : dihydrofolate réductase	Ig G : immunoglobuline G
DMEM : Dulbecco's modification of eagle's medium	IL : interleukine
DMSO : diméthylsulfoxyde	IMDM : Iscove's modified dulbecco's medium
DMT1 : DiMetal Transporter 1	JAK : Janus kinases
Dol-P : dolichol phosphate	LDH : Lactate deshydrogénase
DO : oxygène dissous	LFB : Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies
EBx : cellule souche embryonnaire de canard	LMW : Low molecular weight
EDTA : éthylène diamine tétra-acétique	LRGP : Laboratoire Réactions et Génie des Procédés
ELISA : enzyme linked immuno-sorbent assay	m : masse
EMEA : European Medical Agency	MCB : Master Cell Bank
EPO : érythropoïétine	MALDI : Matrix assisted laser desorption ionization
FCS-BDM : milieu BDM avec 5% de sérum	Man : mannose
FCS-RPMI : milieu RPMI avec 5% de sérum	M-CSF : macrophage colony-stimulating factor
FDA : Food and Drug Administration	MDCK : madin darby canine kidney
FSH : Follicle stimulating hormone	
Fuc : fucose	

MEC: Matrice extra-cellulaire
MMP: métalloprotéase
MTX: méthotrexate
NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NANA: acide N-acétyl-neuraminique
NeuAc : acide N-acétylneuraminique
NeuGc : acide N-glycolylneuraminique
NK: natural killers
NS0: myélome de souris
NTBI : non-transferrin bound iron
PERC.6 : cellules de la rétine humaine
PF-68 : pluronic F-68
PhRMA : Pharmaceutical Research and Manufacturers of America
PMSF: fluorure de phenylméthanesulfonyle
PNGase : peptide-N-glycosidase
PTM: modification post-traductionnelle
PtdEtn: phosphatidyléthanolamine
PtdSer: phosphatidylsérine
QbD: Quality by Design
Réf : référence
RE : reticulum endoplasmique
ROS : reactive oxygen species
rhM-CSF : macrophage colony-stimulating factor recombinant humain
RPMI : Roswell Park Memorial Institute
SDS : dodécylsulfate de sodium
SEAP :
Ser : sérine
Sf9 : Spodoptera frugiperda
SF-RPMI : milieu RPMI sans sérum
SIDA : syndrome d'immuno-déficience acquise
SiT : sialyltransférase
Sp2/0 : myélome de souris
STAT-1: Signal Transduction and Activator of Transcription – 1
TCA: cycle des acides tricarboxyliques
Tf : transferrine
TfR : récepteur de la transferrine
THP-1 : Human acute monocytic leukemia cell line
Thr : thréonine
TIBS: Transferrine-Insuline-Albumine-Sélénium
t-PA : activateur tissulaire du plasminogène
TNF: tumor necrosis factor
u-PA: activateur urinaire du plasminogène
VERO: kidney epithelial cells
vol : volume
WAP : Whey Acidic Protein
WCB : Working Cell Bank
YB2/0: myélome de rat

SOMMAIRE GENERAL

INTRODUCTION GENERALE.....	- 1 -
----------------------------	-------

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	- 9 -
-------------------------------	-------

1. Production de protéines recombinantes	- 13 -
2. Culture en masse de cellules animales.....	- 32 -
3. Hétérogénéité de structure protéique dans les cellules animales	- 62 -
4. Hétérogénéité de modifications co- ou post-traductionnelles des protéines chez les cellules animales.....	- 71 -
5. L'interféron-gamma humain.....	- 100 -

MATERIELS & METHODES.....	- 111 -
---------------------------	---------

1. Culture cellulaire	- 115 -
2. Dosages des métabolites et des produits extracellulaires	- 123 -
3. Production et caractérisation de l'interféron- γ	- 125 -
4. Calcul des paramètres cinétiques	- 131 -

RESULTATS & DISCUSSION	- 133 -
------------------------------	---------

1. Influence du milieu de culture sur la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ produit au cours de cultures de cellules CHO 320	- 137 -
2. Influence de différentes supplémentsations du milieu RPMI sur la croissance, le décès cellulaire, le métabolisme et la production de l'IFN- γ au cours de cultures de cellules CHO 320	- 149 -
3. Influence de la modification de la composition du milieu BDM (suppressions/supplémentsations de composés) sur la croissance, le décès cellulaire, le métabolisme et la production de l'IFN- γ au cours de cultures de cellules CHO 320.....	- 197 -
4. Influence de la composition des milieux de culture sur la qualité de l'IFN- γ produit par les cellules CHO 320: caractérisation de l'hétérogénéité de structure, de la macrohétérogénéité de la glycosylation et de la relation structure/activité.....	- 243 -

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES.....	- 277 -
---	---------

ANNEXES	- 291 -
---------------	---------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	- 297 -
----------------------------------	---------

Introduction générale

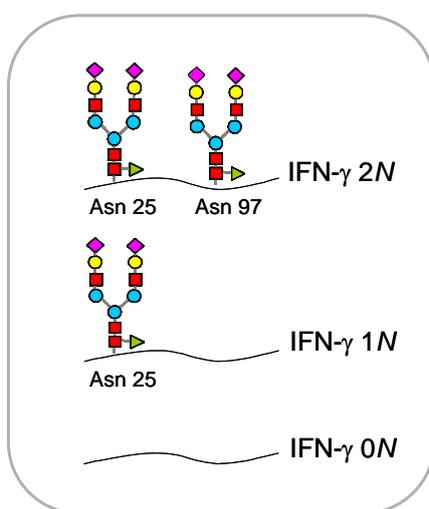
INTRODUCTION GENERALE

En janvier 2009, 151 molécules recombinantes, dites biopharmaceutiques, ont obtenu une autorisation de mise sur le marché délivrée par la *Food and Drug Administration* (FDA) et l'*European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA) (Ferrer-Miralles *et al.*, 2009). Parmi ces 151 molécules, 76 ont été produites à partir de cellules de mammifères. Nonobstant des concentrations de protéines produites largement supérieures et des contraintes de mise en œuvre beaucoup moins importantes, les systèmes d'expression bactériens n'autorisent pas la glycosylation des protéines et les levures ou cellules d'insecte ne permettent qu'une glycosylation incomplète. Avec plus de 50% des protéines humaines glycosylées, la glycosylation des protéines représente la modification post-traductionnelle majeure (PTM) (Wong, 2005). Outre la glycosylation, la production de protéines par les cellules animales présente l'avantage de pouvoir généralement assurer la plupart des PTMs, parmi lesquelles la sulfatation ou encore la protéolyse. Ainsi, les cellules de mammifères, et plus particulièrement la cellule CHO, apparaissent comme un système incontournable pour la production de protéines recombinantes complexes d'intérêt thérapeutique. En effet, les structures glycaniques des protéines recombinantes produites par les cellules CHO sont très similaires de celles des protéines humaines, ce qui confère un avantage certain pour la production de protéines complexes (Parekh, 1991; Hooker *et al.*, 1995; James *et al.*, 1995). Les rôles des oligosaccharides portés par ces protéines recombinantes sont nombreux. Ils permettent notamment le contrôle de la qualité de la protéine à travers l'interaction avec les molécules chaperonnes et autres récepteurs. Par ailleurs, ils participent au repliement correct de la protéine, à une protection contre la protéolyse et à une meilleure activité de la protéine. Ils augmentent la solubilité de la protéine, diminuent l'immunogénicité et permettent de moduler la demi-vie de la protéine (Curling *et al.*, 1990; Jenkins and Curling, 1994). La glycosylation apparaît donc comme un attribut indispensable au bon fonctionnement de nombreuses protéines.

Sur le plan des réglementations pharmaceutiques internationales, la FDA pour les Etats-Unis et l'EMA pour l'Union Européenne demandent sans cesse davantage de garanties sur la qualité, la sécurité, l'efficacité et la reproductibilité des produits commercialisés (EMA, 2002 ; EMA, 2003 ; Zoon, 2003 ; Mortellaro and Devine, 2007). Dans ce contexte, il est indispensable pour les industries pharmaceutiques de produire des protéines avec une qualité équivalente, autrement dit possédant la même structure primaire ainsi que la même glycosylation tout au long du procédé de culture. Or, le processus de glycosylation des protéines est complexe et la plupart des glycoprotéines se présentent sous de multiples

glycoformes. La notion de Quality by design (QbD) fait référence à une méthodologie pour laquelle l'impact d'une modification d'un ou plusieurs paramètre(s) opératoire(s) du procédé sur la qualité du produit est estimé et pris en considération. Cette approche répond aux nouvelles directives édictées notamment par la FDA pour la production de protéines thérapeutiques. Cependant, concernant la glycosylation des protéines recombinantes, les connaissances actuelles ne sont pas encore suffisantes pour permettre l'établissement d'une « corrélation » entre les paramètres physiologiques et cinétiques de croissance cellulaire et le profil de glycosylation de la glycoprotéine exprimée, si une corrélation est toutefois possible (Rathore and Winkle, 2009).

L'IFN- γ est une cytokine qui joue, entre autres, un rôle dans le système immunitaire et un rôle anti-viral. Cette protéine apparaît comme un bon modèle d'étude puisqu'elle possède deux sites de N-glycosylation sur les résidus asparagines 25 (Asn 25) et 97 (Asn 97) et aucun site de O-glycosylation (Figure 1). Trois glycoformes résultant de la variation d'occupation des sites de glycosylation peuvent être distinguées. On parle alors de macrohétérogénéité ou hétérogénéité de site. Ainsi, des molécules d'IFN- γ peuvent être glycosylées sur deux sites (glycoforme 2N), sur un site (glycoforme 1N) et sur aucun site (glycoforme 0N) (Curling *et al.*, 1990). La microhétérogénéité ou hétérogénéité de structure fait référence à la composition de l'enchaînement des oligosacharrides qui peut différer entre deux molécules d'IFN- γ par exemple. Depuis l'obtention de l'ADNc codant l'IFN- γ humain (Gray *et al.*, 1982), différentes



équipes de recherche ont étudié et mis en œuvre la production de l'IFN- γ par les cellules animales CHO (Devos *et al.*, 1984 ; Hayter *et al.*, 1991 ; Castro *et al.*, 1992 ; Lamotte, 1997 ; Mols, 2004 ; Kochanowski, 2005). Leurs travaux ont abouti à une littérature relativement abondante et en particulier, sur les relations entre les conditions de culture des cellules et la glycosylation de l'IFN- γ recombinant.

Figure 1 : représentation schématique des 3 types de glycoformes potentiellement présentes sur l'IFN- γ

Les conditions de culture peuvent influencer le métabolisme cellulaire et mener à des glycosylations différentes aussi bien en termes de macrohétérogénéité que de

microhétérogénéité. La composition du milieu de culture peut être la cause de modifications de la macrohétérogénéité de l'IFN- γ . En effet, les résultats des travaux de thèse de Nadine Kochanowski (2005) réalisés au LRGP ont montré, qu'au cours de cultures en mode discontinu, la glycoforme 2N est maintenue tout au long d'une culture réalisée avec le milieu BDM alors qu'avec le milieu RPMI supplémenté par du sérum (FCS-RPMI), une chute de la glycoforme 2N est observée après environ 50 h de culture (Kochanowski, 2005; Kochanowski *et al.*, 2008).

De façon à mieux comprendre les mécanismes conduisant à cette hétérogénéité de glycosylation, l'étude de facteurs intracellulaires tels que les nucléotides et les nucléotides-sucres a été effectuée par RP-HPLC au cours des travaux de Nadine Kochanowski (2005). Au moment où la proportion des molécules d'IFN- γ glycosylées sur deux sites chute, c'est-à-dire après 40 à 50 heures d'une culture réalisée en mode discontinu avec le milieu FCS-RPMI, la concentration en UDP-Glc et dans une moindre mesure celle de l'UDP-Gal sont plus faibles que celles obtenues avec le milieu BDM. La charge énergétique, calculée sur la base des concentrations en nucléotides, et de formule $(ATP+0,5ADP/ATP+ADP+AMP)$, représente la capacité de la cellule à produire de l'énergie par le recyclage des nucléotides phosphates. Sa valeur théorique maximale est égale à 1 (Atkinson and Walton, 1967). La charge énergétique de la cellule demeure constante et proche de 1 avec le milieu BDM alors qu'elle diminue au bout de 50 h de culture lorsque le milieu FCS-RPMI est utilisé.

L'étude de la composition du milieu BDM révèle qu'il s'agit d'un milieu riche en vitamines, acides aminés, cofacteurs et précurseurs nucléotidiques. Par ailleurs, il contient 3 composés supplémentaires par rapport au milieu RPMI:

- ✓ Le pluronic F-68
- ✓ le citrate de fer
- ✓ l'éthanolamine

L'ajout de vitamines, cofacteurs et autres précurseurs au milieu FCS-RPMI n'a pas permis de maintenir une charge énergétique élevée. En revanche, lorsque les 3 composés précédemment cités sont ajoutés au milieu FCS-RPMI, la charge énergétique est maintenue (Kochanowski *et al.*, 2007). Sur la base de ces résultats, il nous a semblé intéressant de centraliser nos travaux sur une étude plus approfondie de l'impact de ces 3 suppléments au cours de procédés de culture de cellules CHO produisant de l'IFN- γ recombinant.

Ce projet s'est inscrit dans le cadre d'une convention Cifre entre deux laboratoires de l'ENSAIA (Lipidomix et LRGP) et la société Genclis. Notre travail a visé à développer les connaissances concernant l'effet de la conduite de procédé sur la quantité et la qualité de

l'IFN- γ recombinant produit par des cellules de mammifères CHO, dont notamment la protéolyse et la glycosylation. Pour cela, 3 questions majeures ont motivé notre démarche :

- ✓ Peut-on définir les conditions de culture (composition du milieu - supplémentation) qui permettent le maintien d'un profil de glycosylation constant de l'IFN- γ au cours d'un procédé de culture de cellules CHO ?
- ✓ Peut-on éviter la formation de séquences tronquées de la forme non-glycosylée de l'IFN- γ produit par les cellules CHO ?
- ✓ Peut-on identifier une relation entre la qualité de la glycoprotéine étudiée et son activité ?

Dans l'objectif de répondre à ces différentes questions, la démarche présentée dans la Figure 2 a été adoptée au cours de notre étude.

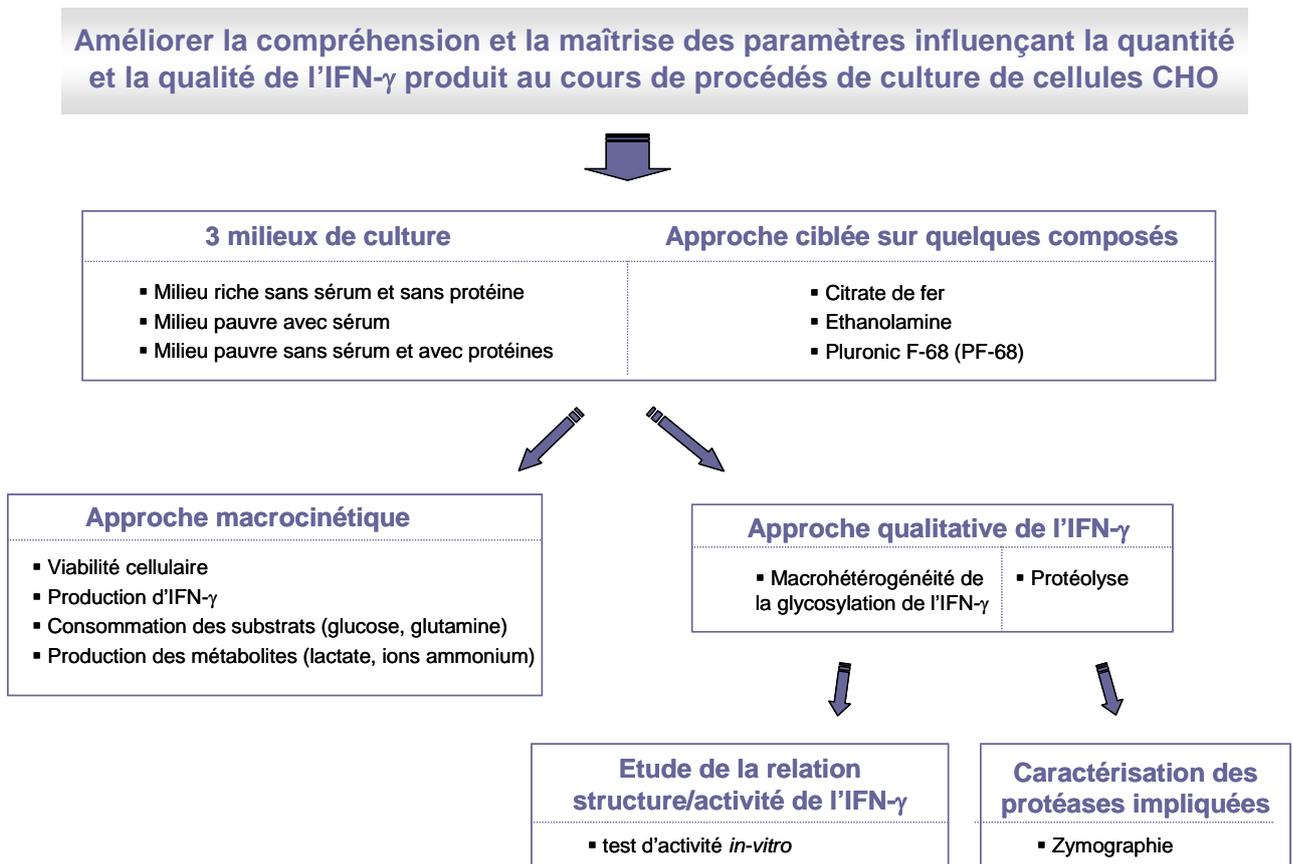


Figure 2 : Démarche expérimentale adoptée au cours de notre étude

Ce mémoire est structuré en sept parties.

La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique, et décrit notamment les différents systèmes d'expression utilisés pour la production de glycoprotéines à visée thérapeutique et diagnostique ainsi que leurs capacités de glycosylation. De plus, les connaissances actuelles relatives aux différents facteurs susceptibles d'influencer le processus de glycosylation dans les cellules animales sont présentées. Une description des différentes modifications post-traductionnelles (PTM) autres que la glycosylation retrouvées pour les protéines exprimées dans les cellules animales est également présentée ; un accent particulier est porté sur les données relatives à la protéolyse de l'IFN- γ au cours des procédés de culture.

La seconde partie détaille les différentes méthodologies expérimentales et les techniques analytiques utilisées au cours des travaux de cette thèse.

La troisième partie est un préambule qui permet de faire un état de l'art des travaux antérieurs à notre étude et sur lesquels nous nous sommes appuyés pour mettre en œuvre notre démarche expérimentale. La comparaison entre les performances cinétiques et physiologiques des cellules CHO obtenues à partir de deux milieux de culture différents est donc présentée. Il s'agit d'un milieu de culture riche sans protéine (milieu BDM) et d'un milieu pauvre contenant du sérum (milieu FCS-RPMI). Outre l'étude physiologique, les différences obtenues à partir de ces deux milieux en termes de macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ est également détaillée. L'obtention de résultats comparables à ceux obtenus antérieurement au LRGP a donc permis de consolider et valider notre démarche expérimentale.

La quatrième partie développe nos résultats concernant l'influence de la composition du milieu de culture sur la croissance, le décès et le métabolisme cellulaire ainsi que sur la production de l'IFN- γ . Des cultures discontinues de cellules CHO ont été mises en œuvre avec le milieu pauvre RPMI (avec ou sans sérum). L'influence de la présence des composés tels que le citrate de fer, le pluronic F-68 et l'éthanolamine a été étudiée dans le milieu RPMI sans sérum. En outre, l'impact du citrate de fer et de différentes formes biodisponibles du fer a été caractérisé pour des cultures réalisées avec le milieu FCS-RPMI.

Dans la cinquième partie de ce mémoire, nous avons étudié l'impact de suppléments du milieu riche BDM sur les performances cinétiques et physiologiques des cellules CHO. Nous avons donc ajouté du sérum au milieu riche BDM et comparé les performances cinétiques et physiologiques obtenues en présence ou en absence de sérum. Nos travaux se sont par la suite recentrés sur deux des composés (pluronic F-68 et citrate de fer) étudiés dans la quatrième partie. En effet, un rôle important de ces deux composés a été montré en termes de

croissance et de décès cellulaires pour le citrate de fer et en termes de production pour le citrate de fer et le pluronic F-68 dans les conditions de culture présentées dans le 4^e volet de ce mémoire. Nous nous sommes donc attachés à l'étude de l'influence de ces deux composés sur la croissance, le décès et le métabolisme cellulaires ainsi que sur la production de l'IFN- γ pour des cultures de cellules CHO réalisées avec le milieu riche BDM supplémenté ou non avec du sérum.

Dans la sixième partie du document, afin de comprendre les propriétés physiologiques et cinétiques susceptibles d'influencer la glycosylation de l'IFN- γ , la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ a été caractérisée pour la plupart des cultures détaillées dans les 4^e et 5^e volets de ce mémoire. Par ailleurs, alors que peu d'études sont consacrées à la caractérisation d'enzymes protéolytiques présentes dans les milieux de cultures ou produites par les cellules CHO, nous nous sommes intéressés à la mise en évidence des enzymes protéolytiques présentes dans nos conditions de culture. Ces analyses nous ont permis de suspecter certaines activités protéasiques dont notamment celle(s) susceptible(s) d'être responsable(s) de la formation de la séquence tronquée de la forme non-glycosylée de l'IFN- γ . Outre leur caractérisation, notre étude a permis de maîtriser l'activité de ces protéases et donc d'éviter l'obtention d'une séquence tronquée de la forme non-glycosylée de l'IFN- γ . Dans ce 6^e volet du mémoire, la relation structure/fonction de l'IFN- γ a également été étudiée *in-vitro*.

Enfin, la dernière partie de ce mémoire est consacrée aux conclusions et aux perspectives découlant de ce travail.

Synthèse Bibliographique

Synthèse bibliographique

1. PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES	- 13 -
1.1. Les enjeux économiques	- 13 -
1.2. Les différents systèmes d'expression, les avantages et les inconvénients	- 16 -
1.2.1. Introduction	- 16 -
1.2.2. Les procaryotes	- 18 -
1.2.3. Les eucaryotes	- 19 -
1.2.3.1. Les levures	- 20 -
1.2.3.2. Les cellules d'insecte	- 22 -
1.2.3.3. Les cellules de mammifère	- 23 -
1.2.4. Les organismes pluricellulaires	- 24 -
1.2.4.1. Les plantes transgéniques	- 24 -
1.2.4.2. Les animaux transgéniques	- 27 -
1.2.5. Conclusions	- 30 -
2. CULTURE EN MASSE DE CELLULES ANIMALES	- 32 -
2.1. Origine de la lignée cellulaire CHO utilisée pour produire les protéines recombinantes	- 32 -
2.2. Milieux de culture et métabolisme des cellules de mammifère en culture	- 32 -
2.2.1. Les milieux de base	- 33 -
2.2.2. Les principaux constituants des milieux	- 34 -
2.2.2.1. Le glucose et son métabolisme	- 34 -
2.2.2.2. La glutamine et son métabolisme	- 35 -
2.2.2.3. Les acides aminés	- 38 -
2.2.2.4. Les éléments minéraux	- 38 -
2.2.2.5. Les vitamines et les cofacteurs	- 39 -
2.2.2.6. Les lipides	- 40 -
2.2.2.7. Les nucléotides et nucléosides	- 41 -
2.2.2.8. Les tampons pH	- 41 -
2.2.2.9. Le sérum de veau foetal	- 41 -
2.2.3. Les milieux sans sérum	- 42 -
2.2.3.1. Les facteurs de croissance	- 43 -
2.2.3.2. La transferrine, l'insuline, l'albumine et le sélénium (TIBS)	- 43 -
2.2.3.3. Les formes de transport et de stockage du fer de faible poids moléculaire	- 46 -
2.2.3.4. Les hydrolysats protéiques	- 48 -
2.2.3.5. Les surfactants	- 50 -
2.3. Les modes de culture et les technologies des bioréacteurs	- 53 -
2.4. La mort cellulaire	- 57 -
2.4.1. Les mécanismes de mort cellulaire	- 57 -
2.4.1.1. La nécrose	- 57 -
2.4.1.2. L'apoptose	- 58 -
2.4.2. La mort cellulaire en systèmes de culture agités	- 60 -
2.4.2.1. Impact de l'environnement	- 60 -
2.4.2.2. Stratégies de limitation de la mort cellulaire	- 61 -
3. HETEROGENEITE DE STRUCTURE PROTEIQUE DANS LES CELLULES ANIMALES	- 62 -
3.1. Infidélité de transcription	- 62 -

3.2. Protéolyse.....	- 63 -
3.2.1. Classification des enzymes protéolytiques	- 63 -
3.2.2. Protéolyse et localisation cellulaire	- 64 -
3.2.3. Les protéases extracellulaires	- 65 -
4. HETEROGENEITE DE MODIFICATIONS CO- OU POST-TRADUCTIONNELLES DES PROTEINES CHEZ LES CELLULES ANIMALES	- 71 -
4.1. La glycosylation des protéines dans les cellules animales	- 73 -
4.1.1. La O-glycosylation	- 74 -
4.1.2. La N-glycosylation	- 75 -
4.1.3. La biosynthèse des N-glycosylprotéines dans les cellules de mammifère	- 77 -
4.1.3.1. Les précurseurs nucléotidiques	- 77 -
4.1.3.2. Les glycosyltransférases.....	- 78 -
4.1.3.3. La glycosylation dans le réticulum endoplasmique rugueux.....	- 78 -
4.1.3.4. Maturation des glycoprotéines dans le RE et l'appareil de Golgi.....	- 81 -
4.1.3.5. Le contrôle qualité des N-glycosylprotéines	- 83 -
4.1.3.6. L'UPR dans les cellules de mammifère.....	- 85 -
4.1.4. La macro- et la microhétérogénéité de la glycosylation et les techniques de caractérisation	- 86 -
4.1.5. La nécessité de produire des protéines recombinantes thérapeutiques de qualité constante	- 87 -
4.1.5.1. Les modifications physicochimiques dues aux glycannes	- 89 -
4.1.5.2. Les modifications du temps de demi-vie dues aux glycannes	- 90 -
4.1.5.3. Les modifications biologiques dues aux glycannes	- 91 -
4.1.6. Les paramètres opératoires pouvant influencer la glycosylation	- 94 -
4.1.6.1. Choix de la lignée cellulaire	- 94 -
4.1.6.2. Choix du mode de culture	- 95 -
4.1.6.3. Paramètres contrôlés	- 95 -
4.1.6.4. Milieux de culture.....	- 96 -
4.1.6.5. Ingénierie cellulaire	- 98 -
4.1.6.6. Ingénierie génétique	- 98 -
4.1.6.7. Stratégies pour les années à venir.....	- 99 -
5. L'INTERFERON-GAMMA HUMAIN.....	- 100 -
5.1. Historique	- 100 -
5.2. Structure protéique.....	- 100 -
5.3. Principales activités biologiques.....	- 101 -
5.3.1. Principales activités <i>in-vitro</i>	- 101 -
5.3.2. Principales activités <i>in-vivo</i>	- 102 -
5.4. Rôle et utilisation thérapeutique.....	- 102 -
5.5. Protéolyse de l'IFN- γ recombinant produit par les cellules CHO.....	- 103 -
5.5.1. Cultures de cellules CHO en présence de sérum.....	- 103 -
5.5.2. Cultures de cellules CHO en absence de sérum	- 105 -
5.6. Rôle des glycannes de l'IFN- γ	- 108 -
5.6.1. A l'échelle de la macrohétérogénéité de la glycosylation	- 108 -
5.6.2. A l'échelle de la microhétérogénéité de la glycosylation.....	- 108 -
5.7. Le récepteur membranaire de signalisation de l'IFN- γ : IFN- γ R	- 109 -

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Production de protéines recombinantes

1.1. Les enjeux économiques

Grâce aux progrès accomplis dans les techniques du génie génétique, l'introduction dans une cellule procaryote ou eucaryote d'un gène provenant d'un autre organisme a permis d'utiliser la cellule hôte en tant qu'usine de production de protéines recombinantes. Ceci n'a été possible que grâce aux nombreuses découvertes antérieures :

- la structure de l'ADN par James Watson, Francis Crick et Rosalind Franklin en 1953,
- la structure chimique de l'insuline du porc par Sanger en 1955,
- le code génétique par Marshall Nirenberg et Severo Ochoa en 1965,
- le premier organisme recombinant par Stanley Cohen et Herbert Boyer en 1973,
- la création du premier hybridome recombinant par César Milstein et Georges Köhler en 1975,
- la production du premier anticorps monoclonal à usage diagnostique en 1982.

Enfin, en 1982, la 1^{ère} autorisation de mise sur le marché (AMM) a été obtenue par Genentech, Inc. to Eli Lilly pour la production d'une protéine à usage thérapeutique (insuline) appelée « humulin ». Cette protéine est encore utilisée de nos jours par les patients diabétiques.

Depuis cette approbation, plus de 120 médicaments recombinants ont obtenu une AMM (Dingermann, 2008). Dans le domaine de la santé, le développement des biotechnologies a donc contribué à la mise au point de nombreuses molécules thérapeutiques : l'insuline recombinante pour le traitement du diabète se substitue depuis plus de vingt ans aux produits d'extraction; le facteur VIII pour le traitement de l'hémophilie... Toutes ces molécules recombinantes permettent d'apporter une meilleure tolérance et une sécurité sanitaire accrue. De nos jours, des millions de patients ont déjà pu bénéficier de ces nouveaux médicaments et vaccins issus des biotechnologies.

Ainsi, de nombreux médicaments recombinants ont été mis au point tels que les hormones de croissance, les vaccins ou encore les anticorps monoclonaux. En moyenne, le processus de mise sur le marché d'un biomédicament prend 10 à 15 années. En effet, parmi 5000 molécules testées en phases d'essais pré-cliniques, seules 5 parviennent en phases d'essais cliniques (phases I à III). Enfin, parmi ces 5 molécules, une seule en moyenne sera acceptée par les organismes de réglementations tels que la FDA ou l'EMA avant de passer en phase d'essai

clinique IV et être mise sur le marché (PhRMA, 2008). Selon le rapport de l'Agence Européenne des médicaments (EMA) édité en 2008, 633 médicaments recombinants sont en phase d'essais cliniques ou sous instance d'être approuvés par la FDA. Ces médicaments seront utilisés pour le traitement de plus de 100 pathologies dont les cancers (254 médicaments), les maladies infectieuses (162 médicaments), les maladies auto-immunes (59 médicaments) ou encore le SIDA (34 médicaments) (PhRMA, 2008). La répartition de l'ensemble de ces médicaments recombinants en fonction du type de molécules ou de pathologies traitées est répertoriée dans la Figure 3.

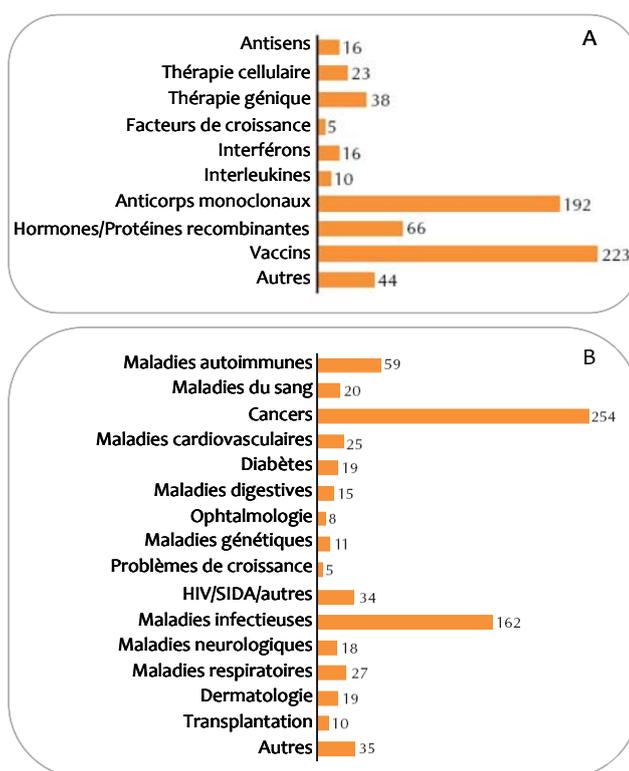


Figure 3 : Médicaments en développement issus des biotechnologies regroupés par catégorie de produits (A) et par catégorie d'application thérapeutique (B) (d'après PhRMA, 2008).

Les protéines recombinantes constituent le moteur de la croissance biotechnologique et les enjeux économiques sont colossaux. Le marché mondial des protéines recombinantes est aujourd'hui en pleine expansion et s'élève à 50 milliards de dollars (Matasci *et al.*, 2009). Ainsi, la croissance du marché des biomédicaments devrait conduire à un quadruplement des capacités mondiales de production sur cellules de mammifères avec une demande qui passerait de 625 000 litres en 2003 à 2,5 millions de litres en 2010. Parmi les nouveaux biomédicaments en plein essor, les anticorps monoclonaux et les vaccins recombinants constituent 2 classes dominantes (Figure 3 & Tableau 1).

Tableau 1 : Liste des produits recombinants à usage thérapeutique issus des biotechnologies et soumis à la FDA en vue d'être approuvés (d'après PhRMA, 2008)

Nom de produit	Molécule	Société	Indication
<i>Traitement contre les maladies auto-immunes</i>			
Actemra®	Anticorps monoclonal	Roche	Arthrite rhumatoïde
Ampligen®	ARN	Hemispherex Biopharma	Syndrome de fatigue chronique
Cimzia™	Anticorps monoclonal	Nektar Therapeutics	Arthrite rhumatoïde
Golimumab	Anticorps monoclonal	Centocor	Spondylarthrite ankylosante, arthrite psoriasique, arthrite rhumatoïde (IV)
Nplate™	Protéine de fusion	Amgen	Purpura thrombopénique auto-immun
<i>Traitement contre le cancer</i>			
Advexin®	Thérapie génique	Introgen Therapeutics	Cancer du cerveau et du cou
Genasense®	ARN antisens	Centa	Leucémie Lymphocytaire Chronique
PEG-IntronA®	Interféron	Schering-Plough	Mélanome malin
Provenge®	Vaccin	Dendreon	Cancer de la prostate
<i>Traitement contre les maladies cardiovasculaires</i>			
Angiomax®	Protéine	The Medicines Company	Syndrome coronarien aigu
<i>Traitement contre le SIDA</i>			
Serostim®	Hormone de croissance	EMD Serono	syndrome HIV associé au syndrome de redistribution du tissu adipeux
Cervarix® HPV vaccine	Vaccin	MedImmune GlaxoSmithKline	Prévention contre le papilloma virus
<i>Traitement contre les maladies infectieuses</i>			
DTaP	vaccin	GlaxoSmithKline	Diphtérie, coqueluche, tétanos (pour adulte)
FluBIOk™	Vaccin	Protein Sciences	Grippe
IC-51	Vaccin	Intercell Novartis Pharmaceuticals	Prévention de l'encéphalopathie japonaise
Numax®	Anticorps monoclonal	MedImmune	Prévention du virus respiratoire syncytial
Pentacel®	Vaccin	sanofi pasteur	Diphtérie, tétanos, coqueluche, poliomyélite
<i>Traitement contre les maladies de peau</i>			
Anti-IFN- γ	Anticorps polyclonal	Advanced Biotherapy	Psoriasis
Enbrel®	Protéine de fusion	Amgen	Psoriasis (pour enfant et adolescent)
ustekinumab	Anticorps monoclonal	Centocor	Psoriasis
<i>Autres maladies</i>			
LeukoScan®	Anticorps monoclonal	Immunomedics	Infection des os, appendicite atypique

1.2. Les différents systèmes d'expression, les avantages et les inconvénients

1.2.1. Introduction

Une protéine recombinante résulte de l'expression par un organisme ou une cellule hôte d'un ADN recombiné, étranger ou non. Un système efficace de production de protéines recombinantes s'appuie sur un gène ou un ADN complémentaire (ADNc) codant la protéine d'intérêt, un vecteur d'expression transportant le gène d'intérêt et une cellule hôte qui « exécute » les instructions fournies par la séquence codante pour synthétiser la protéine.

Compte tenu du temps nécessaire à la mise au point et au développement d'un procédé de production, et de l'investissement financier engendré par la commercialisation d'un produit biopharmaceutique, il est nécessaire de choisir judicieusement le système d'expression. Plusieurs systèmes sont aujourd'hui disponibles et chacun d'eux possède des avantages et des inconvénients. Le choix de l'hôte d'expression sera en partie dicté par les impératifs économiques, mais la qualité du produit recombinant est également un paramètre déterminant, en particulier pour des produits destinés à être administrés chez l'homme.

Ces protéines peuvent subir de multiples modifications post-traductionnelles, assurant aussi leur stabilité et leur activité *in-vivo*. Ces modifications incluent notamment la protéolyse, la désamination, la sulfatation et la glycosylation (cf. paragraphe 4 de la synthèse bibliographique). Ces modifications se produisent après la traduction de l'ARN messager en une chaîne d'acides aminés et sont spécifiques du type cellulaire considéré. Parmi les modifications requises pour assurer les fonctions biologiques de la protéine, la glycosylation représente la modification la plus importante. Les glycanes associés aux protéines sont extrêmement variables en fonction de l'hôte dans lequel la protéine d'intérêt est exprimée.

Les protéines recombinantes peuvent donc être produites à partir de différents systèmes d'expression tels que les organismes unicellulaires (cellules procaryotes ou eucaryotes) et les organismes pluricellulaires (plantes et animaux transgéniques). Il est très important de choisir le système d'expression le plus approprié en fonction de l'utilisation envisagée de la protéine recombinante.

D'un côté, les systèmes bactériens tels que le système *E. coli* font preuve d'une croissance robuste et d'une grande capacité à produire des protéines recombinantes. Toutefois, ces protéines peuvent se retrouver sous forme de corps d'inclusion, ce qui rend leur purification sous forme active très difficile. Malheureusement, ces bactéries sont incapables de synthétiser des structures glycaniques à la surface des protéines recombinantes. D'un autre côté, les cellules animales telles que les lignées CHO, BHK (Baby Hamster Kidney) et les

myélomes NS0 ne sont pas capables de produire de protéines recombinantes en quantité aussi importante qu'*E. coli*. En revanche, elles sont capables de synthétiser des protéines de grande taille ainsi que des structures glycaniques proches de celles retrouvées chez les glycoprotéines humaines. Les cellules d'insecte via le système d'expression baculovirus offrent une situation intermédiaire entre les bactéries et les cellules de mammifère. En effet, des concentrations élevées de protéines recombinantes exprimant des structures glycaniques simples peuvent être obtenues. Malheureusement, la glycosylation de ce système se limite souvent à des structures glycaniques de type oligomannosidique (cf. paragraphe 1.2.3.2 de la synthèse bibliographique).

Ainsi, en fonction de la finalité de la protéine recombinante, *E. coli*, les cellules d'insecte, ou CHO, BHK, NS0 et SP/20 peuvent être des hôtes de choix. Parmi ceux-ci, les cellules CHO représentent certainement le meilleur système d'expression pour produire des glycoprotéines recombinantes avec un profil de *N*-glycosylation complexe puisqu'elles sont majoritairement utilisées aussi bien en recherche académique que dans l'industrie.

Tableau 2 : Exemples de protéines recombinantes thérapeutiques produites dans différents systèmes d'expression et commercialisées (1^{ère} AMM pour chaque système d'expression).

Nom Commercial	Société	Catégorie	Système d'expression	Indication	AMM
Humulin®	Eli Lilly	Insuline	<i>E.coli</i>	Diabète	1982
RECOMBIVAX HB®	Merck	Vaccin Recombinant	Levures (<i>S.cerevisiae</i>)	Prévention de l'Hépatite B	1986
Activase®	Genentech	Tissue plasminogen facteur (tPA)	Cellules animales (CHO)	Infarctus du myocarde	1987
Concert™	Dow Agrisciences	Vaccin	Plantes (non-nicotine tobacco)	Maladie de Newcastle chez les volailles	2006
ATryn®	GTC Biotherapeutic	Antithrombine III	Animaux transgéniques (Chèvre)	Thromboses	2006
Cervarix®	GSK	Vaccin contre le Papillomavirus	Cellules d'insecte	Cancer du col de l'utérus	2007

1.2.2. Les procaryotes

La bactérie *E. coli* fut et reste le premier hôte utilisé pour la production de protéines recombinantes, la première protéine recombinante (insuline) ayant été mise sur le marché en 1982. Ses avantages incontestables sont une excellente caractérisation génétique et physiologique, un temps de génération court et une bonne adaptation à la culture en masse. De nombreux vecteurs plasmidiques ont été construits et sont disponibles afin d'insérer et exprimer un gène étranger. Cette bactérie possède une grande capacité à accumuler des protéines étrangères, puisque ces dernières peuvent représenter plus de 20% des protéines cellulaires totales. Le niveau d'expression de la protéine recombinante peut atteindre plusieurs grammes par litre. Toutefois, *E. coli* est parfois incapable de synthétiser des protéines recombinantes possédant une conformation tridimensionnelle identique à celle de la protéine naturelle, en raison de l'absence de protéines chaperonnes spécifiques (Baneyx and Mujacic, 2004). De plus, les protéines recombinantes sont souvent accumulées dans le cytoplasme sous formes d'agrégats protéiques insolubles, appelés corps d'inclusions (Fischer *et al.*, 1993; Kane and Hartley, 1988). Il est souvent difficile de récupérer ces protéines mal repliées, car les étapes successives de dénaturation et de renaturation sont susceptibles d'amoinrir l'activité biologique des protéines. Toutefois, de nombreuses études sont menées afin d'améliorer l'expression et le repliement des protéines recombinantes produites par *E. coli* ; (i) l'utilisation de différents promoteurs, (ii) l'utilisation de différentes souches hôtes, (iii) l'expression de protéines chaperonnes, (iv) la diminution de la température, (v) la sécrétion des protéines dans l'espace périplasmique ou dans le milieu de culture, (vi) le changement du milieu de croissance cellulaire, (vii) l'ajout de protéines de fusion, (viii) l'expression d'un fragment de la protéine, (ix) ou encore la dénaturation et le repliement de la protéine *in-vitro* (Chou, 2007; Maldonado *et al.*, 2007; Mergulhao *et al.*, 2005 ; Shiloach and Fass, 2005; Swartz, 2001 ; Wong *et al.*, 2008).

Le rhM-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) a par exemple, été produit sous forme active, avec un taux de repliement proche de 95%, après une dénaturation suivie d'une renaturation en présence de glutathion réductase et de faibles concentrations en agents dénaturants comme l'urée ou le chlorure de guanidium (Tran-Moseman *et al.*, 1999).

Depuis quelques années, une bactérie à Gram négatif, autre qu'*E. coli*, est également utilisée pour produire des protéines recombinantes. Il s'agit de *Ralstonia eutropha* (Barnard *et al.*, 2004). L'enzyme organophosphorylase, connue pour être produite sous forme de corps

d'inclusion chez *E. coli* avec une concentration inférieure à 0,1 g/L, a été produite avec succès chez *R. eutropha*, à une concentration de 10 g/L.

Pour conclure, la principale limite du système bactérien est l'obtention de protéines ayant un repliement correct et l'impossibilité de réaliser les modifications post-traductionnelles, en particulier la glycosylation (Swartz, 2001). Soulignons toutefois que des protéines possédant des *N*-glycannes ont été détectées chez *Campylobacter jejuni*, une bactérie à Gram négatif (Wacker *et al.*, 2002). Néanmoins, les structures *N*-glycanniques identifiées (heptasaccharide composé d'un bacillosamine, de résidus GalNac et d'un glucose) diffèrent considérablement de celles retrouvées sur les glycoprotéines des systèmes d'expression classiquement utilisés. Enfin, il est important de s'assurer de l'absence d'endotoxines dans les protéines purifiées lorsque le système *E. coli* est utilisé.

Tableau 3 : Principaux avantages et inconvénients du système d'expression *E. coli* (d'après Demain and Vaishnav, 2009).

Avantages	Inconvénients
✓ Expression rapide	✓ Difficulté pour assurer les ponts disulfures corrects sauf dans le périplasma
✓ Concentrations élevées	✓ Protéines non glycosylées
✓ Caractéristiques génétiques bien établies	✓ Protéines produites avec des endotoxines
✓ Facilités pour la culture en masse et pour les modifications génétiques	✓ Formation d'acétate limitant la croissance cellulaire
✓ Coût peu élevé	✓ Corps d'inclusion inactifs

1.2.3. Les eucaryotes

Les cellules eucaryotes telles que les levures, les cellules d'insecte (H5, Sf-9, -21), les cellules de rein de hamster nouveau-né (BHK), les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO), les hybridomes et les myélomes de souris NS0 ou SP2/0 sont des systèmes appropriés pour exprimer des protéines complexes nécessitant des modifications post-traductionnelles telles que les ponts disulfures, les *N*- et *O*-glycosylations, les ancras glycosyl-phosphatidylinositol (GPI), qui sont le résultat de l'association d'une protéine, d'un oligosaccharide et d'un lipide.

1.2.3.1. Les levures

Depuis l'antiquité, les levures sont utilisées dans l'alimentation humaine, pour la fabrication du pain et des boissons alcoolisées. La plus connue est *Saccharomyces cerevisiae*, la levure de boulanger. Elles sont capables de proliférer rapidement dans un milieu simple, peu coûteux et en absence de facteurs de croissance d'origine animale. Elles ont de nombreux avantages par rapport aux bactéries. En effet, ce sont des cellules eucaryotes qui peuvent potentiellement synthétiser et sécréter certaines protéines recombinantes matures. En outre, s'adaptant bien à la culture en masse, les fermentations produisent en général une haute densité cellulaire et le taux d'expression de la protéine hétérologue est généralement voisin de la centaine de milligrammes par litre. Les levures offrent également l'avantage de n'être ni pyrogènes, ni pathogènes (organismes GRAS, *Generally Recognized As Safe*) et constituent ainsi un organisme de choix pour la production de protéines à visée thérapeutique. D'autre part, la sécrétion des protéines hétérologues peut être effective chez les levures, elle fonctionne très bien pour de petits polypeptides comme l'insuline, mais les résultats sont moins probants pour les protéines de grande taille. Les protéines synthétisées restant souvent à l'intérieur du cytoplasme, il est donc nécessaire de lyser les cellules pour pouvoir récupérer la protéine d'intérêt. Les levures s'avèrent être incapables d'assurer la sécrétion et le bon repliement des anticorps monoclonaux. Par ailleurs, certaines levures présentent l'inconvénient majeur de ne permettre aucune glycosylation des protéines ou une glycosylation différente de celle retrouvée au niveau des protéines humaines. La co-expression de la protéine d'intérêt avec cinq glycosyltransférases a permis d'obtenir des protéines recombinantes avec une glycosylation complexe de type GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ (Hamilton *et al.*, 2003). Ainsi, avec les progrès de l'ingénierie cellulaire, il est envisageable que le système d'expression des levures puisse permettre la production de protéines pharmaceutiques complexes dans les années à venir. Toutefois, le vaccin contre l'hépatite B produit par *Saccharomyces cerevisiae* n'a, par exemple, pas de pont disulfure, bien que les levures soient capables de le former. Ainsi, les modifications post-traductionnelles ne seront probablement pas possibles pour toutes les protéines.

D'autres organismes semblent être de bons candidats pour la production de protéines recombinantes. Il s'agit notamment des levures méthylophes qui peuvent utiliser comme substrat le méthanol, également inducteur de la production de la protéine recombinante (sous le contrôle du promoteur de l'alcool oxydase). Les 4 principaux genres de levures

méthylotrophes connus sont *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* et *Torulopsis*. Ces derniers peuvent avoir une croissance atteignant des densités de 130 g/L (Gellison *et al.*, 1992). Plus de 400 protéines recombinantes ont été exprimées chez *P. pastoris*, la plupart étant d'origine humaine ou mammalienne (Cereghino and Cregg, 2000). Le rendement de production est généralement meilleur que dans *S. cerevisiae*. Un précurseur de l'insuline a par exemple été produit à 1,5 g/L (Wang *et al.*, 2001). Le gène d'intérêt peut être placé sous le contrôle du promoteur de l'alcool oxydase (AOX1), réprimé en présence de glucose et inductible en présence de méthanol. Dernièrement, le β -amyloïde 1-42 recombinant humain a été synthétisé dans la levure sous contrôle de ce promoteur. Après deux étapes de purification, la protéine fonctionnelle a pu être obtenue avec une concentration de 355 mg/L (Shen *et al.*, 2008). Un autre avantage de l'utilisation des levures méthylotrophes est le recours de celles-ci à la respiration plutôt qu'à la fermentation, permettant ainsi d'atteindre des rendements énergétiques plus élevés et en conséquence, une meilleure production de protéines (Cereghino *et al.*, 2002).

L'un des avantages majeurs de l'utilisation de *P. Pastoris* concerne la glycosylation. En effet, la glycosylation peut conduire à des structures moins hypermannosylées que chez *S. cerevisiae* (20 résidus au lieu de 50-150 résidus mannoses). En effet, *P. Pastoris*, contrairement à *S. cerevisiae*, ne possède pas de α -1,3 mannosyltransférase (Dale *et al.*, 1999). Toutefois, ce type de glycosylation demeure antigénique pour une utilisation en thérapeutique. Ainsi, en termes de glycosylation, les levures ne permettent pas de produire des protéines glycosylées similaires à celles retrouvées chez l'homme. Les protéines produites chez les levures restent donc encore difficilement utilisables en thérapeutique humaine. Des études d'humanisation de la glycosylation des protéines sont actuellement en cours (Chiba and Jigami, 2007 ; Hamilton and Gerngross, 2007).

Les chercheurs de la société GlycoFi, qui appartient à Merck et Co depuis 2006, ont réussi à contourner cet obstacle en manipulant le génome de la levure *P. Pastoris* après lui avoir ôté quatre gènes et ajouté quatorze autres d'origine humaine. La levure génétiquement modifiée s'est ainsi montrée capable de produire de l'EPO recombinante parfaitement fonctionnelle.

Par ailleurs, cette technologie leur a également permis de produire des anticorps monoclonaux qui présentent des structures glycosylées humaines. La structure glycanique obtenue par leur système est comparable à celles obtenues à partir des cellules CHO-K1 dépourvues d' α -1,6-fucosyltransférase de la société japonaise Biowa-Kyowa, des cellules YB2/0 de rat du Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB) et des cellules souches embryonnaires de canard de la société française Vivalis (Beck *et al.*, 2010).

Tableau 4 : Principaux avantages et inconvénients des levures comme système d'expression (d'après Demain and Vaishnav, 2009).

Avantages	Inconvénients
✓ Taux de protéines élevé	✓ Glycosylation incomplète (de type <i>High-mannose</i>)
✓ Souches productrices stables	✓ Sécrétion difficile pour les protéines complexes
✓ Coût accessible	✓ Niveau d'expression peu élevé
✓ Croissance cellulaire élevée	
✓ Rendement élevé	
✓ Croissance rapide en milieux chimiquement définis	
✓ Procédé de production similaire à celui des cellules animales	
✓ Formation des ponts disulfures possible	
✓ Repliement des protéines possible	
✓ Glycosylation possible	

1.2.3.2. Les cellules d'insecte

Le système baculovirus / cellules d'insecte Sf9 s'appuie sur l'insertion du ou des gènes à exprimer dans le génome d'un baculovirus vecteur, et sur l'infection de cellules de lépidoptère par le virus recombinant. Il s'agit d'un système d'expression transitoire qui permet d'obtenir d'importantes quantités de protéines, de l'ordre de quelques centaines de milligrammes par litre de culture (Lambrecht *et al.*, 1999). Récemment, le système baculovirus / cellules d'insecte aurait permis la production de 11 g/L d'une protéine recombinante (Morrow Jr., 2007). Une autre considération importante est liée à la sécurité : aucun virus de vertébrés ne peut se multiplier dans les cellules de lépidoptère employées et aucun prion n'a, à ce jour été identifié chez ces insectes. Quant au baculovirus, il ne peut accomplir sa multiplication que dans les cellules d'insecte et il n'est donc pas pathogène pour l'homme. La simplicité de la composition du milieu de culture avec laquelle peuvent se cultiver les cellules d'insecte (absence de sérum, de protéines) constitue un atout économique non négligeable (Altmann *et al.*, 1999). Un inconvénient majeur réside dans la nécessité de procéder à la réinfection virale à chaque nouvelle culture, compte tenu du cycle lytique du virus. Enfin, les cellules d'insecte possèdent les équipements enzymatiques qui leur permettent d'assurer la maturation et les modifications post-traductionnelles. Toutefois, ces dernières sont très différentes de celles retrouvées chez les cellules de mammifères (Marchal *et al.*, 2001). Très récemment, ce système d'expression a été utilisé à l'échelle industrielle par la société Protein Sciences Corp pour produire un vaccin trivalent injectable contre la grippe humaine composé de protéines recombinantes d'hémagglutinine du virus : FluBlok®. La

phase III d'essais cliniques a été validée pour ce vaccin, qui est donc actuellement en phase de soumission auprès de la FDA.

Enfin, ce système d'expression a permis de produire un vaccin contre les maladies provoquées par les infections à Papillomavirus humain, commercialisé sous le nom de Cervarix® par la société GSK.

Tableau 5 : Principaux avantages et inconvénients du système d'expression Baculovirus / cellules d'insecte (d'après Demain and Vaishnav, 2009).

Avantages	Inconvénients
✓ Modifications post-traductionnelles	✓ Glycosylation de type oligomannose ou paucimannose
✓ Repliement des protéines possible	✓ Nécessité de réinfection virale à chaque culture
✓ Titres élevés de protéine	✓ Augmentation de la mort cellulaire après infection virale
✓ Scale-up facile	✓ Production de la protéine dans un milieu de culture avec potentiellement des protéases et des glycosidases
✓ Sécurité (pas d'agents pathogènes)	✓ Titre en virus faible
✓ Protéines complexes	✓ Pas de lignée stable pour l'industrie
✓ Clivage efficace des peptides signaux	
✓ Expression de gènes multiples simultanément	

1.2.3.3. Les cellules de mammifère

Actuellement, 60-70 % des protéines recombinantes pharmaceutiques sont produites dans des cellules de mammifère (Wurm, 2004). En effet, malgré des rendements de production largement supérieurs et des contraintes de mise en œuvre beaucoup moins importantes, les systèmes d'expression cités précédemment présentent l'inconvénient majeur de ne permettre aucune glycosylation ou une glycosylation incomplète. Ainsi, les cellules de mammifère, et plus particulièrement la cellule CHO, apparaissent comme un système incontournable pour la production de glycoprotéines recombinantes d'intérêt thérapeutique. En effet, les structures glycaniques des protéines recombinantes produites par cellules CHO sont très similaires de celles des protéines humaines (Hooker *et al.*, 1995; James *et al.*, 1995; Parekh, 1991). Les capacités de glycosylation des cellules de mammifère seront traitées en détails dans le paragraphe 4.1 de la synthèse bibliographique.

La principale limite de ce système repose donc sur son coût de mise en œuvre et l'incapacité des cellules animales de produire plus que quelques kilogrammes de protéines recombinantes par an. Pourtant, depuis la 1^{ère} AMM obtenue en 1987 par Genentech pour le t-PA, les concentrations finales obtenues ont été multipliées plus de 100 fois grâce aux progrès accomplis dans la composition des milieux de culture et le contrôle des procédés (Wurm, 2004). Plusieurs lignées cellulaires, autres que la cellule CHO, peuvent être utilisées telles que la lignée BHK, les myélomes de souris NS0 ou SP2/0 ou encore les hybridomes. Depuis peu, des lignées humaines sont également employées comme la lignée PERC.6, dérivée d'une cellule rétienne humaine, mise au point par la société Crucell.

En dépit de la production de structures glycaniques très proches de celles retrouvées chez l'homme, elles ne sont pas strictement identiques. Contrairement aux cellules de souris et humaines, les cellules CHO ne possèdent pas d' $\alpha 2,6$ sialyltransférase, mais uniquement une $\alpha 2,3$ sialyltransférase (Lee *et al.*, 1989). De plus, des acides sialiques de type glycolique (NeuGc) ont également été mis en évidence dans les cellules CHO et les cellules murines. Or ces structures se révèlent être immunogènes pour l'homme (Noguchi *et al.*, 1995). Enfin, les cellules murines expriment une $\alpha 1,3$ galactosyltransférase, susceptible de rendre immunogènes les glycanes portant des résidus Gal liés en $\alpha 1,3$ et peuvent présenter des structures contenant un nombre élevé de résidus mannoses (Jenkins and Curling, 1994).

Tableau 6 : Principaux avantages et inconvénients des cellules de mammifère.

Avantages	Inconvénients
✓ Activité biologique de la protéine recombinante similaire à celle de la protéine native	✓ Coût élevé
✓ Modifications post-traductionnelles de mammifère	✓ Croissance cellulaire lente
✓ Glycosylation proche de celle chez l'homme	✓ Faibles concentrations comparées aux procaryotes
✓ De nombreux vecteurs d'expression disponibles	
✓ Excrétion aisée	

1.2.4. Les organismes pluricellulaires

1.2.4.1. Les plantes transgéniques

Le développement des plantes comme usine cellulaire a débuté à la fin des années 1980. L'insertion d'un gène étranger dans une plante est rendue possible grâce à la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* (Gelvin, 2003). Cette bactérie à Gram négatif est un pathogène des

plantes dicotylédons (maïs, tabac...) et provoque des tumeurs cancéreuses au point de l'infection. *A. tumefaciens* possède un plasmide *Tumor inducing* ADN (ADN-Ti) capable de s'introduire dans une cellule infectée et de s'intégrer de façon stable dans les chromosomes des cellules végétales. Cette propriété a ainsi été mise à profit pour transformer les cellules végétales avec des plasmides comportant le gène codant la protéine d'intérêt.

Actuellement, plus de 100 protéines recombinantes sont produites chez les plantes puisqu'elles permettent l'avantage de produire les protéines à un coût très faible. En effet, les coûts de production sont plus faibles puisqu'il n'y a pas besoin d'équipements spécifiques tels que des fermenteurs ainsi que du personnel hautement qualifié pour assurer les productions. Ainsi, il apparaît clairement que pour des productions exigeant des taux de protéines importants, les plantes transgéniques représentent un système très économique. Par exemple, le coût de production de l'avidine chez le maïs représente seulement 0,5% du coût de production de l'avidine à partir d'oeufs de volaille (source naturelle de l'avidine). Aussi, le coût de la production d'un anticorps recombinant pourrait être jusqu'à 500 fois moins élevé que celui d'une production à partir de cellules animales. Par ailleurs, la capacité de production dans les plantes transgéniques est quasiment illimitée puisqu'elle dépend exclusivement des surfaces mises en culture (Negrouk *et al.*, 2005).

Les plantes transgéniques offrent donc des possibilités très intéressantes pour produire des protéines recombinantes étant donné que l'insertion de gènes exogènes dans les plantes est relativement aisée. De nombreuses enzymes à usage diagnostique ou pour la recherche en laboratoire ont déjà été produites à l'échelle industrielle. En revanche, la production par les plantes de protéines recombinantes à usage thérapeutique est un projet très ambitieux et délicat. En effet, ce système a encore de nombreuses limites. En 1997, l'avidine et la β -D-glucuronidase (GUS) étaient quasiment prêtes à être commercialisées. Un vaccin contre l'hépatite B avait été produit dans les plantes de Tabac. Malgré ces ébauches de succès, les efforts de commercialisation de protéines à usage thérapeutique issues des plantes transgéniques, ont été ralentis, notamment avec le retrait de Monsanto dans ce domaine d'application et en raison d'une opinion publique défavorable. En 2006, un vaccin à application vétérinaire contre la maladie de Newcastle des volailles a toutefois été mis sur le marché par la société Dow Agrisciences.

Les protéines recombinantes peuvent être produites dans les feuilles ou les graines voire les deux selon le promoteur utilisé. Chez le tabac, la luzerne et quelques autres espèces, le feuillage abondant est la cible du transgène. Chez le maïs, le colza, la carthame, le soja et le riz, les vecteurs d'expression sont responsables de l'accumulation des protéines recombinantes dans la graine mais les taux de croissance cellulaire et de production

protéique demeurent relativement faibles (Fischer and Emans, 2000). Les feuilles représentent donc un système de production abondant et peu coûteux. Cependant, il est très difficile d'extraire et de purifier la protéine d'intérêt en raison de la présence de nombreuses protéases et des polyphénols. Il est possible de produire des protéines recombinantes chez les plantes carnivores, plus particulièrement à partir des feuilles de *Drosera* (Biteau, 2009). Cette technologie développée par la société française PAT permet de faciliter la récupération de la protéine d'intérêt (sans altérer la plante) et également les étapes de purification.

Concernant les modifications post-traductionnelles, l'expression des protéines recombinantes par des plantes permet d'obtenir un repliement correct ainsi que l'assemblage de sous-unités. En revanche, la glycosylation des protéines diffère de celle retrouvée chez les cellules animales, en particulier en raison de l'ajout de résidus β 1,2-xylose et d' α 1,3-fucose à de très nombreux glycanes végétaux (Lerouge *et al.*, 1998). Or, la présence de ces résidus peut induire des réponses immunitaires chez les patients. Des stratégies d'ingénierie cellulaire sont à l'heure actuelle employées afin d'essayer de contrôler l'ajout des glucides sur la protéine d'intérêt de façon à ce que leurs structures soient similaires à celles retrouvées chez l'homme.

Le risque de contamination par des agents pathogènes viraux de mammifère et de prions mammaliens ne semble plus être un problème. En revanche, des directives réglementaires s'appliquant spécifiquement aux plantes doivent envisager la présence éventuelle de résidus de pesticides et d'herbicides. Les effets sur l'environnement soulèvent également des inquiétudes au regard de l'introduction volontaire de cultures transgéniques dans la chaîne alimentaire ou de la dissémination non contrôlée dans l'environnement. Les mouvements anti-OGM impliquant la destruction des champs OGM témoignent d'une opinion publique encore réticente à l'extension de cette technologie.

Une alternative à ce problème consiste à confiner les plantes transgéniques. Toutefois, cette option augmenterait le prix de revient d'une telle production. Une approche satisfaisante serait donc d'utiliser des plantes à usage non alimentaire dont la culture est facile, productive et à faible coût dans un espace délimité qui ne permet pas la dissémination aux autres espèces non recombinantes. Par exemple, les lentilles d'eau et les microalgues pourraient permettre de fournir des protéines recombinantes en larges quantités tout en étant cultivées dans des conditions parfaitement contrôlées.

Les cultures en réacteur de cellules de plante sont possibles, des réacteurs jetables ont également été mis au point pour ce type de culture (Eibl *et al.*, 2009). Toutefois, le coût de telle production reste encore élevé.

Enfin, un système de transfection appelé « magniffection » a été mis au point en 2006. Cette technologie combine les avantages de 3 systèmes biologiques (efficacité de transfection d'*Agrobacterium tumefaciens*, le taux d'expression élevé des vecteurs viraux et les capacités de modifications post-traductionnelles des plantes). Ce système a permis une production rapide (moins de 2 semaines) de quelques grammes d'anticorps chez *Nicotiana benthamiana* (Giritch *et al.*, 2006). Bien qu'encourageants, ces résultats ne permettent pas de prédire si des protéines recombinantes issues de ce système pourront arriver jusqu'au stade de la commercialisation.

Tableau 7 : Principaux avantages et inconvénients des plantes transgéniques comme système d'expression (d'après Demain and Vaishnav, 2009).

Avantages	Inconvénients
✓ Coût peu élevé	✓ Glycosylation différente de celle retrouvée chez l'homme
✓ Protéines complexes	✓ Extraction et purification difficiles
✓ Sécurité (faible risque de contamination par des agents pathogènes)	✓ Pesticides et herbicides
✓ Scale-up facile et peu coûteux	✓ Opinion publique (Mouvements anti-OGM)
✓ Repliement des protéines possible	✓ Croissance lente et densité cellulaire faible
✓ Modifications post-traductionnelles	

1.2.4.2. Les animaux transgéniques

La nécessité industrielle de produire des protéines recombinantes en grandes quantités et à de faibles coûts a conduit à produire des protéines à partir de ce que l'on peut appeler des « réacteurs vivants autonomes ». Dans cette approche, la sécrétion des protéines recombinantes se fait essentiellement dans le lait issu de divers animaux transgéniques tels que les souris, les lapines, les chèvres, les brebis, les truies ou encore les vaches. Par ailleurs, la protéine produite est relativement facile à extraire du lait et à purifier. Par exemple, la production de lait par une chèvre permet d'atteindre 800 litres de lait par an avec une concentration de l'ordre de 5 g/L de protéines recombinantes produites, ce qui conduit à une production annuelle d'environ 4 kg (Houdebine, 2009). Ce système a permis à l'antithrombine III humaine de recevoir l'autorisation de mise sur le marché par l'EMEA et la FDA (respectivement en 2006 et 2009) (Kling, 2009). En France, l'entreprise BioProtein

Technologies, créée en 1998 à Jouy-en-Josas, s'est spécialisée dans la production « à façon » de protéines recombinantes dans le lait de lapines transgéniques, pour l'industrie pharmaceutique et des biotechnologies.

Les protéines recombinantes peuvent être produites à partir d'autres systèmes, mais le lait des animaux de ferme reste le principal vecteur en raison de la grande quantité volumique produite au cours d'une lactation. Cependant, le système ayant recours au blanc d'œufs de poule transgénique est également devenu attractif depuis que les méthodes de préparation d'oiseaux transgéniques ont été améliorées (Houdebine, 2009). Deux anticorps monoclonaux ainsi que de l'interféron- β 1a humain ont été obtenus dans le blanc d'œuf de poules (Lillico *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2005). Une grande variété de protéines recombinantes a été préparée à titre expérimental à partir du lait et du blanc d'œuf de poule. Ces protéines comprennent des anticorps monoclonaux, des vaccins, des facteurs sanguins, des hormones, des facteurs de croissance, des cytokines, des enzymes, des protéines du lait, du collagène, du fibrinogène... Bien que ces outils soient encore en cours d'optimisation, une nouvelle ère dans la production de protéines recombinantes pharmaceutiques, commencée en 1987, est devenue une réalité en 2006.

L'utilisation des animaux transgéniques nécessite une réflexion au préalable. En effet, il est nécessaire de tenir compte des effets secondaires indésirables que peut avoir la protéine sur les animaux transgéniques. Par exemple, le gène de l'hormone de croissance humaine associé au promoteur WAP (Whey Acidic Protein) de lapin s'exprime en dehors de la glande mammaire et peut perturber la croissance et la reproduction des animaux (Devinoy *et al.*, 1994). De même, le gène de l'érythropoéitine (EPO) humain, utilisé dans ces mêmes conditions altère gravement la santé des lapines et des brebis qui l'expriment (Massoud *et al.*, 1996).

L'étape de purification est également un autre frein à l'utilisation de ce système d'expression, compte tenu de la complexité de la composition du lait. Cette complexité dépend du lieu d'expression de la protéine, à savoir si elle est exprimée dans la phase aqueuse du lait ou si elle est hydrophobe et donc associée aux globules gras (Houdebine, 2009). Par ailleurs, cette technologie est longue à développer, la maturité sexuelle d'une vache est par exemple d'environ 15 mois et le temps nécessaire entre le transfert d'un gène et la première lactation est d'environ 3 ans. De plus, les animaux transgéniques coûtent de l'ordre de 20 000 à 300 000 dollars et seulement une faible proportion d'entre eux parvient à produire la protéine recombinante d'intérêt.

Les animaux transgéniques sont capables de produire des glycoprotéines relativement complexes, sans manipulations génétiques préalables. Toutefois, chez de nombreux animaux,

les acides sialiques sont principalement des acides *N*-glycolyneuraminiques (NeuGc) ; ces structures étant immunogènes pour l'homme (Noguchi *et al.*, 1995). Pour exemple, l'antithrombine III produite à partir de lait de chèvre possède des acides *N*-acétylneuraminique (NeuAc) mais également des acides *N*-glycolyneuraminiques, alors que chez l'homme seuls les acides *N*-acétylneuraminiques sont retrouvés (Edmunds *et al.*, 1998). Toutefois, sur la base des essais cliniques, l'EMA a tout de même autorisé la mise sur le marché de l'antithrombine III.

Tableau 8 : Principaux avantages et inconvénients des animaux transgéniques comme système d'expression

Avantages	Inconvénients
✓ Titres élevés de protéines	✓ Coût encore élevé
✓ Scale-up facile	✓ Purification difficile
✓ Modifications post-traductionnelles de mammifères	✓ Ethique (santé des animaux)
✓ Glycosylation proche de celle retrouvée chez l'homme	✓ Lenteur du développement des animaux
	✓ Présence de NeuGc chez la plupart des animaux

1.2.5. Conclusions

Au regard des avantages et des inconvénients de chaque système d'expression décrit précédemment, il apparaît clairement que le choix du système d'expression doit tenir compte de divers critères, économiques, qualitatifs voire éthiques. L'aspect qualitatif de la protéine est un facteur déterminant étant donné qu'il conditionne les fonctions biologiques de la protéine. Ainsi, la qualité de la protéine, et plus particulièrement la glycosylation, représente un critère majeur et oriente le choix du système de production. Si la glycosylation est indispensable, la protéine doit être exprimée dans des cellules eucaryotes. Si la protéine naturelle n'est pas glycosylée, le système *E. coli* sera plutôt utilisé. La Figure 4 résume les capacités de glycosylation caractéristiques des différents systèmes d'expression. Dans le cas où la glycosylation est souhaitable mais non essentielle à l'activité biologique de la protéine, ce sont généralement les arguments économiques qui prévalent. Le Tableau 9 synthétise les principales caractéristiques de chaque système d'expression.

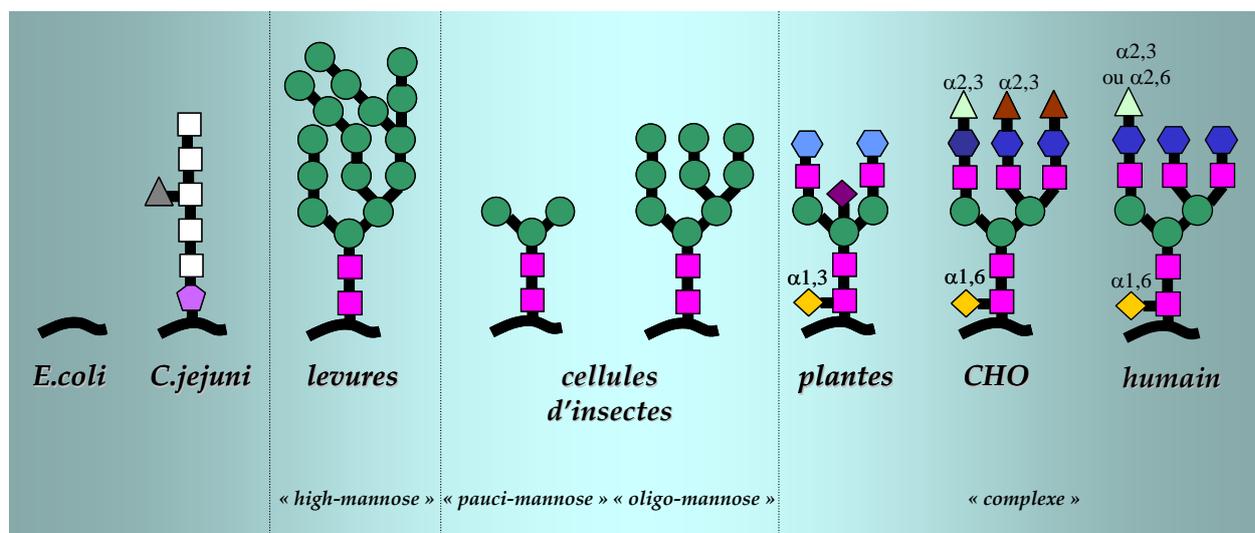


Figure 4 : Exemples de structures N-glycanniques caractéristiques des glycoprotéines en fonction du système d'expression considéré. Glucose (▲), GlcNAc (■), mannose (●), fucose (◆), β1,2-xylose (◆), GalNAc (□), bacillosamine (⬠), β1,4 galactose (⬢), β1,3 galactose (⬣), acide N-acétylneuraminique (△), acide N-glycolyneuraminique (▲).

Tableau 9: Comparaison des systèmes de production de protéines recombinantes thérapeutiques (d'après Dingermann, 2008)

Système d'expression	Classification	Etat d'avancement du système	Ponts disulfures	Glycosylation	Sécrétion	Coût de la fermentation	Utilisation d'antibiotiques	Coût de sécurité	Echelle du processus	AMM
<i>E. coli</i>	Bactérie à Gram Négatif	Complet	Oui (dans le périplasme)	Non	Périsplasme	Faible ou moyen (en fonction du promoteur)	Recommandée	Faible	Echelle industrielle	Oui
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Eucaryote	Complet	Oui	Oui; type <i>high-mannose</i>	Possible	Faible	Non recommandée	Faible	Echelle industrielle	Oui
<i>Pichia pastoris</i>	Eucaryote	Complet	Oui	Oui, pas de α 1,3 mannose	Possible	Faible	Non recommandée	Faible	Echelle industrielle	Oui
<i>Hansenulat polymorpha</i>	Eucaryote	Complet	Oui	Oui, pas de α 1,3 mannose	Possible	Faible	Non recommandée	Faible	Echelle industrielle	Oui
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Eucaryote	Précoce	Oui	Oui, caractérisation précise non connue actuellement	Possible	Faible	Non recommandée	Faible	Echelle du laboratoire	Non
Plantes transgéniques	Eucaryote	Complet	Oui	Oui, présence de fucose	Possible, restriction de taille	Moyen	Non recommandée	Faible	Echelle production pilote	Oui (à Cuba)
Cellules animales	Eucaryote	Complet	Oui	Oui, typiquement comme chez l'homme	Oui	Elevé	Non recommandée	Elevé	Echelle industrielle	Oui
Animaux transgéniques	Mammifère	Complet	Oui	Oui, typiquement comme chez l'homme	Oui	Moyen	Non recommandée	Elevé	Echelle industrielle	Oui

2. Culture en masse de cellules animales

2.1. Origine de la lignée cellulaire CHO utilisée pour produire les protéines recombinantes

C'est en 1957 que Puck *et al.* ont établi une lignée fibroblastique à partir de l'ovaire de hamster chinois (Puck *et al.*, 1958). Une des méthodes les plus courantes pour la construction de lignées cellulaires CHO stables productrices de protéines recombinantes est la transfection d'une lignée cellulaire CHO mutante dhfr (-) avec les ADNc codant pour l'enzyme dihydrofolate reductase (dhfr) et la protéine d'intérêt. L'enzyme dhfr est essentielle pour la synthèse des nucléotides chez les procaryotes et les eucaryotes. Plus précisément, elle catalyse la réduction du dihydrofolate en tétrahydrofolate pour la biosynthèse du pantothénate (chez les procaryotes) et des purines et du thymidylate (Bertino and Hillcoat, 1968). Les cellules transformées par le plasmide deviennent ainsi dhfr (+) et sont donc sélectionnées pour leur croissance dans un milieu dépourvu de glycine, purines et thymidine. L'amplification des séquences transformantes a été obtenue en procédant à une culture cellulaire en présence de concentrations croissantes de méthotrexate (MTX), analogue de l'acide folique et inhibiteur de la dhfr, dans le milieu de culture (Kaufman, 1990). En effet, la résistance au MTX est due principalement à une amplification du nombre de copies du gène dhfr, ce qui conduit à une augmentation de la quantité de l'enzyme dhfr. Les séquences de la protéine d'intérêt et celle du gène dhfr étant portées par le même plasmide et donc intégrées ensemble dans l'ADN de la cellule-hôte, celles-ci sont co-amplifiées avec les séquences dhfr dans les clones résistant au MTX. Comme pour la dhfr, l'augmentation du nombre de copies de la séquence de la protéine d'intérêt s'accompagne d'une augmentation de synthèse de la protéine d'intérêt par la cellule. Au cours de ce procédé, les gènes insérés peuvent être amplifiés plus de 1000 fois permettant ainsi d'augmenter le taux de production de la protéine recombinante (Crouse *et al.*, 1983).

2.2. Milieux de culture et métabolisme des cellules de mammifère en culture

Comme nous l'avons mentionné en introduction de ce mémoire, un nombre important de molécules biopharmaceutiques est actuellement sur le marché et de nombreux autres produits recombinants sont également sur le point d'être commercialisés. Aussi, depuis que la culture de cellules animales a pris une telle importance pour la production de protéines

recombinantes, l'intérêt porté à la connaissance du métabolisme des lignées transformées n'a cessé de grandir (Altamirano *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 1987; Neermann and Wagner, 1996). Une meilleure connaissance du métabolisme des cellules transformées permet l'élaboration de stratégies de contrôle des procédés (apports d'éléments nutritifs, d'oxygène, agitation...) dans le but d'améliorer les paramètres cinétiques de croissance et de production.

Le métabolisme cellulaire est assimilé au métabolisme carboné central et comprend la glycolyse, le cycle des acides tricarboxyliques, la chaîne respiratoire et la glutaminolyse. De nombreuses différences existent entre le métabolisme énergétique des cellules de mammifère primaires et transformées. En effet, le métabolisme carboné central des cellules transformées présente une forte dérégulation, conduisant à une production élevée de lactate, et cela même dans des conditions aérobies complètes, ainsi qu'à l'excrétion d'ions ammonium et de produits finaux partiellement oxydés, tels que l'alanine (Godia and Cairo, 2006). Le glucose et la glutamine sont les deux substrats carbonés principaux utilisés comme sources d'énergie pour la croissance des cellules animales. La glutamine sert également de source principale d'azote. Les autres acides aminés sont essentiellement utilisés pour la synthèse des protéines et ne contribuent donc que très peu à la production d'énergie (Farges-Haddani, 2005). Les vitamines, les acides gras, les éléments traces et les facteurs de croissance, bien que jouant un rôle indispensable pour la croissance cellulaire, n'interviennent quasiment pas dans le métabolisme énergétique.

2.2.1. Les milieux de base

L'amélioration de la productivité des protéines recombinantes produites par les cellules animales est un enjeu majeur. Etant donné les faibles concentrations relatives de protéines produites dans les systèmes de culture de cellules animales, l'environnement nutritionnel des cellules joue un rôle significatif pour la croissance cellulaire et les rendements de production. L'optimisation des milieux nutritifs s'avère donc être un moyen pour contribuer à l'amélioration de la productivité cellulaire (Castro *et al.*, 1992). Les milieux de culture doivent donc répondre à des exigences physicochimiques telles que l'apport de nutriments et le maintien d'un environnement physicochimique stable (pH, osmolarité...). Les milieux de base commercialisés fournissent les nutriments essentiels à la cellule : sources carbonées, acides aminés et organiques, vitamines, tampon pH (parfois un indicateur de pH (rouge de phénol)), sels et métaux. Ces milieux sont généralement commercialisés sous forme liquide, ou concentrée et lyophilisée. Plusieurs milieux de base, élaborés il y a presque 40 ans, sont

désormais disponibles (RPMI 1640, BME, α -MEM, DMEM, IMDM, Ham's F12, etc). Ils sont généralement complétés par l'ajout de divers composés tels que des lipides, des protéines, des acides aminés, des modulateurs de croissance ou de production, des cytokines, des nucléotides, des surfactants, etc.

2.2.2. Les principaux constituants des milieux

2.2.2.1. Le glucose et son métabolisme

Le glucose constitue une des 2 principales sources d'énergie et de carbone apportée aux cellules. Chez l'homme, sa concentration physiologique est de 5 mM. Dans les milieux de culture, sa concentration varie entre 5 et 25 mM. Afin de limiter la production de lactate, pour de nombreuses lignées cellulaires, ce glucide peut être associé ou substitué par d'autres métabolisés plus lentement, comme le maltose (Duval *et al.*, 1992), le galactose (Altamirano *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 1991) ou le mannose (Wagner *et al.*, 1991).

Une fois incorporé dans le cytoplasme, le glucose est métabolisé par la voie de la glycolyse. Une fraction du glucose utilisé fournit des précurseurs pour la formation des riboses via la voie des pentoses phosphates. Ceci concourt à la synthèse des acides nucléiques. Le cycle des pentoses phosphates oxyde donc le glucose en CO₂, en ribose 5P, en érythrose 4P et NADPH, nécessaires à la synthèse des acides nucléiques.

Le glucose est en grande partie converti en pyruvate, accompagné par la formation d'ATP et de NADH. Ce dernier peut ensuite être transformé en acétylcoenzyme A qui sera incorporé dans le cycle des acides tricarboxyliques (TCA). Toutefois, il semble essentiel de souligner que seule une faible fraction (~ 20-30%) du glucose transformé en pyruvate est utilisée à des fins énergétiques, autrement dit dans le cycle TCA et la voie des pentoses phosphate (Neermann and Wagner, 1996). Une grande partie du pyruvate est métabolisé en lactate. Or ce produit, à des concentrations supérieures à 20 mM, peut être considéré comme toxique pour la cellule puisqu'il peut notamment engendrer une diminution de la croissance cellulaire d'hybridomes et de cellules BHK (Hassell *et al.*, 1991 ; Wentz and Schugerl, 1992). Par ailleurs, en empruntant cette voie métabolique, seuls 2 ATP sont produits contre 38 ATP pour une oxydation complète du glucose via le cycle du TCA.

2.2.2.2. La glutamine et son métabolisme

La glutamine est décrite comme étant l'une des sources principales d'énergie avec le glucose (Reitzer *et al.*, 1979), particulièrement chez les cellules animales où elle est impliquée dans le contrôle de la prolifération et de l'apoptose (Arden and Betenbaugh, 2004).

Elle est donc apportée dans le milieu de culture à des concentrations généralement 10 fois supérieures à celles des autres acides aminés (0,5 à 5 mM) mais aussi en raison de son manque de stabilité dans les milieux de culture (Schneider *et al.*, 1996). Elle est importante pour la croissance cellulaire, et intervient également en tant que précurseur dans la biosynthèse des nucléotides puriques et pyrimidiques, des acides nucléiques et des acides aminés (Engstrom and Zetterberg, 1984). Il est important que le milieu de culture contienne de la glutamine, car les cellules animales (hybridomes et myélomes) sont dépourvues de glutamine synthétase ou possèdent une enzyme dont l'activité est faible (cellules CHO et BHK). Par conséquent, elles sont incapables de synthétiser la glutamine à partir d'ions ammonium et de glutamate (Neermann and Wagner, 1996). Cependant, le métabolisme de dégradation de la glutamine et de sa décomposition chimique dans le milieu de culture conduit à la formation d'ions ammonium (Ozturk and Palsson, 1990). Or, il a été montré qu'une concentration de 8 mM en ions ammonium peut conduire à une diminution de 50% de la croissance des cellules CHO (Kurano *et al.*, 1990b; Schneider *et al.*, 1996). Pour limiter la formation d'ions ammonium, une stratégie consiste à utiliser des dipeptides, tels que le dipeptide « ala-gln » (glutamax) ou le dipeptide « gly-gln », au lieu de la glutamine.

La première étape de la glutaminolyse est la conversion de la glutamine en glutamate et en ions ammonium catalysée par une glutaminase. Le glutamate formé peut alors approvisionner le cycle TCA en étant métabolisé en α -cétoglutarate (α -KG). Trois voies peuvent être empruntées pour la formation de l' α -cétoglutarate ; (i) une désamination par la glutamate déshydrogénase, (ii) une transamination par l'alanine transaminase, (iii) une transamination par l'aspartate transaminase (Figure 5). Contrairement aux réactions de transamination, lors de la réaction de désamination, une mole de NH_4^+ est formée par mole de glutamate utilisée. Les réactions de transamination peuvent avoir lieu indifféremment dans la mitochondrie ou dans le cytoplasme, alors que la réaction de désamination se déroule dans la mitochondrie (Godia and Cairo, 2006).

La glutamine permet aussi d'alimenter le cycle TCA par l'intermédiaire de la formation d'oxaloacétate. Par ailleurs, il semblerait que la majorité du flux de carbone, une fois entré dans le cycle, soit exporté hors de la mitochondrie, pour la synthèse lipidique via le transit

du citrate (Figure 5 ; Sharfstein *et al.*, 1994). Ainsi, la glutaminolyse représente une autre voie d'alimentation des flux métaboliques du cycle TCA et permet de compléter les flux apportés par la glycolyse ou de compenser les pertes de flux initialement apportés par la voie de la glycolyse.

Les vitesses spécifiques de consommation de glucose et de glutamine suivent généralement la même tendance que la vitesse spécifique de croissance, autrement dit elles sont initialement élevées puis décroissent au cours de la culture (Farges-Haddani, 2005; Kochanowski, 2005). Les cinétiques d'assimilation du glucose et de la glutamine lors de cultures de cellules animales peuvent varier en fonction de divers paramètres tels que les concentrations initiales des substrats, leurs proportions respectives, la vitesse de croissance, la concentration en oxygène dissous etc (Goergen *et al.*, 1992 ; Miller *et al.*, 1987). Pour la majorité des lignées cellulaires industrielles, l'accumulation de lactate, d'ions ammonium et d'alanine accompagne la croissance cellulaire au cours du procédé discontinu. Les concentrations finales de ces produits sont donc généralement, comme cité précédemment, étroitement liées aux concentrations initiales de glucose et de glutamine. Pour des valeurs de glucose et de glutamine comprises respectivement entre 5-25 mM et 4-6 mM, les concentrations obtenues en lactate, ions ammonium et alanine sont de l'ordre de 8-35 mM, 2-4 mM et 1-2 mM. Lorsque les cellules CHO sont cultivées en mode discontinu, les vitesses spécifiques de consommation du glucose et de production d'ions ammonium sont de l'ordre de 0,03 mmoles/10⁸ cellules/h (Hayter *et al.*, 1991 ; Kochanowski, 2005 ; Yang and Butler, 2000b). Quant aux vitesses spécifiques de consommation de la glutamine et de production d'ions ammonium, elles sont souvent proches de 0,005 mmoles/10⁸ cellules/h (Farges *et al.*, 2008; Yang and Butler, 2000a ; Yang and Butler, 2000b).

Les rendements métaboliques des deux substrats carbonés majeurs sont habituellement utilisés pour évaluer le fonctionnement du métabolisme cellulaire. Leurs calculs permettent d'évaluer l'impact d'un changement de condition de culture sur le métabolisme central des cellules. Ainsi, les ratios lactate/glucose ($Y_{lac/glc}$) et NH_4^+ /glutamine ($Y_{NH_4^+/Gln}$) (en mole/mole) sont des indicateurs des performances métaboliques des cellules qui permettent d'estimer les nombres de moles d'ions NH_4^+ et de moles de lactate produits respectivement par mole de glutamine et par mole de glucose. Les valeurs maximales classiquement obtenues lors de cultures discontinues sont de l'ordre de $Y_{lac/glc} = 1,2-2$ et $Y_{NH_4^+/Gln} = 0,4-1$.

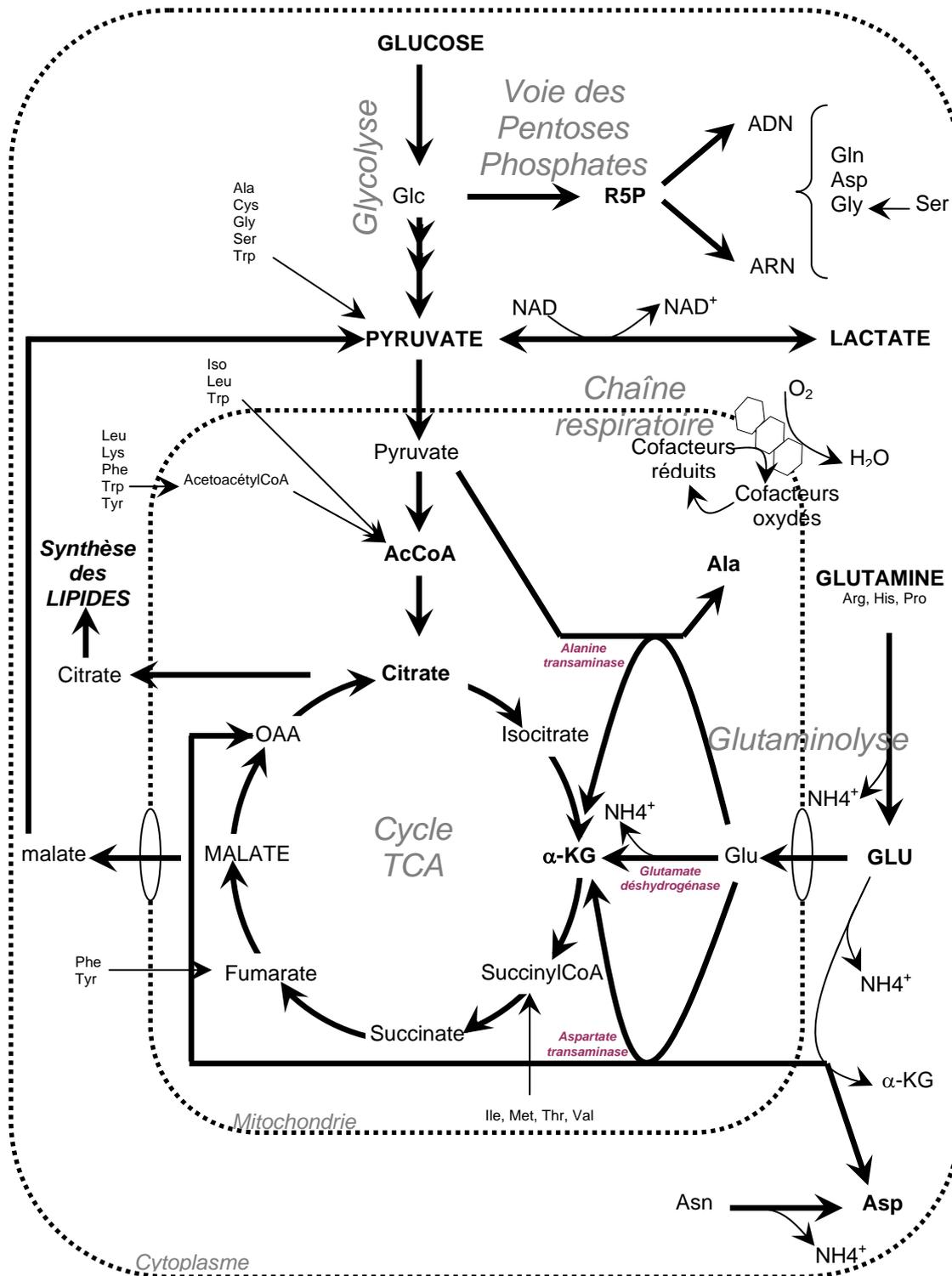


Figure 5 : Principales voies métaboliques d'assimilation des glucides et des acides aminés chez les cellules de mammifère (d'après Altamirano *et al.*, 2006 et Godia and Cairo, 2006). (AcCoA : acétyl-coenzyme A, α-KG : α-cétoglutarate, Glc6P : glucose 6-Phosphate, OAA : oxaloacétate, R5P : ribose 5-Phosphate, SuccinylCoA : succinyl-coenzyme A)

2.2.2.3. Les acides aminés

Les acides aminés sont caractérisés par l'existence d'une fonction amine et acide carboxylique en α . Neuf acides aminés ne peuvent pas être synthétisés chez l'homme et *a fortiori* par les cellules animales : la leucine, l'isoleucine, la valine, la lysine, la méthionine, le tryptophane, la phénylalanine, la thréonine et l'histidine. Ces acides aminés sont systématiquement incorporés dans les milieux de culture. Généralement, les acides aminés non essentiels sont également ajoutés dans les milieux de culture étant donné que certaines lignées cellulaires sont incapables de produire certains de ces acides aminés ou bien les produisent en quantité insuffisante. L'absence ou une limitation en acides aminés dans un milieu de culture peut engendrer une diminution de croissance cellulaire ; aussi bien en terme de productivité cellulaire qu'en terme de densité cellulaire maximale. Certaines lignées cellulaires sont plus sensibles que d'autres à des limitations en acides aminés. Il a été montré que lorsque la glutamine est limitante, les cellules BHK augmentent la consommation des acides aminés tels que la leucine, l'isoleucine, la valine, la sérine et le glutamate (Linz *et al.*, 1997).

Les acides aminés sont donc ajoutés dans les milieux de culture à des concentrations bien définies. Toutefois, le sérum, la lactalbumine, et depuis ces dix dernières années, des hydrolysats de plantes (colza, tournesol...) ont également été des sources d'acides aminés apportés en concentrations partiellement connues voire inconnues dans les milieux de culture.

2.2.2.4. Les éléments minéraux

La concentration en sels dans les milieux de culture est calculée pour formuler des milieux isotoniques. L'osmolarité optimale des milieux de culture est généralement voisine de 300 mOsm/kg ; la plupart des cellules animales supportant des variations de 10% autour de cette valeur optimale. Les ions inorganiques couramment retrouvés dans les milieux de base sont : Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , PO_4^{3-} , Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} et HCO_3^- . Les ions inorganiques interviennent dans le maintien du pH et l'osmolarité du milieu, le transfert de molécules à travers les membranes et comme cofacteurs enzymatiques.

Les ions métalliques, présents à l'état de trace dans le sérum, sont également ajoutés. Ils sont pour la plupart essentiels à la croissance cellulaire, participent au site actif de certaines enzymes et interviennent dans les réactions de la chaîne respiratoire. Les plus courants sont les ions Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} et Mn^{2+} (Mizrahi and Lazar, 1988). D'autres éléments sont

également considérés comme essentiels : Mo, Va, Se, Si, Ni (Burgener and Butler, 2006). Enfin, d'autres éléments, bien que considérés comme non indispensables, sont généralement retrouvés dans les milieux de culture : Al, Ag, Ba, Cd, Cr, F, Ge, Rb et Zr.

Le calcium joue un rôle important dans la prolifération cellulaire puisqu'il intervient dans la transduction du signal, la division et l'adhésion cellulaires. La calmoduline, une protéine dont le site actif contient du calcium, intervient dans la régulation de protéines kinases à sérine/théronine impliquées dans le processus de division cellulaire. Une relation dose dépendante entre le calcium et l'activité de la calmoduline a été démontrée (Wilmann *et al.*, 2000). Toutefois, des concentrations trop élevées en calcium peuvent conduire à la formation d'agrégats cellulaires, pouvant diminuer la productivité de la protéine recombinante et la viabilité cellulaire (Peshwa *et al.*, 1993).

2.2.2.5. Les vitamines et les cofacteurs

Les vitamines sont des composés présents à de faibles concentrations dans les milieux de culture. Tous les milieux de culture ne contiennent pas toutes les vitamines nécessaires à la croissance cellulaire. Ce sont surtout des vitamines hydrosolubles qui sont apportées par le milieu : l'acide nicotinique (niacine), le nicotinamide (vitamine PP), la thiamine (vitamine B₁), la riboflavine (vitamine B₂), l'acide pantothénique, la pyridoxine (vitamine B₆), la biotine (vitamine H), la cobalamine (vitamine B₁₂), l'acide folique et l'acide ascorbique (vitamine C). Ces vitamines interviennent en tant que coenzymes ou dans la composition des coenzymes. Les vitamines présentes dans les milieux de culture sont donc principalement issues du groupe B. La vitamine C joue également un rôle de substance anti-oxydante. L'ajout de sérum permet d'apporter d'autres vitamines et cofacteurs en quantité inconnue nécessaires à la croissance cellulaire. Une limitation en vitamines a un impact négatif sur la vitesse de croissance cellulaire et le prolongement de la croissance, mais ne change pas la valeur de la densité cellulaire maximale (Kurano *et al.*, 1990a). De plus, la concentration initiale d'une vitamine dans un milieu de culture est susceptible de modifier la vitesse de croissance cellulaire ainsi que la productivité (Hiller *et al.*, 1994). Les milieux définis sans sérum tels que le milieu Ham's F12, le DMEM ou encore le M199 contiennent une large gamme de vitamines, en plus des vitamines hydrosolubles habituellement incluses dans les milieux de base : vitamines A, D₃, E, K, acide *p*-aminobenzoïque. Chaque lignée cellulaire a des besoins différents en vitamines, ce qui explique l'existence de nombreux milieux de composition en vitamines différente.

2.2.2.6. Les lipides

Les lipides sont des éléments constitutifs des membranes cellulaires et une source d'énergie pour le métabolisme. Le sérum lui-même contient des lipides (acides gras, phospholipides, phosphatidylcholine et cholestérol), c'est pourquoi la formulation actuelle des milieux de base ne contient généralement pas de lipides. Le cholestérol et les acides gras sont les composants lipidiques principaux des milieux de culture sans sérum. Dans les milieux sans sérum, il est généralement indispensable de les ajouter pour assurer la croissance cellulaire (Barnes and Sato, 1980). Le cholestérol est indispensable pour la croissance de certaines lignées cellulaires telles que les myélomes (Sato *et al.*, 1984). Toutefois, contrairement au cholestérol, certains acides gras essentiels, comme l'acide linoléique, ont un effet stimulateur sur la croissance des cellules CHO et la production de la protéine d'intérêt (Castro *et al.*, 1995). L'effet stimulant de l'acide linoléique a également été rapporté pour la croissance d'hybridomes et la production d'anticorps (Butler and Huzel, 1995). Les acides gras sont utilisés dans la synthèse de lipides plus complexes tels que le triacylglycérol ou les phospholipides, constituants majoritaires des membranes cellulaires. Ils ont également un rôle protecteur contre le stress oxydant. Les phospholipides ne sont pas uniquement des composants des membranes cellulaires puisqu'ils jouent également un rôle important dans la transduction du signal pour la régulation de la croissance cellulaire. Les phospholipides, ajoutés dans le milieu de culture, sont des stimulateurs de croissance pour de nombreuses lignées cellulaires. Les acides phosphatidiques et lysophosphatidiques permettent d'améliorer la croissance de cellules adhérentes, telles que les MDCK, les cellules épithéliales de souris ou encore certaines lignées cellulaires de singe (Bashir *et al.*, 1992 ; Van Corven *et al.*, 1989).

L'éthanolamine est le principal substrat pour la synthèse de la phosphatidyléthanolamine (PtdEtn). La PtdEtn couplée à la phosphatidylcholine constitue l'un des composants majoritaire des membranes cellulaires. Dans les cellules animales, trois voies de biosynthèse de la PtdEtn sont possibles ; (i) à partir de l'éthanolamine par l'intermédiaire de la CDP-éthanolamine, (ii) à partir de la décarboxylation de la phosphatidylsérine (PtdSer), (iii) à partir d'une réaction entre l'éthanolamine et une molécule de PtdSer ou de phosphatidylcholine (Shiao and Vance, 1995). Shiao et Vance (1995) ont montré que dans les cellules CHO dont le milieu a été supplémenté avec de l'éthanolamine, la PtdEtn est toutefois principalement issue de la décarboxylation de la PtdSer. L'éthanolamine est souvent ajoutée dans les milieux de culture sans sérum (Chen *et al.*, 1993). Elle permet notamment d'améliorer la croissance de certaines lignées d'hybridomes (Murakami *et al.*, 1982).

2.2.2.7. Les nucléotides et nucléosides

Bien que la majorité des cellules animales soit capable de synthétiser les nucléotides *de novo*, les bases nucléotidiques sont incluses dans la plupart des milieux, notamment dans l' α -MEM. Ce milieu est particulièrement recommandé pour la propagation des lignées déficientes en dihydrofolate réductase (dhfr), et donc incapables de synthétiser les nucléotides et nucléosides.

Les nucléotides sont des molécules essentielles aux cellules. En effet, les nucléotides mono-, di- et triphosphates (ATP, CTP, GTP et UTP) participent au maintien du métabolisme énergétique. Ce sont également des précurseurs des nucléotides-sucres, tels que l'UDP-Glc, l'UDP-Gal, l'UDP-GlcNAc, l'UDP-GalNAc, le GDP-Man, le GDP-Fuc, le CMP-NeuGc et le CMP-NeuAc. Outre leur rôle dans diverses voies métaboliques, les nucléotides-sucres sont des molécules indispensables au bon déroulement du processus de glycosylation. En effet, ce sont des substrats donneurs de résidus glucidiques dans les réactions enzymatiques se déroulant dans le réticulum endoplasmique rugueux (RE) et l'appareil de Golgi (Kochanowski *et al.*, 2008). Enfin, les ribo- et désoxynucléotides participent à la synthèse de l'ADN et l'ARN.

2.2.2.8. Les tampons pH

Le bicarbonate de soude est souvent utilisé pour son pouvoir tampon dans les milieux de culture de cellules animales. Ce composé couplé à la présence de CO₂ (5-10%) permet de maintenir le pH du milieu entre environ 6,9 et 7,4. L'un des inconvénients de ce tampon « bicarbonate-CO₂ » est le virage rapide à des pH alcalins en absence de CO₂, autrement dit lorsque les flacons agités ou flacons de Roux sont retirés de l'incubateur. Toutefois, le bicarbonate de soude présente l'inconvénient majeur d'accumuler du CO₂ en grande cuve en raison de la respiration cellulaire. En guise de prévention, du tampon Hepes (pH 7) est ajouté à des concentrations pouvant atteindre 25 mM dans certains milieux de culture.

2.2.2.9. Le sérum de veau foetal

Les réglementations liées aux procédés de production biopharmaceutiques sont de plus en plus strictes afin d'éviter toute contamination potentielle par des agents infectieux tels que le prion à l'origine de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB). Ainsi, depuis 2002, les réglementations européennes préconisent, lorsque ceux-ci sont disponibles, l'utilisation de produits alternatifs, autrement dit d'origine non-animale et exigent que « les industriels

justifient l'utilisation de produits d'origine animale » (EMEA, 2002). Des risques associés à l'utilisation de produits d'origine animale pour la production de protéines thérapeutiques ont clairement été établis puisque ces produits peuvent être à l'origine de la transmission du prion (Galbraith, 2002) et de contaminations virales (Merten, 2002).

Cependant, le sérum de veau foetal reste encore utilisé pour la formulation des milieux de culture. L'utilisation de sérum de veau foetal offre de nombreux avantages à la culture cellulaire. Il permet d'augmenter la croissance cellulaire et protège notamment les cellules vis-à-vis des contraintes hydrodynamiques. Par ailleurs, le sérum de veau foetal peut également jouer un rôle détoxifiant en liant et inactivant les substances toxiques telles que des composés organiques, des métaux, des toxines... Enfin, le sérum constitue une source secondaire de nutriments (sucres, acides aminés, oligoéléments, vitamines, lipides...), de facteurs d'adhésion, de facteurs de croissance, d'hormones et d'inhibiteurs de protéases. Toutefois, cette composition complexe du sérum est variable d'un lot à l'autre et son coût est élevé (près de 85% du prix total du milieu de culture avec sérum). Il contient de fortes concentrations en protéines ce qui peut compliquer la purification de la protéine recombinante d'intérêt. Il peut également comporter des enzymes hydrolytiques (Gramer and Goochee, 1993). Enfin, comme détaillé précédemment, l'inconvénient majeur de l'utilisation du sérum est la présence potentielle d'agents infectieux pathogènes (virus, prions, mycoplasmes...) (Park *et al.*, 2006).

Ainsi, se sont développés ces dernières années des milieux de culture sans sérum et des milieux dépourvus de protéines d'origine animale.

2.2.3. Les milieux sans sérum

D'un point de vue industriel, la formulation de milieux sans protéine a permis de développer des milieux avec une qualité et une efficacité comparables aux milieux contenant du sérum, et ceci pour des coûts parfois moins élevés. La composition chimique de tels milieux est alors plus ou moins parfaitement définie et contrôlée selon les composés utilisés pour substituer le sérum. Par ailleurs, d'un lot à l'autre, la variabilité de production est atténuée et les étapes de purification sont facilitées. Toutefois, contrairement aux milieux contenant du sérum qui peuvent être utilisés pour une large gamme de lignées cellulaires, les milieux sans protéine restent généralement hautement spécifiques (Jayme, 1991). La formulation au cas par cas de milieux de culture sans protéine qui permettent d'apporter les besoins requis pour la production de la protéine d'intérêt reste donc nécessaire. Des milieux sans protéine qui

permettent la croissance en suspension d'une large gamme de lignées CHO recombinantes sont commercialement disponibles. Toutefois, l'utilisation à grande échelle de tels milieux est encore restreinte.

Une gamme étendue de produits d'origine animale tels que le sérum de veau fœtal, les hydrolysats de caséine, de gélatine, de viande, d'œuf, de lactalbumine ou encore d'albumine bovine (BSA) et d'albumine humaine (HSA) recombinantes a été ou est encore utilisée pour les milieux de culture de cellules animales aussi bien en recherche qu'en production pharmaceutique. Ces composés associés à l'holo-transferrine humaine et les facteurs de croissance tels que l'insuline (IGF) permettent d'assurer la croissance cellulaire et d'améliorer la productivité.

Depuis 1995, les procédés industriels se tournent vers la formulation et l'utilisation de milieux sans sérum. Eu-égard aux mesures prises par l'EMA depuis 2003 (EMA, 2003), en janvier 2007, la FDA a annoncé différentes propositions pour interdire l'utilisation de produits d'origine bovine comme ingrédient de certains produits médicaux ou comme élément dans le procédé de production (Mortellaro and Devine, 2007). Les milieux sans sérum, bien qu'étant de composition chimiquement définie, peuvent néanmoins encore contenir des produits d'origine animale (protéines, facteurs de croissance...). Ainsi, le développement de milieux chimiquement définis, qui ne contiennent aucune protéine ou composé d'origine animale est actuellement en plein essor. En effet, ces milieux permettent d'obtenir des performances cinétiques et une qualité de la protéine recombinante au moins comparables à celles obtenues avec les milieux sans sérum.

2.2.3.1. Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance recombinants peuvent servir de substituts au sérum de veau fœtal. En effet, ils permettent d'améliorer la croissance cellulaire dans les milieux sans sérum. Différents facteurs de croissance à activité mitogénique ont été identifiés pour la culture de cellules animales. Ainsi, les facteurs de croissance tels que les facteurs fibroblastiques (FGF), insulinaires (IGF), épithéliaux (EGF), neuronaux (NGF) et plaquettaires (PDGF). sont parfois ajoutés dans les milieux de culture.

2.2.3.2. La transferrine, l'insuline, l'albumine et le sélénium (TIBS)

Dans les milieux de culture sans sérum, certains composés protéiques ou minéraux sont généralement ajoutés. Les protéines plasmatiques de transport comme l'albumine bovine (BSA) et la transferrine ainsi que les facteurs de croissance comme l'insuline et les éléments

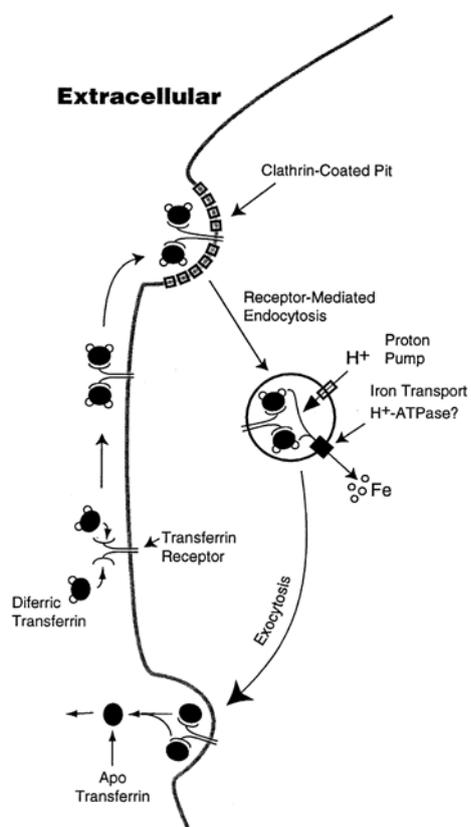
traces comme le sélénium constituent notamment les suppléments ajoutés au milieu pauvre RPMI sans sérum (Hayter *et al.*, 1991). La notation TIBS fait donc référence aux composés suivants : Transferrine-Insuline-Albumine-Sélénium. L'insuline, la transferrine et l'albumine peuvent être produites en système recombinant et donc être entièrement dépourvues de potentiels agents pathogènes (Mortellaro and Devine, 2007).

Un des éléments traces le plus couramment ajouté dans les milieux de culture sans sérum est le sélénium (Guilbert and Iscove, 1976 ; Hewlett, 1991 ; Kisiday *et al.*, 2005). Cet élément est connu pour ses propriétés anti-oxydantes (Patrick, 2004). En effet, le sélénium permet d'activer la glutathione peroxydase, une enzyme qui intervient directement dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène (Baker *et al.*, 1998 ; Yoshiro *et al.*, 2003). D'autres auteurs ont montré que le sélénium est capable de former un complexe avec le fer qui serait transporté au travers de la membrane cellulaire (Zhang *et al.*, 2006).

L'insuline est ajoutée dans les milieux sans sérum puisqu'elle permet d'apporter l'énergie nécessaire à l'assimilation de certains substrats du métabolisme. Elle permet, par exemple, de faciliter le transport du glucose et son oxydation, le transport des acides aminés et de synthétiser le glycogène. La présence d'ions zinc, ou dans une moindre mesure d'ions sodium dans le milieu de culture est indispensable pour que l'insuline soit active et constitue un facteur de croissance. Toutefois, il a été montré que l'insuline est instable à 37°C (Barnes and Sato, 1980). Elle est donc souvent ajoutée à des concentrations élevées, de l'ordre du mg/L.

L'albumine bovine, une protéine du plasma sanguin, est généralement incluse dans les milieux de culture. Il s'agit d'une protéine de transport. En effet, l'albumine permet notamment de transporter des molécules insolubles en milieux aqueux telles que les acides gras oléiques et linoléiques. Par ailleurs, elle possède également une affinité élevée pour les ions métalliques (Cu^{2+} et Ni^{2+}) et occupe donc également un rôle de transporteur de métaux. Elle joue également un rôle protecteur contre les radicaux libres (Emerson, 1989).

La transferrine (Tf), une glycoprotéine de 80 kDa, porte deux sites de fixation, un du côté N-terminal et un autre du côté C-terminal de la protéine, pour 1 atome de fer ferrique (Fe^{3+}). Une transferrine qui contient deux atomes de fer est appelée holo-transferrine et constitue une source de fer importante dans les milieux de culture. L'holo-transferrine permet de transporter le fer de l'environnement extracellulaire de la cellule vers le compartiment interne de la cellule. La capture s'effectue par le récepteur de la transferrine 1 (Tf-R1) qui lie les molécules de holo-transferrine (Cheng *et al.*, 2004; Figure 6). Les récepteurs de la transferrine (Tf-R1) sont exprimés de façon ubiquitaire chez les cellules et sont retrouvés dans des puits recouverts de clathrine. Un deuxième récepteur (Tf-R2) n'est exprimé que



chez les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules de la crypte du duodenum (Kawabata *et al.*, 1999). Le complexe Fe-Tf est alors internalisé dans des vésicules d'endocytose. L'acidification de l'endosome par l'entrée de protons H^+ via une ATPase permet la libération du fer de la transferrine et la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) par une ferriréductase non identifiée (Hentze *et al.*, 2004). La sortie du fer de la vésicule d'endocytose vers le cytosol va impliquer des transporteurs parmi lesquels DMT1, un transporteur de métaux divalents, qui pourrait jouer un rôle majeur (Andrews, 1999).

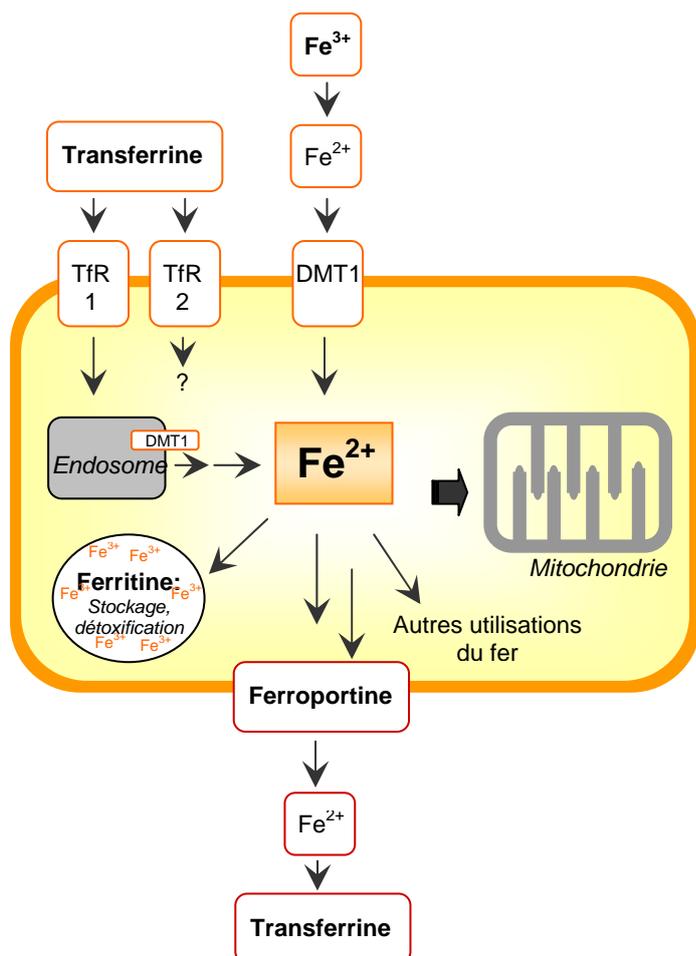
Figure 6 : Représentation schématique de l'internalisation du fer par le récepteur de la transferrine 1 (Tf-R1) (adaptée de Richardson and Ponka, 1997).

Le récepteur et l'apo-transferrine restants sont alors recyclés au niveau de la membrane plasmique.

Enfin, il y a transfert du fer vers la mitochondrie où il passe la membrane par l'intermédiaire d'un transporteur et s'incorpore dans différentes enzymes (aconitase, cytochrome C...), leur permettant ainsi d'être fonctionnelles.

2.2.3.3. Les formes de transport et de stockage du fer de faible poids moléculaire

Le fer est l'élément métallique le plus abondant sur terre après l'aluminium. Il est indispensable à toutes les formes de vie. Cependant, sous son état d'oxydation le plus stable (Fe^{3+}) il est insoluble dans les fluides biologiques. Il est donc solubilisé dans les espèces



vivantes sous formes de complexes ferriques, généralement protéiques, comme les Fe^{3+} -transferrines.

Pour la formulation de milieux de culture sans protéine, la transferrine peut être remplacée par l'utilisation de sels ferriques, généralement des sels de sulfate de fer (Burgener and Butler, 2006) ou encore des complexes de faible poids moléculaire, comme le citrate de fer (Franek and Dolnikova, 1991). *In-vivo*, le fer non lié à la transferrine est une forme biochimique où le fer est lié à des ligands de faible poids moléculaire comme le citrate, l'ADP ou encore l'acétate. Cette forme de transporteur de fer apparaît particulièrement au cours des surcharges en fer.

Figure 7 : Métabolisme cellulaire du fer (DMT1 : DiMetal Transporter 1, TfR : récepteur de la transferrine) (adaptée de Hentze *et al.*, 2004).

Des études ont montré qu'il existe des systèmes de transport membranaire autres que celui du transporteur de la transferrine (TfR), on parle de « non-transferrin-bound iron » (NTBI) (Hentze *et al.*, 2004; Richardson and Ponka, 1997; Sturrock *et al.*, 1990). Le NTBI met en jeu principalement un transporteur appelé DMT1 (DiMetal Transporter 1) ou Nramp2 (Fleming *et al.*, 1998; Figure 7). Ce transporteur est présent à des taux élevés dans les entérocytes de la bordure en brosse duodénale. Il n'est pas spécifique du fer puisqu'il peut également intervenir dans le transport d'autres cations divalents (Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+}). D'autres mécanismes de transport, non encore clairement définis, mettent en jeu la protéine SFT (Stimulator of Fe transport). Le transporteur de métaux divalents (DMT1) permet également de transporter le fer ferreux, apporté préalablement via le transporteur de la transferrine sous forme ferrique, de l'endosome vers le cytoplasme (Figure 6 & Figure 7).

Pour pouvoir être transporté à l'intérieur de la cellule, le fer ferrique (Fe^{3+}) complexé au citrate est d'abord réduit en fer ferreux (Fe^{2+}) par l'intermédiaire d'une réductase localisée à la surface membranaire (Richardson and Ponka, 1997). Par ailleurs, la présence d'un transporteur de fer ferreux est également nécessaire (Jordan and Kaplan, 1994). A partir de cellules HeLa et de fibroblastes de peau humaine, Jordan et Kaplan (1994) ont montré que le transport du fer et celui du citrate se font de façon indépendante. Ils ont démontré que le taux d'accumulation du fer est 3 à 5 fois plus élevé que celui du citrate.

Une fois incorporé dans la cellule, le fer peut soit être utilisé à des fins fonctionnelles, soit être stocké. Le fer non utilisé immédiatement peut être stocké sous forme de ferritine. Cette dernière est constituée de 24 sous-unités qui forment une cavité protéique. Pour pénétrer dans cette cavité, le fer ferreux est oxydé en fer ferrique par une activité ferroxydase liée à la sous-unité H de la ferritine. L'atome de fer est alors importé dans la cavité par des canaux situés entre les sous-unités.

Le fer est un métal de transition indispensable pour les cellules puisqu'il intervient dans de nombreux processus métaboliques essentiels à la vie cellulaire tels que le transport d'oxygène membranaire et le transfert des électrons dans la chaîne respiratoire. Il participe aussi à de nombreuses réactions enzymatiques puisqu'il est indispensable à l'activité des enzymes ferrodépendantes comme la ribonucléotide-réductase, nécessaire à la synthèse des désoxyribonucléotides et donc à la synthèse de l'ADN.

Toutefois, l'excès de fer est délétère pour les cellules puisqu'il favorise l'apparition de radicaux libres extrêmement toxiques. En effet, l'oxygène est essentiel pour le métabolisme aérobie en tant qu'accepteur final des électrons de la chaîne respiratoire, mais son utilisation entraîne la formation des molécules dérivées de l'oxygène appelées ROS (reactive oxygen

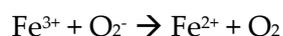
species). Les molécules ROS font référence notamment au peroxyde d'oxygène (H_2O_2), à l'anion superoxide $\text{O}_2^{\cdot-}$ et au radical hydroxyle (OH^{\cdot}) très toxiques pour les cellules.

Comme le montrent les équations suivantes, en présence de fer libre intracellulaire, le radical hydroxyle est produit à partir du peroxyde d'hydrogène.

Réaction de Fenton



Catalyse de la réaction de Haber-Weiss par la réaction de Fenton



Réaction de Haber-Weiss catalysée par le fer



Alors que le passage de l'anion superoxide de l'environnement externe au cytoplasme de la cellule nécessite l'utilisation de canaux spécifiques de transport, le peroxyde d'hydrogène peut traverser les membranes cellulaires facilement. Ce passage permet de délocaliser la production de radical hydroxyle, très réactif, ce qui conduit à l'oxydation des protéines, la peroxydation lipidique ou encore des dommages de l'ADN, pour aboutir à la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose.

Ainsi, la présence de complexes tels que le citrate de fer couplé à la présence de la ferritine permettent de limiter la disponibilité en fer libres susceptibles d'accélérer la formation de molécules ROS.

2.2.3.4. Les hydrolysats protéiques

Depuis près d'une dizaine d'années, des hydrolysats peptidiques sont généralement utilisés comme additifs dans les milieux sans sérum. Ces hydrolysats sont de faibles coûts et sont obtenus à partir de la digestion enzymatique de viande (Schlaeger, 1996) ou encore de protéines du lait (Amiot *et al.*, 2004). Ces hydrolysats contiennent des mélanges non définis de composés de faible poids moléculaire tels que des acides aminés, des peptides, des vitamines et des éléments traces. L'ajout d'hydrolysats peptidiques dans des milieux de

culture pour la croissance cellulaire a été testé pour de nombreuses lignées cellulaires : CHO, hybridomes, BHK, Vero, lymphocytes etc... (Schlaeger, 1996). Les fonctions biologiques des hydrolysats sont diverses:

- ✓ *Nutritive* : acides aminés libres/petits peptides
contaminants tels que les carbohydrates et vitamines
- ✓ *Protecteur* : activité anti-apoptotique
contraintes de cisaillement
- ✓ *Stimulation cellulaire* : peptides ayant les mêmes propriétés que les facteurs de croissance

Depuis quelques d'années, afin de garantir davantage la sécurité biologique des produits pharmaceutiques, des milieux sans aucune matière première d'origine animale ont été développés. La formulation de ces milieux de culture sans sérum et sans protéine fait alors intervenir des hydrolysats végétaux (soja, blé, riz, colza). L'utilisation de ces hydrolysats végétaux s'est donc largement développée comme en témoignent les nombreux brevets et publications (Donaldson and Shuler, 1998 ; Franek *et al.*, 2000 ; Heidemann *et al.*, 2000; Keen and Rapson, 1995; Marc *et al.*, 2006; Mols *et al.*, 2005). Une autre alternative consiste à utiliser des hydrolysats de levures (Kim *et al.*, 2005 ; Sung *et al.*, 2004) ou certaines fractions de ces hydrolysats ayant de meilleures activités biologiques que l'hydrolysat initial (Mendonça *et al.*, 2007 ; Shen *et al.*, 2007;).

La substitution du sérum par des hydrolysats peptidiques présente plusieurs avantages :

- ✓ les peptides sont de faible poids moléculaire,
- ✓ aucune hormone n'est apportée facilitant ainsi les études de composition des milieux de culture,
- ✓ leur coût est peu élevé,
- ✓ les hydrolysats végétaux ou de levures permettent de diminuer le risque d'incorporation d'agents pathogènes potentiels dans les milieux.

Toutefois, les hydrolysats peptidiques et les fractions peptidiques de ces hydrolysats présentent l'inconvénient d'être de composition partiellement définie ou non définie. Par ailleurs, une variabilité lot à lot peut également être rencontrée. Afin de contourner cet écueil, la société SAFC a récemment développé un milieu de culture à partir de fractions chimiquement définies qui contiennent les substances actives comprises initialement dans les hydrolysats de soja ou de levures. Ce milieu, développé pour les cellules CHO, est donc chimiquement défini. Ce milieu nommé « Ex-cell CD hydrolysate fusion » peut également être utilisé pour la culture de lignées NS0 et Sp2/0 (Deeds, 2009).

2.2.3.5. Les surfactants

La recherche d'additifs pour protéger les cellules des contraintes hydrodynamiques a commencé dans les années 1950 avec l'utilisation de méthylcelluloses (Bryant, 1966). D'autres additifs ont été introduits dans les années 1960, les plus connus étant le sérum, l'albumine, les surfactants non-ioniques (par exemple, les pluronics) et les mélanges de diverses protéines. L'effet protecteur de nombreux surfactants dans les milieux de culture a été largement étudié dans les années 90 en vue de formuler des milieux sans sérum ou sans protéine, autrement dit sans albumine. Divers surfactants ont donc été étudiés parmi lesquels le pluronic F-68, les dextrans ou encore les polyéthylènes glycol (Chattopadhyay *et al.*, 1995 ; Ramirez and Mutharasan, 1990).

Les additifs chimiques de type tensio-actif protègent les cellules cultivées en suspension. Ils permettent probablement de diminuer la fragilité des cellules (mécanisme biologique) ou de réduire les contraintes de cisaillement par leur interaction avec l'interface gaz-liquide (mécanisme physico-chimique). Dans l'objectif qu'un consensus soit établi dans l'emploi des termes « protection biologique » et « protection physique », les terminologies suivantes ont été proposées (Michaels *et al.*, 1991):

- ✓ Un mécanisme de « **protection biologique** » implique que les agents tensio-actifs changent les propriétés cellulaires de façon à rendre les cellules plus résistantes aux contraintes de cisaillement. Dans cette optique, deux mécanismes peuvent être envisagés. Premièrement, il pourrait y avoir une altération rapide sans intervention d'événements métaboliques, le surfactant serait adsorbé dans la membrane plasmique, c'est-à-dire *a fast-acting biological mechanism*. Deuxièmement, les additifs pourraient apporter des changements cellulaires faisant intervenir des événements métaboliques. Dans ce cas, il est nécessaire que l'additif soit en contact des cellules au moins le temps d'une génération cellulaire. On parle alors de *metabolic biological mechanism*.
- ✓ Un mécanisme de « **protection physique** » des additifs signifie que la résistance des cellules aux contraintes de cisaillement reste inchangée. En revanche, le niveau ou la fréquence de transmissions des contraintes de cisaillement vis-à-vis des cellules dans le milieu de culture ont changé. En effet, la présence de surfactant permettrait de modifier les caractéristiques du milieu de culture.

Toutefois, la nécessité du recours à ces surfactants doit être considérée avant utilisation car ils peuvent, au même titre que le sérum ou l'albumine, engendrer des contraintes supplémentaires lors des étapes de purification (Murhammer and Goochee, 1990)

❖ Cas particulier du pluronic F-68

Le pluronic F-68, encore appelé Lutrol[®] F68 et Poloxamer 188, est un surfactant synthétique non-ionique, dont la structure polymérique contient un centre hydrophobe constitué de chaînes d'oxyde de propylène (PPO) et d'extrémités hydrophiles d'oxyde d'éthylène (PEO) (Ahmed *et al.*, 2001).

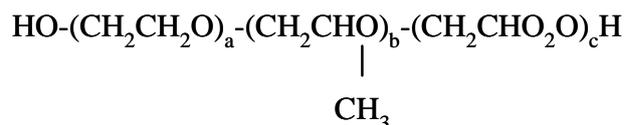


Figure 8 : Structure du pluronic.

Le poids moléculaire moyen du pluronic F-68 est de 8,4 kDa dont l'oxyde de propylène contribue à 80% du poids total. Les molécules de pluronic sont caractérisées par leurs valeurs variables a, b et c (Figure 8). Le pluronic F-68 a les valeurs moyennes suivantes: a=75, b=30 et c=75.

Depuis plus de 40 ans, le pluronic F-68 est utilisé pour les cultures de cellules animales en bioréacteur fortement agité et/ou aéré qui sont sous la contrainte des bulles et de l'aération à l'interface gaz/liquide. Deux causes mécaniques peuvent être à l'origine de l'endommagement des cellules et du retardement de leur croissance :

- ✓ Lorsqu'il y a présence d'une phase gazeuse dans le réacteur, en injectant les gaz par le « sparger », il y a alors formation de bulles qui peuvent endommager les cellules par des interactions cellules-bulles. Celles-ci conduisent à la mort des cellules lorsque les bulles éclatent à l'interface gaz-liquide (Handa-Corrigan *et al.*, 1989). La présence de pluronic dans le milieu de culture permet de stabiliser la couche de mousse à la surface du liquide (Handa-Corrigan *et al.*, 1989; Jordan *et al.*, 1994 ; Michaels *et al.*, 1991), de limiter les forces hydrodynamiques induites par l'éclatement des bulles (Dey *et al.*, 1997) et de réduire les interactions bulles-cellules (Chattopadhyay *et al.*, 1995 ; Meier *et al.*, 1999 ; Michaels *et al.*, 1995).
- ✓ Lorsqu'il y a absence de phase gazeuse et lorsque le réacteur est agité à une vitesse élevée (200-700 rpm), alors un stress hydrodynamique lié aux contraintes de cisaillement peut altérer les cellules. En effet, selon le principe de l'échelle de Kolmogorov, si les turbulences sont de la même taille que les cellules, à savoir 9-15

μm , ou plus petites que ces dernières alors elles sont susceptibles de les endommager (Papoutsakis, 1991).

Toutefois, il a également été montré que le pluronic F-68 a un impact sur les cellules cultivées en mode statique. En effet, en présence de pluronic F-68, la croissance de fibroblastes et de mélanomes est stimulée (Bentley *et al.*, 1989). De plus, la croissance de deux lignées lymphocytaires humaines a également été améliorée en présence de 0,05 et 0,1% de pluronic F-68 (Mizrahi, 1975). Cet auteur suggère que le pluronic F-68 permettrait de faciliter l'incorporation par les cellules de métabolites contenus dans le milieu de culture. En raison de ses propriétés d'agent tensio-actif, le pluronic F-68 interagirait avec la membrane plasmique des cellules (Firestone and Seifert, 2005). Plus récemment, il a été montré que le pluronic F-68, en formant une couche protectrice à la surface de la membrane cellulaire, permet d'induire une baisse significative de l'hydrophobicité membranaire des cellules CHO (Tharmalingam *et al.*, 2008). En outre, d'autres auteurs ont mis en évidence l'incorporation de pluronic F-68 au sein de cellules CHO et de chondrocytes. Ainsi, grâce à un dérivé fluorescent du pluronic F-68, l'internalisation dans les cellules de pluronic F-68 a été caractérisée, et les résultats montrent que le surfactant entre dans les cellules par endocytose (Gigout *et al.*, 2008). Par ailleurs, cette étude met également en exergue que contrairement aux chondrocytes, les cellules CHO ont la capacité d'éliminer le pluronic F-68 fluorescent intracellulaire au cours de la culture.

De façon similaire, une large gamme de pluronics (P-85, L-61, F-127 ou P-105) permet d'augmenter la biodisponibilité de médicaments, suggérant fortement l'incorporation des pluronics à travers la membrane cellulaire (Batrakova *et al.*, 1996 ; Kabanov and Alakhov, 2002 ; Rapoport *et al.*, 2002). Il a notamment été montré que les pluronics P-85, PL-35, PL-121 et PP-105 sont absorbés à la membrane et entrent très probablement par voie endocyttaire (Batrakova *et al.*, 2003 ; Rapoport *et al.*, 2002).

En pharmacopée, les surfactants non-ioniques sont donc utilisés pour la formulation de certaines molécules médicamenteuses peu solubles (Adams *et al.*, 2003 ; Jones and Leroux, 1999). L'utilisation des pluronics est approuvée par la FDA (FDA, 2003). Ils permettent d'augmenter la biodisponibilité du médicament ; ce dernier étant incorporé dans les micelles des pluronics (Figure 9). Cette incorporation permet d'augmenter la solubilité, la stabilité métabolique et le temps de demi-vie de la molécule une fois injectée chez le patient.

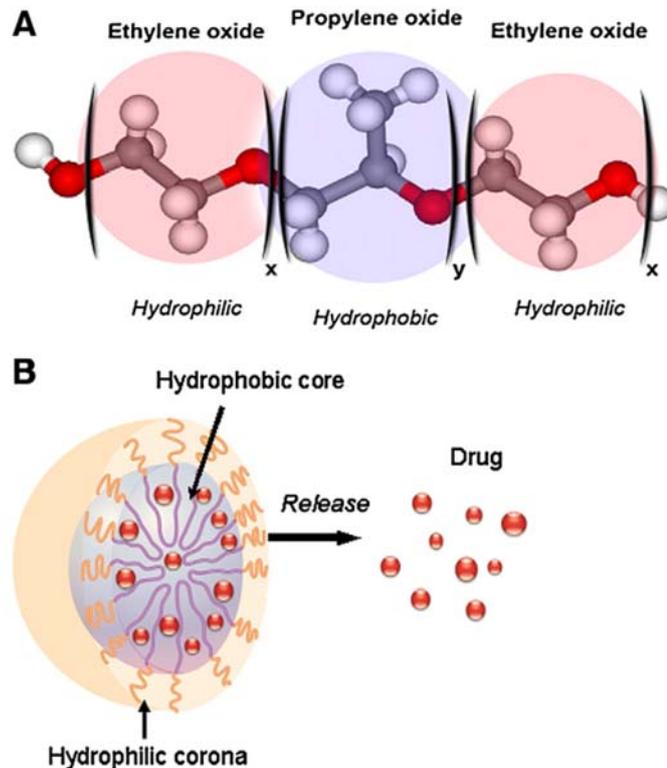


Figure 9 : Molécule de pluronic (A) et solubilisation d'un médicament dans des micelles de pluronic (B) (Batrakova and Kabanov, 2008).

2.3. Les modes de culture et les technologies des bioréacteurs

Le mode **discontinu** (batch) est un système dans lequel aucun milieu n'est ajouté ou soutiré en cours de culture, hormis l'apport d'oxygène, de CO₂ ou de base et les prélèvements d'échantillons destinés au suivi cinétique des cultures. L'épuisement d'un ou plusieurs nutriments et/ou l'accumulation de produits vont provoquer l'arrêt de la croissance ; généralement après une période de croissance de 3 à 7 jours en fonction des lignées cellulaires et des milieux de culture utilisés. La densité cellulaire maximale atteinte est généralement comprise entre 10-30 × 10⁸ cellules/L (Figure 10). Il est possible de réaliser plusieurs cultures discontinues successives en vidangeant 90% du milieu usagé contenu dans le bioréacteur en fin de croissance. Les cellules restantes sont alors réensemencées dans du milieu neuf, ce qui permet de redémarrer une nouvelle culture. Ce mode de culture est appelé « recharge-récolte ».

A l'échelle industrielle, la technologie de réacteurs particulièrement développée pour la réalisation de culture de type discontinu est le réacteur parfaitement agité par une hélice d'agitation munie de pales inclinées. Depuis une dizaine d'années, le développement de technologies jetables représente une perspective séduisante (Singh, 1999). Ces dispositifs permettent d'éviter les étapes de nettoyage tout en prévenant les risques de contaminations croisées. L'économie totale réalisée par le transfert d'une chaîne de production «inox» à une chaîne de production plastique est évaluée à plus de 30% avec les technologies actuellement disponibles. Des bioréacteurs partiellement jetables de 500 L sont aujourd'hui commercialisés, par exemple, par la société Wave Biotech.

A l'échelle du laboratoire, le mode discontinu est généralement utilisé pour l'étude de l'influence de la composition du milieu et des paramètres opératoires sur les performances cinétiques et physiologiques des cellules (Fenge and Lüllau, 2006). Dans ce cas, le recours à des technologies de culture à petites échelles et simplifiées est souvent employé :

- ✓ flacons de Roux, plaques multipuits... (pour les cultures non agitées)
- ✓ flacons agités de type « *spinner* », fioles d'Erlenmeyer, roller bottles, tubes de centrifugation modifiés agités de manière horizontale sur une plateforme... (pour les cultures agitées)

Les fioles d'Erlenmeyer ont été auparavant largement utilisées, aussi bien pour les cultures microbiennes que pour les cultures de cellules animales ; le principe du mélange étant une agitation orbitale. Jusqu'à récemment, le passage à plus grande échelle avec ces systèmes de culture demeurait limité en raison du faible volume utile (entre 10 et 20% du volume total). Cependant, des poches plastiques de formes cylindriques et à usage unique ont été dimensionnées jusqu'à un volume maximal de 2000 L (Hacker *et al.*, 2009 ; Stettler, 2007).

En mode **semi-continu** (fed-batch), le milieu de culture est ajouté en continu ou par paliers au réacteur. Aucun soutirage n'est réalisé, le volume du milieu de culture dans le bioréacteur augmente donc au cours de la culture. Par comparaison avec le mode discontinu, le mode semi-continu permet de prolonger la phase de croissance par l'apport d'éléments nutritifs, ce qui engendre généralement une productivité accrue puisque le procédé se poursuit sur une période plus longue. Compte tenu de cet intérêt économique indiscutable, le mode semi-continu est fréquemment utilisé pour les productions à l'échelle industrielle et s'est énormément développé ces dernières années.

En mode **continu**, le milieu de culture est ajouté en permanence alors que le même volume de milieu usagé contenu dans le réacteur est soutiré. Il n'y a donc aucune variation de volume. Ce mode de culture présente l'avantage de permettre une viabilité correcte des

cellules pendant une longue période pouvant aller jusqu'à plusieurs mois ainsi qu'un environnement physico-chimique stable. En raison des faibles productivités obtenues (concentrations cellulaires faibles), ce mode de culture est très peu utilisé dans l'industrie. De façon à améliorer la densité cellulaire, et par conséquent les performances du mode continu, les réacteurs peuvent être munis d'un dispositif de rétention des cellules qui permet alors de soutirer du milieu de culture tout en maintenant les cellules dans le réacteur. On parle de réacteur avec rétention cellulaire ou réacteurs **perfusés**. Le mode de culture perfusé permet d'obtenir des densités cellulaires très élevées et d'utiliser des taux de dilution supérieurs à la vitesse spécifique maximale de croissance (Mercille *et al.*, 2000).

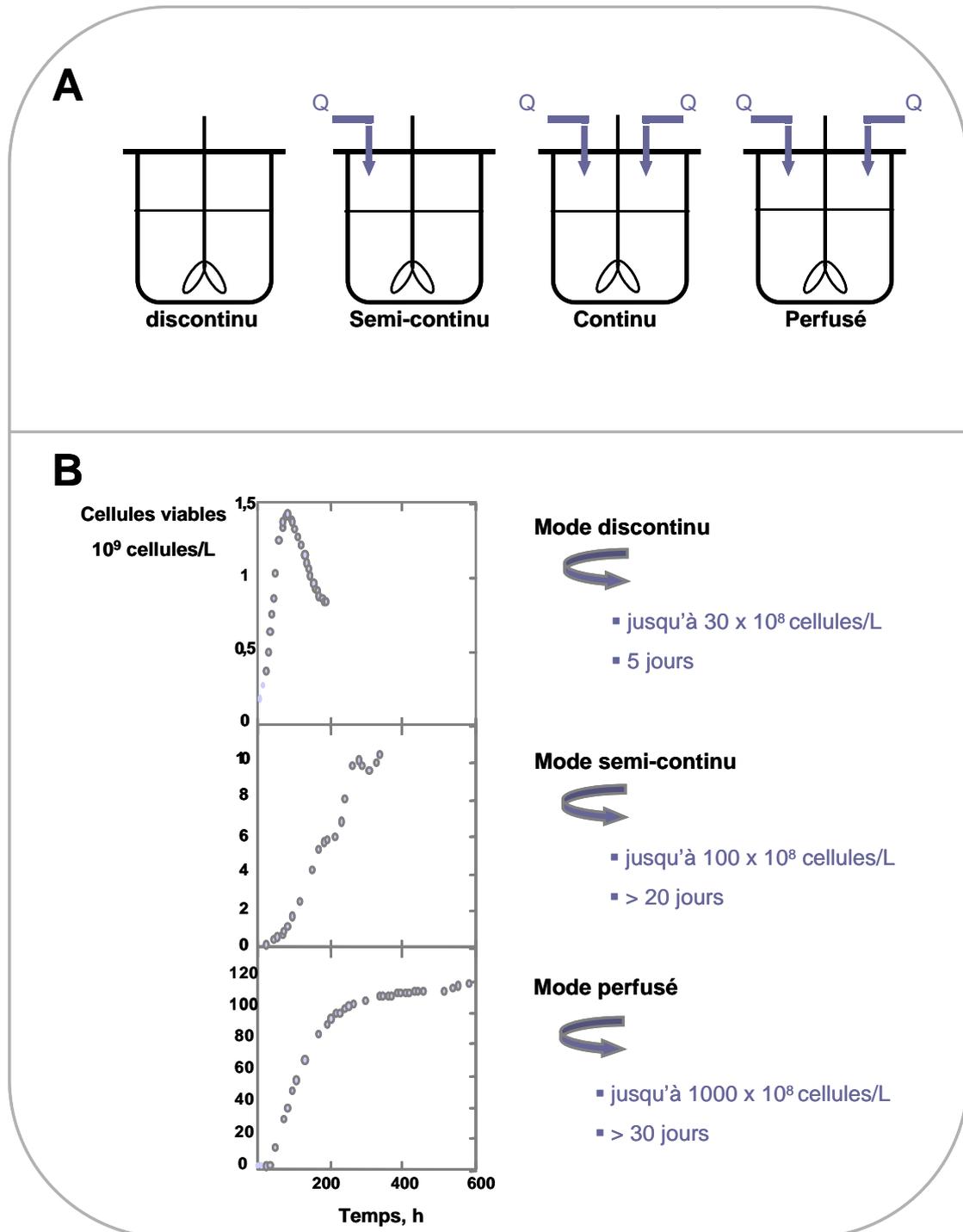


Figure 10 : Représentation schématique des différents modes de culture (A) et des profils de cinétique de croissance en fonction des modes de culture (B) (Q = débit d'alimentation ou de soutirage).

2.4. La mort cellulaire

Au tout début des procédés de culture de cellules de mammifère, le processus de mort cellulaire n'était que peu pris en considération. Pourtant, différents facteurs propres à la mise en œuvre de cellules dans un environnement tel que le bioréacteur sont à l'origine de l'entrée en processus de mort cellulaire : l'agitation, la composition du milieu de culture, l'accumulation de produits à des concentrations toxiques, une hypoxie, ou encore le pH, l'osmolarité... Aussi, depuis plusieurs années maintenant, les dommages cellulaires causés par la mise en œuvre de cellules dans les bioréacteurs commencent à être davantage étudiés (Goergen *et al.*, 1993. Différentes stratégies basées sur la compréhension des mécanismes intervenant lors de la mort cellulaire ont été développées. L'évaluation de l'engagement des cellules vers la mort ainsi que l'acquisition de nouvelles stratégies permettent de contrôler le processus de mort cellulaire et indirectement d'augmenter les rendements de production. Deux mécanismes peuvent être empruntés par les cellules lors de la mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose. Ces deux types de mort cellulaire peuvent se produire simultanément dans la cellule.

2.4.1. Les mécanismes de mort cellulaire

2.4.1.1. La nécrose

La mort par nécrose est un phénomène passif et catabolique, principalement provoqué par une perte d'intégrité membranaire précoce qui, dans le cas de la culture cellulaire, peut être lié à des conditions stressantes pour les cellules. Elle se traduit par un gonflement de la cellule, suivi par la rupture de la membrane plasmique (Figure 11). Cette lyse entraîne la libération du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire. Lorsque la nécrose a lieu dans les tissus, cette réaction entraîne une réponse inflammatoire. Contrairement à l'apoptose, la chromatine n'est pas fragmentée mais lysée et les organites cellulaires sont détruits. La lyse cellulaire au cours de culture de cellules animales peut être déterminée en mesurant l'activité de la LDH dans le milieu de culture (Bour *et al.*, 1988 ; Goergen *et al.*, 1993 ; Legrand *et al.*, 1992 ; Racher *et al.*, 1990).

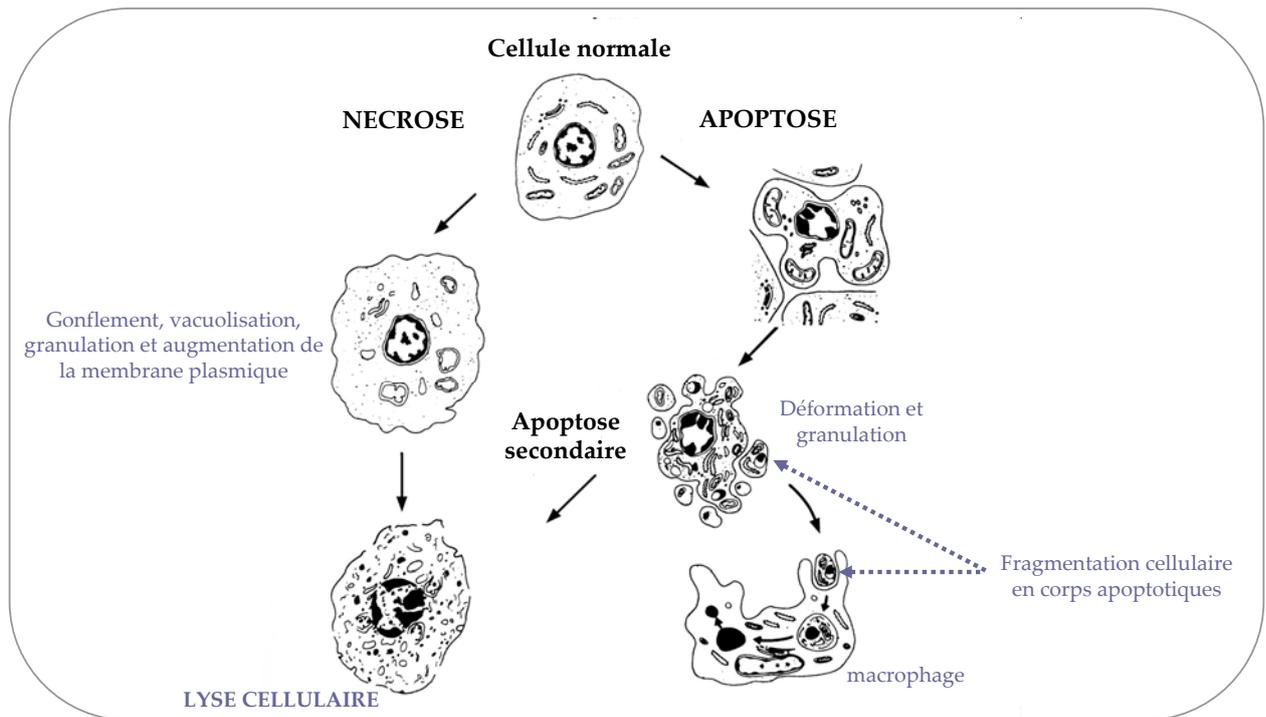


Figure 11 : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose (d'après Barbouche, 2008).

2.4.1.2. L'apoptose

La mort cellulaire programmée ou apoptose est un phénomène rapide (environ 1 heure). Le phénomène d'apoptose entraîne une série d'événements moléculaires et biochimiques qui conduisent à des changements morphologiques (Lockshin and Williams, 1965). Ces altérations morphologiques sont spécifiques à l'apoptose, ce qui permet d'identifier ce type de mort cellulaire. Un des premiers changements observables est la réduction du volume cellulaire liée à la condensation du cytoplasme. En dépit de la rétraction cellulaire progressive, les organites intracellulaires restent intacts et conservent leur aspect normal jusqu'à la phase terminale de l'apoptose. Le noyau présente aussi des modifications puisqu'une condensation de la chromatine est observable à la périphérie de la membrane nucléaire. Ensuite, cette enveloppe nucléaire se désintègre et la chromatine se fragmente en petites masses distinctes. Des vésicules comprenant des amas de chromatine et des fragments cytoplasmiques sont alors formées à la surface des cellules (Figure 11 & Figure 12). Lorsque l'apoptose a lieu dans un tissu, ces corps apoptotiques sont rapidement phagocytés par les macrophages, empêchant ainsi l'induction d'une réaction inflammatoire. Au cours de

culture cellulaire *in-vitro*, les corps apoptotiques vont alors s'accumuler au cours du procédé ou être fragmentés.

De nombreux signaux inducteurs peuvent être à l'origine de l'engagement des cellules dans le processus apoptotique (hypoxie, agents cytotoxiques, limitations en substrats, infection...). En dépit de la diversité de ces signaux inducteurs, toutes les cellules en voie d'apoptose montrent des modifications morphologiques et biochimiques similaires, suggérant l'existence d'une phase effectrice commune à tous les types cellulaires, à savoir l'activation irréversible de protéases à cystéine appelées caspases (orchestrées par la mitochondrie) et qui conduisent à la dégradation de l'ADN en fragments oligonucléosomiques.

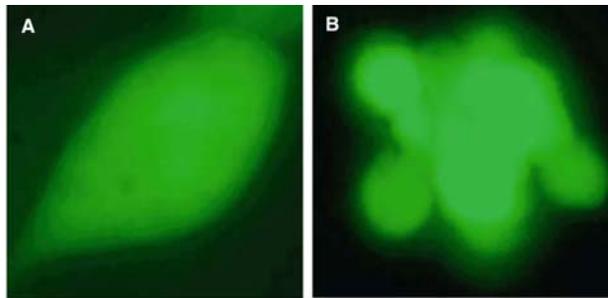


Figure 12 : Caractéristiques morphologiques de cellules CHO saines (A) et en apoptose (B). Les cellules ont été transfectées par la GFP (Arden and Betenbaugh, 2006).

Le processus d'apoptose peut intervenir à 3 niveaux cellulaires (Arden and Betenbaugh, 2004 ; Figure 13) :

- ✓ dans la mitochondrie (facteurs anti-apoptotiques Bcl2 et Bcl-xL, facteurs pro-apoptotiques Bax et Bak, cytochrome c, libération de caspases...)
- ✓ dans le RE (inhibition du processus de glycosylation, de formation des ponts disulfures, déplétion en calcium...)
- ✓ à la surface cellulaire (induction des récepteurs appartenant à la superfamille des TNF).

Ainsi, pour les procédés de culture de cellules animales, la connaissance des gènes des molécules impliquées ainsi que la caractérisation de leur mode d'action et d'activation, de leurs spécificités cellulaires et de substrats, représentent un enjeu scientifique important. La caractérisation de ces paramètres peut alors être utilisée pour la mise au point de stratégies permettant de réduire ou retarder l'entrée des cellules dans le processus d'apoptose.

La caractérisation du processus d'apoptose peut se faire par différentes techniques analytiques :

- la mesure de la fragmentation d'ADN par PCR,
- la détection de caspases clivées (lors de leur activation) ou de l'enzyme PARP (polymérase) par Western-blot,
- la détection de la perte d'assymétrie phospholipidique de la membrane cellulaire et le marquage de l'ADN par cytométrie.

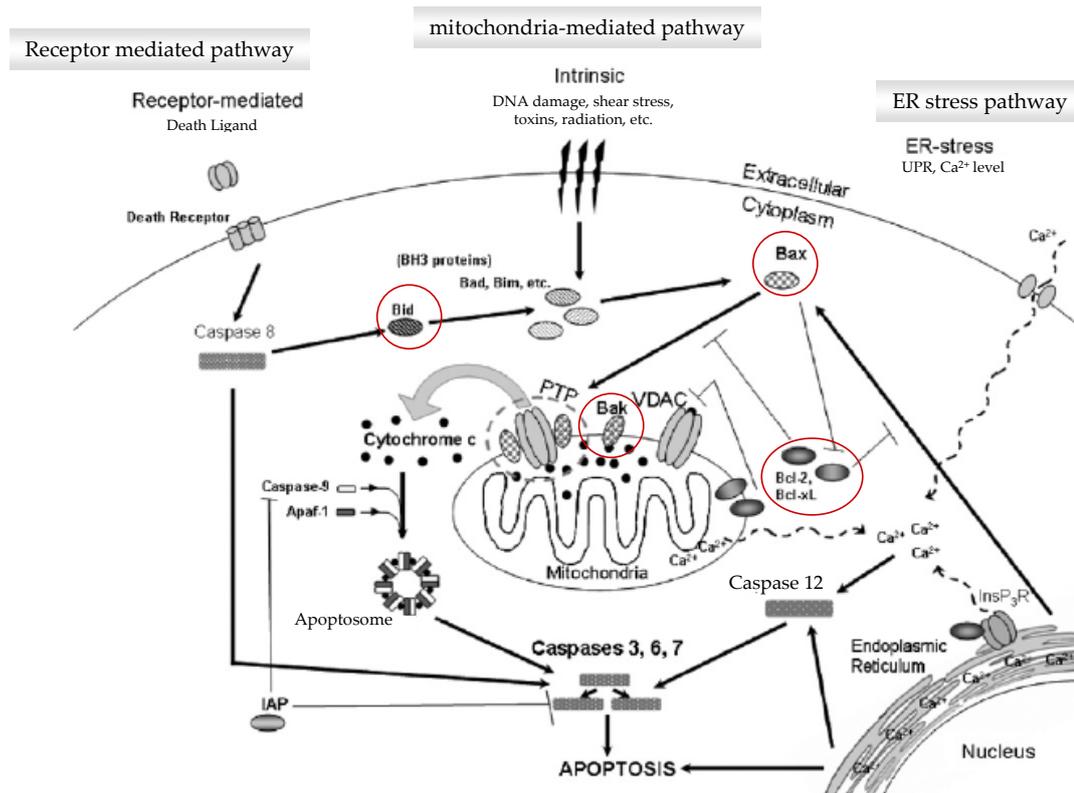


Figure 13 : Représentation schématique des 3 niveaux de déclenchement du processus d'apoptose.

2.4.2. La mort cellulaire en systèmes de culture agités

2.4.2.1. Impact de l'environnement

La culture de cellules en bioréacteur inflige aux cellules un stress physique. L'aération par bullage d'air (Chisti, 2000 ; Hu *et al.*, 2008) et l'homogénéisation du milieu par agitation mécanique (Al-Rubeai *et al.*, 1995) participent généralement à l'induction de dommages cellulaires.

De plus, des limitations nutritives peuvent être à l'origine de l'apoptose. Ainsi, les milieux sans sérum ont tendance à accentuer les phénomènes de mort des cellules CHO par apoptose (Goswami *et al.*, 1999 ; Sun and Lee, 2008 ; Zanghi *et al.*, 1999a). De la même façon, une limitation en glucose ou en acides aminés peut provoquer une forte mortalité par apoptose (Al-Rubeai and Singh, 1998). Pour les cellules d'hybridomes et de myélomes, une production élevée de lactate peut également être à l'origine de mort cellulaire par nécrose (Mercille and Massie, 1994). Une limitation en fer peut également induire une mortalité par apoptose ; ce phénomène a notamment été rapporté pour les hépatocytes (Rakba *et al.*, 2000), les cellules tumorales humaines de cerveau (Simonart *et al.*, 2002) et les cellules Raji (Fukuda *et al.*, 1996 ; Koc *et al.*, 2006 ; Kovar *et al.*, 2001).

2.4.2.2. Stratégies de limitation de la mort cellulaire

Différentes stratégies ont été développées pour composer les effets des contraintes mécaniques parmi lesquelles l'utilisation de surfactants (cf paragraphe 2.2.3.5 de la synthèse bibliographique). Concernant les limitations biochimiques, deux principales méthodes peuvent être distinguées ; (i) le génie génétique, (ii) l'apport chimique et nutritif.

Ainsi, concernant la stratégie par génie génétique, des cellules CHO transfectées par des gènes de la famille de Bcl-2 ont montré une viabilité plus élevée en comparaison aux cellules CHO non transfectées lors de conditions stressantes (en absence de sérum, glucose, glutamate, asparagine et autres nutriments et en contact d'agents toxiques, viraux) (Arden and Betenbaugh, 2004). Par ailleurs, l'insertion d'un agent inhibiteur des caspases-9, -3 et -7 a permis d'augmenter la viabilité cellulaire des cellules CHO et des cellules HEK 293 (Sauerwald *et al.*, 2003). Citons encore la surexpression du récepteur IGF-1 en combinaison avec l'apport dans le milieu d'IGF et de transferrine, ce qui permet de maintenir une viabilité cellulaire élevée des cellules CHO cultivées en milieu sans sérum (Sunstrom *et al.*, 2000).

Concernant les stratégies de suppléments, il a été démontré qu'un apport en surimine, une molécule ayant des propriétés anti-tumorales, permet d'augmenter de 25% la viabilité des cellules CHO (Zanghi *et al.*, 2000). Par ailleurs, des suppléments en glutamine, asparagine, thréonine, glucose, glycine bétaine et glycine permettent également d'avoir un effet positif sur la viabilité cellulaire (Arden and Betenbaugh, 2004 ; deZengotita *et al.*, 2002 ; Sanfeliu and Stephanopoulos, 1999).

3. Hétérogénéité de structure protéique dans les cellules animales

3.1. Infidélité de transcription

Les cellules CHO étant des cellules tumorales, l'hétérogénéité de structure protéique parfois obtenue au cours de procédés de culture cellulaire pourrait être liée à des mutations, insertions ou délétions. Cependant, ces mutations somatiques ne suffisent pas à expliquer l'hétérogénéité des cellules cancéreuses. En effet, les mutations somatiques restent des événements rares (3,1 par 10^6 bases), générant en moyenne 90 substitutions d'acides aminés par tumeur (Sjoblom *et al.*, 2006), chiffre largement insuffisant pour expliquer l'hétérogénéité observée dans les études de protéomique.

Récemment, la société Genclis a montré que les ESTs (Expressed Sequence Tag) issues de tissus cancéreux comportent une hétérogénéité augmentée et non aléatoire par rapport aux ESTs issues de tissus sains (Brulliard *et al.*, 2007). En effet, l'analyse des ESTs issues de tissus cancéreux ou normaux, correspondant à 17 gènes abondamment exprimés, a permis de montrer que pour plus de 70% des gènes étudiés, les ESTs cancéreuses présentent plus de variations que les ESTs normales. Ces variations ne peuvent pas être expliquées par l'existence de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). L'application de filtres bioinformatiques drastiques n'entraîne pas la perte de cette hétérogénéité. Par ailleurs, les variations d'ESTs cancéreuses ne sont pas des événements aléatoires mais dépendent de la composition de la base substituée et de la composition des quatre bases précédant (b-4) et des trois bases suivant (b+3) l'événement de substitution. La base de remplacement est elle aussi non aléatoire et correspond, dans près de 75% des cas, à la base précédant (b-1) ou suivant (b+1) la substitution. Ainsi, ils ont montré que pour 15 des 17 gènes étudiés, l'hétérogénéité des ESTs cancéreuses est largement augmentée par rapport aux ESTs normales.

Ainsi, cette approche pourrait, à juste titre, être utilisée en vue de déterminer si l'hétérogénéité des protéines parfois observée au cours de procédés de production de protéines recombinantes ne serait pas liée à la cellule hôte CHO en tant que cellule tumorale. Toutefois, cette approche nécessite un nombre d'ESTs répertorié suffisamment élevé (≥ 30) de la protéine d'intérêt pour pouvoir prédire de façon significative si l'hétérogénéité de cette dernière pourrait être la conséquence d'une infidélité de transcription.

3.2. Protéolyse

Bien que les capacités de sécrétion des protéines des cellules animales ne soient pas complètement exploitées, les protéines recombinantes produites sont sécrétées dans le milieu de culture, ce qui permet de faciliter la récupération de la protéine ainsi que les étapes qui suivent la production (downstream processing) (Peng *et al.*, 2010). Toutefois, les protéines recombinantes sont en contact direct avec les protéases libérées par les cellules mortes dans le milieu extracellulaire. Si la viabilité cellulaire est maintenue élevée au cours de la phase de production, le niveau de protéases cytoplasmiques libérées dans le milieu de culture devrait être maintenu à un niveau faible. En revanche, les protéases extracellulaires, qui sont sécrétées ou liées à la membrane, sont en contact direct avec la protéine recombinante. Du point de vue des bioprocédés, il est difficile d'attribuer la protéolyse à une enzyme spécifique puisque différentes protéases peuvent avoir des spécificités identiques et peuvent également interagir l'une avec l'autre. C'est pourquoi, la prévention contre la protéolyse reste d'une façon générale relativement difficile (Barrett *et al.*, 1998).

3.2.1. Classification des enzymes protéolytiques

Différentes appellations existent pour désigner les enzymes qui clivent des peptides ou protéines : protéases, protéinases, peptidases ou encore enzymes protéolytiques.

Les peptidases peuvent être classées selon 2 types : les exopeptidases qui libèrent des mono, di, ou tri-peptides aux extrémités des protéines et les endopeptidases qui hydrolysent des liens peptidiques à l'intérieur des protéines.

Les exopeptidases peuvent être des aminopeptidases si l'acide aminé situé en position N-terminale est clivé, des dipeptidylpeptidases et des tripeptidylpeptidases si respectivement les dipeptides et tripeptides en position N-terminale sont clivés. Lorsque l'acide aminé en position C-terminale est clivé, les exopeptidases sont alors des carboxypeptidases. Si le dipeptide en position C-terminale est clivé, on parle de peptidyl-dipeptidases. Si les dipeptides sont clivés en simples acides aminés, on parle alors de dipeptidases et enfin lorsqu'un dipeptide est clivé quelle que soit sa position sur la protéine, les enzymes sont appelées des omega peptidases (Barrett, 1994 ; Barrett *et al.*, 1998 ; Figure 14).

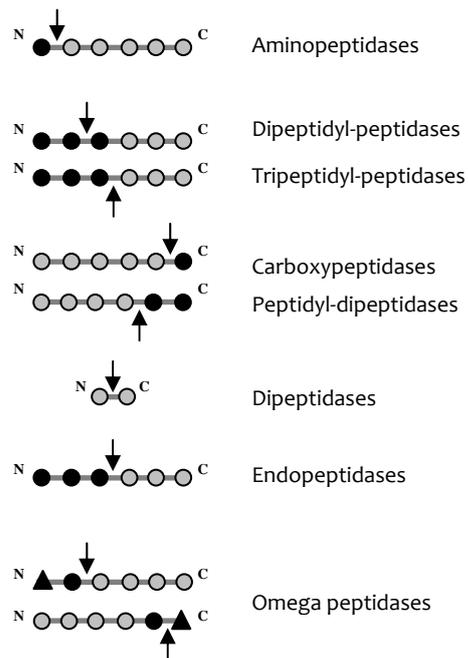


Figure 14: Nomenclature de l'activité des exo- et endopeptidases (Mols, 2004).

Les protéases à sérine possèdent une triade catalytique caractéristique comprenant une sérine, une histidine et un aspartate. Le groupement hydroxyle de la sérine joue le rôle de nucléophile et attaque le carbonyle de la liaison peptidique.

Les protéases à cystéine possèdent une cystéine dans leur groupement actif. Le soufre de la cystéine joue le rôle de nucléophile.

Les protéases à acide possèdent un acide aspartique dans leur site actif et agissent à pH acide. Les métalloprotéases possèdent un cation métallique, généralement un atome de zinc, dans leur site actif.

3.2.2. Protéolyse et localisation cellulaire

Beaucoup de protéases sont localisées dans des compartiments cellulaires spécifiques à leur fonction. Certaines protéases se situent dans le cytosol, sur la membrane plasmique et d'autres dans certaines organelles telles que le lysosome, les mitochondries, le RE, l'appareil de Golgi ou encore les vésicules sécrétrices. Certaines protéases peuvent être libérées lors de la lyse cellulaire et se retrouver ainsi dans le milieu extracellulaire. D'autres protéases sont sécrétées par la cellule.

Les peptidases peuvent également être classées selon la nature chimique de leur site catalytique. A ce jour, quatre types de peptidases ont été identifiées :

- ✓ protéases à sérine,
- ✓ protéases à cystéine,
- ✓ protéases à acide,
- ✓ métalloprotéases.

3.2.3. Les protéases extracellulaires

❖ Les métalloprotéases matricielles (MMP)

La famille des MMPs comprend plus de 28 membres qui, pris ensemble, sont capables d'hydrolyser tous les composants de la matrice extracellulaire (MEC). Selon les membres, les spécificités varient, c'est pourquoi chaque MMP est spécialisée pour le clivage de composants de la MEC (McCawley and Matrisian, 2000).

Comme le montre la Figure 15, structurellement, les MMPs ont en commun un site de liaison au zinc, un pro-peptide impliqué dans le processus d'inactivation de l'enzyme et la plupart du temps, un domaine hemopexine. D'autres domaines existent chez certaines des MMPs tels qu'un domaine transmembranaire hydrophobe ou encore un domaine fibronectine.

Un domaine commun à cette famille de MMPs est le domaine pro-peptide composé d'environ 80 acides aminés avec une séquence unique PRCG(V/N)PD impliquée dans le mécanisme d'inactivation du « cystein switch » (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990)

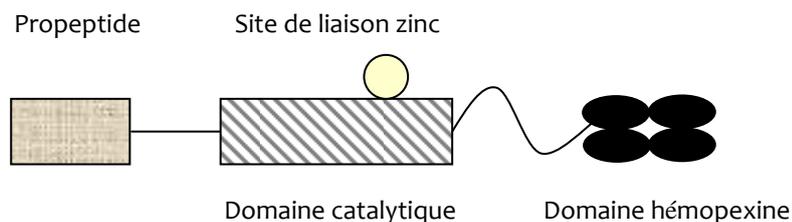
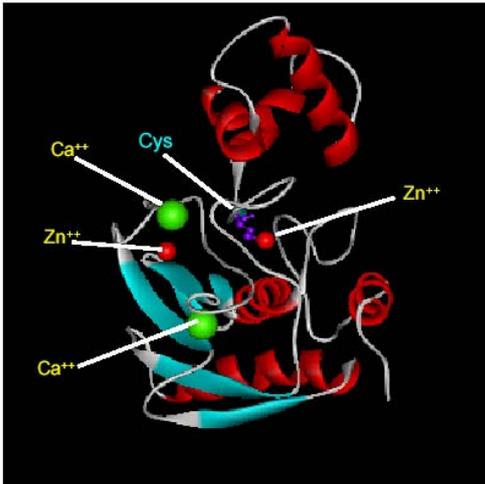


Figure 15 : Schéma de la structure des MMPs

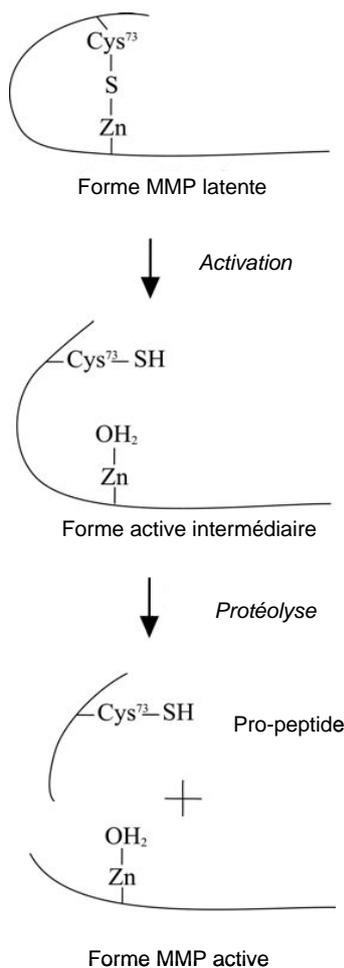
Les MMPs sont des métallopeptidases ayant pour site catalytique un atome de zinc (parfois un Ca^{2+}) qui permet la protéolyse. Les MMPs sont sécrétées sous une forme inactive appelée zymogène. L'activité protéolytique du zymogène est limitée par le propeptide qui contient le résidu cystéine en position 73 impliqué dans l'inactivation de la MMP (le groupement thiol de cette cystéine coordonnant l'atome de zinc) (Figure 16 & Figure 17).

Le propeptide peut être détaché plus ou moins spécifiquement du reste de l'enzyme par un



agent organomercurial (l'acide para-aminophenylmercurique (APMA)) ou par protéolyse enzymatique (trypsine). Ainsi, une molécule d'eau peut être acceptée permettant un clivage autocatalytique du propeptide. *In vivo*, l'activation exige l'implication d'autres peptidases qui attaquent spécifiquement le propeptide et libèrent l'atome de zinc (Nagase and Woessner, 1999 ; Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990).

Figure 16: Structure cristallographique de la pro-MMP-3 humaine. Le site catalytique Zn^{2+} est bloqué par la cystéine du propeptide, qui maintient donc l'enzyme sous sa préforme inactive ou zymogène (Mols, 2004).



La plupart des MMPs sont des enzymes extracellulaires mais les MMP-11, MMP-23 et toutes les métalloprotéases membranaires (MT-MMP) peuvent être actives au niveau intracellulaire par l'intermédiaire d'activateurs tels que les peptidases à furine et à sérine ou encore d'autres peptidases (Smith *et al.*, 2002; Strongin *et al.*, 1995). La famille des métalloprotéases en fonction de certaines de leurs caractéristiques est répertoriée dans le Tableau 10.

Figure 17 : Schéma de l'activation des pro-MMPs (d'après Snoek-van Beurden and Von den Hoff, 2005)

Tableau 10 : Famille des MMPs humaines (d'après Snoek-van Beurden and Von den Hoff, 2005)

Sous-groupe	MMP	Enzyme Nomenclature	PM (kDa) latent/actif	Substrats connus MEC
Collagénases	MMP-1	Collagénase-1	55-45	Collagène I, II, III, VII, VIII, X, gélatine
	MMP-8	Collagénase-2	75-58	Collagène I, II, III, VII, VIII, X, agrécane, gélatine
	MMP-13	Collagénase-3	60-48	Collagène I, II, III, IV, IX, X, XIV, gélatine
Gélatinases	MMP-2	Gélatinase A	72-66	Gélatine, Col I, II, III, IV, VII, X
	MMP-9	Gélatinase B	92-86	Gélatine, Col IV, V
Stromélysines	MMP-3	Stromélysine-1	57-45	Collagène II, IV, IX, X, XI, gélatine
	MMP-10	Stromélysine-2	57-44	Collagène IV, laminine, fibronectine, élastine
	MMP-11	Stromélysine-3	51-44	Collagène IV, fibronectine, laminine, agrécane
Matrilysines	MMP-7	Matrilysine-1	28-19	Fibronectine, laminine, Col IV, gélatine
	MMP-26	Matrilysine-2	28-19	Fibrinogène, fibronectine, gélatine
MT-MMP	MMP-14	MT1-MMP	66-56	Gélatine, fibronectine, laminine
	MMP-15	MT2-MMP	72-60	Gélatine, fibronectine, laminine
	MMP-16	MT3-MMP	64-52	Gélatine, fibronectine, laminine
	MMP-17	MT4-MMP	57-53	Fibrinogène, fibrine
	MMP-24	MT5-MMP	?-62	Gélatine, fibrinectine, laminine
	MMP-25	MT6-MMP		Gélatine
Autres	MMP-12	Métalloélastase	54-45/22	Elastine, fibrinectine, Col IV
	MMP-19	RASI-1	54-45	Aggrécane, élastine, fibrilline, Col IV, gélatine
	MMP-20	Enamélysine	54-22	Aggrécane
	MMP-21	XMMP		Aggrécane
	MMP-23	CA-MMP	44	Gélatine, caséine, fibronectine
	MMP-27	CMMP		Inconnu
	MMP-28	Epilysine		Inconnu

❖ Les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases

Des inhibiteurs spécifiques des MMPs appelés TIMP (inhibiteurs tissulaires des métallopeptidases) sont souvent associés à l'expression des MMPs. Jusqu'à présent, 4 membres de la famille des TIMPs ont été caractérisés : TIMP-1, 2, 3 et 4 (Tableau 11).

Tableau 11 : Inhibiteurs endogènes des MMPs : les TIMPs (Aparicio and Lehy, 1999)

TIMP	PM (kDa)	Cible
TIMP-1	28	Collagénase-1, gélatinase B > gélatinase A, MT1-MMP
TIMP-2	21	Gélatinase A, stromélysine-1, gélatinase B, MT1-MMP
TIMP-3	24-25	Gélatinase A, gélatinase B > MT1-MMP
TIMP-4	22	Gélatinase A

Les TIMPs sont des protéines inhibitrices de la plupart des MMPs mais également de la famille de protéines ADAMs et ADAMTS. Les ADAMTs représentent un sous-groupe de la famille des ADAMs qui se caractérise par la présence, en plus des domaines communs à

toutes les ADAMs, d'un domaine de répétition du motif Thrombospondine (Rannou *et al.*, 2005).

Les ADAMs sont des glycoprotéines transmembranaires pouvant être sécrétées et possédant un domaine propres aux désintégrines et aux métalloprotéases, impliquées dans de nombreux phénomènes cellulaires comme la signalisation ou la migration. Au sein des TIMPs, les propriétés inhibitrices sont différentes (Brew *et al.*, 2000). En effet, les TIMP-2 et les TIMP-3 sont des inhibiteurs des MMPs membranaires (MT-MMPs) tandis que le TIMP-1 ne l'est pas.

Les TIMPs n'ont pas seulement des propriétés inhibitrices contre les MMPs. En effet, TIMP-2 est par exemple nécessaire pour l'activation de la pro-MMP-2. De plus, elle permet la prévention de la dégradation autocatalytique de la MT1-MMP ou MMP-14. En effet, en se liant à la MT1-MMP, TIMP-2 permet de stabiliser l'enzyme et de cette façon, de la rendre disponible pour la protéolyse péricellulaire (Hernandez-Barrantes *et al.*, 2000). D'autres propriétés biologiques ont été attribuées aux TIMPs. TIMP-1 a été décrit comme un facteur potentiel de croissance autocrine pour les fibroblastes sclérodermiques (Kikuchi *et al.*, 1997) mais également comme un stimulateur de la prolifération des cellules cancéreuses humaines en inhibant les métalloprotéases (Porter *et al.*, 2004).

❖ Le système plasminogène/plasmine

Il existe un lien entre l'activation du plasminogène et la cascade d'activation des MMPs Cuzner and Opdenakker, 1999.

Le système plasminogène/plasmine est composé des peptidases à sérine suivantes :

- ✓ La plasmine et son précurseur inactif : le plasminogène,
- ✓ L'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA),
- ✓ L'activateur urinaire du plasminogène (u-PA).

Le plasminogène est ubiquitaire, il est synthétisé dans l'hépatocyte et de grandes quantités sont sécrétées dans le plasma sanguin. Les activateurs du plasminogène transforment le plasminogène en plasmine par clivage de la liaison Arg⁵⁶¹+Val⁵⁶². Un clivage autocatalytique se fait également au niveau de la liaison Lys⁷⁷+Lys⁷⁸ pour former 2 chaînes réunies par 2 ponts disulfures. Ainsi, le plasminogène est présent à des concentrations élevées dans le sang et il est transformé en plasmine par les t-PA et u-PA présents en quantités moins importantes. Par ailleurs, la plasmine est aussi un activateur de l'activité des t-PA et u-PA, ce qui engendre une boucle d'amplification du système. L'u-PA possède dans sa structure un

domaine qui permet sa liaison à un récepteur exprimé à la membrane cytoplasmique des cellules (uPAR). Ainsi, le suivi de l'activité des 2 activateurs du plasminogène constitue un traceur de la formation de plasmine.

Il existe 2 stratégies différentes pour contrôler l'activation du plasminogène :

- ✓ Premièrement, la présence d'inhibiteurs spécifiques endogènes des activateurs du plasminogène appelés PAI ainsi que l' α 2-antiplasmine (α 2-AP) (Figure 18)
- ✓ Deuxièmement, l'action sur le plasminogène du t-PA est potentialisée d'un facteur 100 en présence de fibrine.

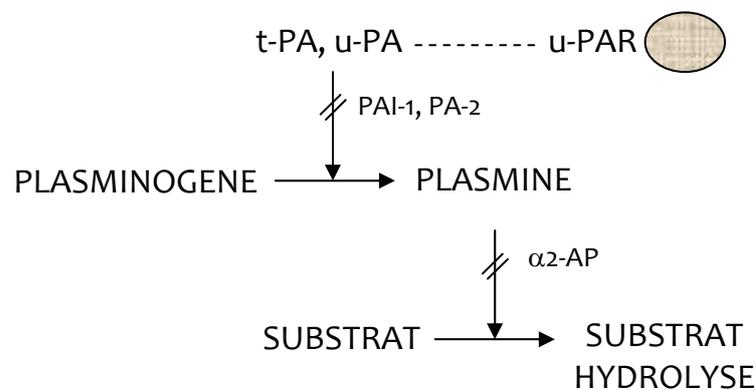


Figure 18 : Schéma du système plasminogène/plasmine

Le t-PA est une protéase à sérine d'environ 70 kDa. Cette enzyme est composée de 4 domaines : un domaine responsable de l'affinité de la fibrine à la fibronectine, une extrémité N-terminale qui comprend deux domaines d'interaction du t-PA à la fibrine et un domaine catalytique commun aux protéases à sérine. Le t-PA est une molécule qui contient 4 sites potentiels de glycosylation dont un qui n'est jamais glycosylé (Pennica *et al.*, 1983).

L'u-PA est une protéase de 54 kDa, une forme active de 31 kDa a également été détectée et appelée : « low molecular weight u-PA » ou LMW u-PA (Lijnen *et al.*, 1994). L'u-PA possède un site de N-glycosylation sur l'Asn-302 (Günzler *et al.*, 1982). L'activation de la proenzyme se fait par la plasmine mais également par des protéases à sérine telles que la trypsine, la kallikréine plasmatique, la cathepsine G, la thermolysine et la cathepsine B. Contrairement au t-PA, l'activation de l'u-PA est indépendante de la fibrine.(Buko *et al.*, 1991).

❖ Interactions entre les protéases extracellulaires

Des interactions existent entre le système plasminogène/plasmine et les métalloprotéases. En effet, le t-PA et l'u-PA activent le plasminogène en plasmine, laquelle à son tour, active les procollagénases en collagénases. Les collagénases activent les prostromélysines et finalement les stromélysines activent la pro-MMP-9 (progélatinase B) en MMP-9. D'un autre côté, les MT-MMPs activent la pro-MMP-2 (progélatinase A) en MMP-2 qui est à son tour capable d'activer la pro-MMP-9 (Figure 19).

Chaque protéase a son propre poids moléculaire et ses propres cibles cellulaires. De plus, il a été montré que la plasmine et l'u-PA sont capables d'activer les pro-MMP-2 et pro-MMP-9.

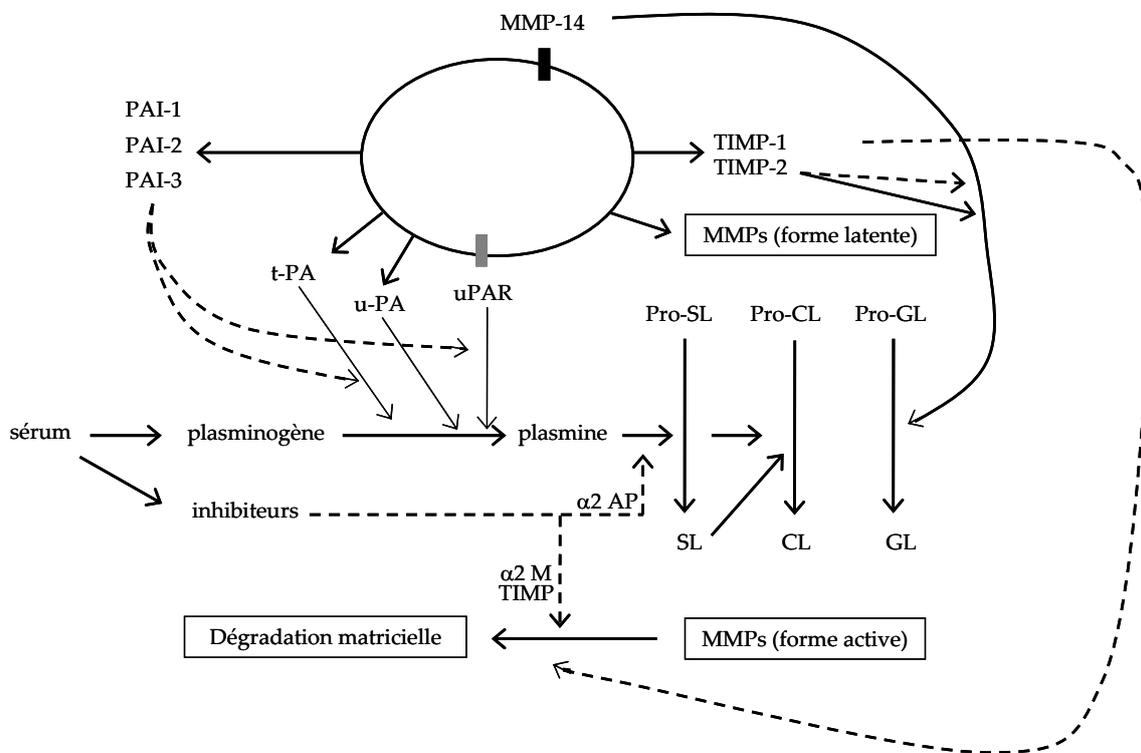


Figure 19: Représentation schématique des possibilités de cascades pour l'activation des protéases dans le milieu extracellulaire. Les flèches pleines représentent les processus d'activation et les flèches en pointillé représentent les processus d'inactivation. SL : stromélysines, CL : collagénases, GL : gélatinases, α2 AP : alpha 2 antitrypsine, α2 M : alpha 2 macroglobuline (d'après Mols, 2004).

4. Hétérogénéité de modifications co- ou post-traductionnelles des protéines chez les cellules animales

Les modifications post-traductionnelles (PTM) incluent l'agrégation des protéines, l'oxydation des méthionines, la désamination de l'asparagine et dans une moindre mesure celle de la glutamine, l'ajout de lipides, la protéolyse, la γ -carboxylation, la glycosylation et la sulfatation des protéines (Walsh and Jefferis, 2006). De telles modifications ne représentent pas uniquement un challenge au niveau des procédés de production mais peuvent avant tout avoir des conséquences indésirables pour le patient. En effet, des PTM incorrectes peuvent réduire l'efficacité de la protéine mais également entraîner une réaction du système immunitaire. Les PTM telles que l'agrégation des protéines, la désamination de l'asparagine et l'isomérisation de l'acide aspartique, l'oxydation des méthionines et la sulfatation sont décrites succinctement dans ce chapitre. De telles modifications ne sont pas souhaitées pour les protéines à visée thérapeutique. Cependant, dans le domaine des bioprocédés, très peu d'études traitent de ces PTM. La protéolyse a été abordée dans le paragraphe 3.2 et la glycosylation sera traitée en détails dans le paragraphe 4.1 de la synthèse bibliographique.

De nombreuses protéines recombinantes ne sont pas produites dans leur état tridimensionnel natif, et peuvent s'agréger dans un état biologiquement inactif, encore appelé corps d'inclusion dans le cas des systèmes bactériens. L'une des premières étapes dans le phénomène d'**agrégation** des protéines est la formation de liaisons faibles, autrement dit d'interactions non covalentes, entre les protéines. L'exposition de ces protéines partiellement dénaturées à des surfaces hydrophobes peut conduire à des agrégations non covalentes, qui conduisent alors à des agrégations par liaisons covalentes, généralement entre les différents groupements thiols des protéines (Jenkins *et al.*, 2009). Ces liaisons une fois formées sont très difficiles à rompre. Pour empêcher ou réduire la formation d'agrégats protéiques, il est possible de changer les conditions de culture cellulaire. En effet, l'ajout d'une faible quantité de CuSO_4 (5 - 100 $\mu\text{mol/L}$) a permis d'obtenir une quantité de groupements thiols libres 3 à 10 fois plus faible pour un anticorps monoclonal (Chaderjian *et al.*, 2005). Le CuSO_4 , en tant qu'agent oxydant, permet de faciliter la formation des ponts disulfures. L'agrégation de l'IFN- β (Spearman *et al.*, 2007) ainsi que celle d'une autre protéine recombinante, à savoir COMP-Ang1 (Ju *et al.*, 2009) ont été réduites par l'utilisation d'un milieu de culture hyperosmotique (ajout de NaCl dans le milieu).

La formation de petits agrégats de protéines recombinantes à usage thérapeutique peut provoquer des réactions du système immunitaire et la formation d'agrégats de plus grande

taille (particules) peut poser des problèmes quant à l'injection chez les patients. Ainsi, l'agrégation des protéines peut non seulement conduire à une modification de l'activité biologique des protéines (Cromwell *et al.*, 2006) mais également entraîner des réactions immunitaires (Ryff and Schellekens, 2002).

La **désamination** non-enzymatique d'un résidu asparagine (Asn) ou d'un résidu glutamine (Gln) est un processus bien établi *in-vitro* comme *in-vivo*. Cette modification post-traductionnelle a été retrouvée chez plus de 200 protéines et peptides (Robinson and Rudd, 1974). Harris *et al.* (2001) ont montré que l'efficacité d'un anticorps commercial était réduite de 70% lorsqu'une désamination est présente (Harris *et al.*, 2001). Au cours des procédés de culture cellulaire, la présence d'une désamination des résidus asparagine ou glutamine sur les protéines recombinantes produites n'est pas rapportée dans la littérature, contrairement à l'étude de la glycosylation par exemple.

La méthionine est un acide aminé soufré non polaire qui joue un rôle particulier dans la biosynthèse des protéines puisque toutes les chaînes polypeptidiques débutent par l'incorporation d'une méthionine en position N-terminale. D'autres fonctions sont attribuées à la méthionine telles que (i) un rôle anti-oxydant (Levine *et al.*, 1996), (ii) un rôle de défense et de régulation cellulaire grâce à des oxydations et réductions réversibles (Brot and Weissbach, 1991; Gonias *et al.*, 1988; Vogt, 1995). Le soufre de la méthionine est sensible à l'**oxydation**, ce qui donne lieu à deux dérivés: la méthionine sulfone et la méthionine sulfoxyde [S, R-Met(O)].

La plupart des protéines possèdent des méthionines potentiellement oxydables et pour la majorité des protéines étudiées, un effet de l'oxydation des méthionines sur leur activité biologique a été rapporté ; c'est notamment le cas pour l'IFN- γ (Keck, 1996).

La **sulfatation** des protéines est une PTM qui affecte principalement les tyrosines. On parle alors d'une O-sulfatation de la protéine. Cette modification de la protéine est plus rarement retrouvée au niveau des asparagines (N-sulfatation) et des cystéines (S-sulfatation). La fonction de cette modification post-traductionnelle n'est à l'heure actuelle pas encore clairement identifiée ; il est possible que la sulfatation ait un rôle modulateur dans les interactions protéine-protéine (Kehoe and Bertozzi, 2000) ou encore un rôle dans l'adressage des protéines. Dans le contexte des produits biopharmaceutiques, pour le facteur IX par exemple, plus de 90% des molécules naturelles sont sulfatées sur la Tyr 155 alors que moins

de 15% le sont dans le cas des protéines recombinantes produites à partir de cellules CHO ; ceci n'ayant pas d'impact sur l'efficacité des protéines produites (Walsh and Jefferis, 2006).

4.1. La glycosylation des protéines dans les cellules animales

La glycosylation est la modification post-traductionnelle majeure. Plus de 50% des protéines humaines sont glycosylées (Wong, 2005). La glycosylation est le terme usité pour faire référence aux différentes réactions d'addition covalente de structures glucidiques (oligosaccharides) sur une protéine (glycoprotéine) ou sur un lipide (glycolipide). Il s'agit d'un processus intracellulaire éminemment complexe. La glycosylation fait intervenir un complexe multi-enzymatique et permet la liaison covalente d'une chaîne oligosaccharidique sur une protéine en voie de synthèse. Le processus de glycosylation implique 13 monosaccharides différents qui peuvent être liés à 8 types de résidus d'acides aminés (Shental-Bechor and Levy, 2008). Les monosaccharides principalement retrouvés chez les glycoprotéines sont le glucose, le galactose, le mannose, le fucose, la GalNAc, la GlcNAc et le NANA. La plupart des protéines glycosylées sont des protéines sécrétées ou liées à la membrane plasmique, tandis que les protéines intracellulaires sont moins fréquemment modifiées par une liaison carbohydate.

Selon la nature de la liaison glycosidique, 3 types de glycosylation peuvent être distingués :

- ✓ O-glycosylation
- ✓ N-glycosylation
- ✓ C-mannosylation

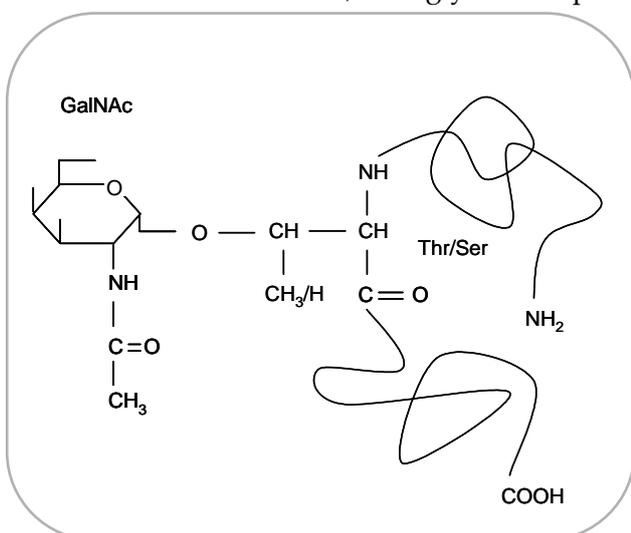
La C-mannosylation est un type de glycosylation des protéines au même titre que la O- ou la N-glycosylation. Elle consiste en une liaison carbone-carbone entre un mannose et un résidu tryptophane. La C-mannosylation est catalysée par une enzyme du RE utilisant le Dolichol-phospho-mannose comme donneur de mannose et le motif de reconnaissance Trp-x-x-Trp comme accepteur protéique. La C-mannosylation est spécifique du premier tryptophane du motif. De récentes études ont montré que seulement deux tiers des sites connus glycosylent si le motif Trp-x-x-Trp est présent. En effet, en position +3, une Cys peut également être présente au lieu d'un Trp. Par ailleurs, la présence en position +1 de résidus de faibles tailles et/ou polaires (Ser, Ala, Gly et Thr) est préférable. A partir de ces données, un logiciel a été

crée afin de prédire si une protéine est susceptible de contenir un site de C-mannosylation (Julenius, 2007).

Il convient de signaler qu'une même protéine peut être à la fois *O*- et *N*-glycosylée. Citons pour exemple la glycophorine qui contient 15 glycannes liés *O*-glycosidiquement et 1 glycane lié *N*-glycosidiquement (Verbert and Montreuil, 1997).

4.1.1. La *O*-glycosylation

Le processus de *O*-glycosylation se déroule dans l'appareil de Golgi en débutant dans le compartiment *cis*-golgien (Brooks, 2006). Il consiste en l'ajout d'un monosaccharide, très fréquemment le GalNAc, sur un oxygène du groupement hydroxyle généralement d'une sérine ou d'une thréonine d'une chaîne polypeptidique en voie de synthèse (Figure 20). Une fois le premier monosaccharide fixé, d'autres monosaccharides peuvent être ajoutés. A ce jour, aucune séquence consensus de fixation des *O*-glycannes sur les protéines n'a pu être caractérisée. Néanmoins, la glycosylation des groupements hydroxyles de l'acide aminé est influencée par la conformation locale de la chaîne polypeptidique. Autour du site de glycosylation, les résidus proline sont en général observés en position -3, -1, +3. L'alanine est abondante entre -4 et +2, et la glycine fréquemment retrouvée en position -6 (O'Connell *et al.*, 1991).



Ainsi, la structure oligosaccharidique est liée de façon covalente sur un groupement hydroxyle des acides aminés qui suivent : sérine, thréonine, tyrosine, hydroxylysine ou hydroxyproline et enfin l'arabinose (chez les plantes). Toutefois, dans la majorité des cas, la liaison se fait sur les résidus sérine et thréonine (Peter-Katalinić, 2005).

Figure 20 : Exemple de liaison *O*-glycosidique GalNAc α 1Ser/Thr

Les liaisons *O*-glycosidiques les plus courantes sont les suivantes : GalNAc (α 1-0) Ser/Thr, Xyl (β 1-0) Ser, GlcNAc (β 1-0) Ser, L-Ara (β 1-0) HPr, Gal (β 1-0) HLy (Verbert and Montreuil, 1997). D'autres monosaccharides, tels que le mannose et le fucose peuvent également être liés

au groupement hydroxyle (Brooks, 2006). Le nombre d'oligosaccharides peut varier entre 1 et 20 résidus avec au moins 7 structures invariantes (encore appelées « noyau ») différentes dont les 5 motifs les plus courants sont représentés sur la Figure 21 (Lucas *et al.*, 1998).

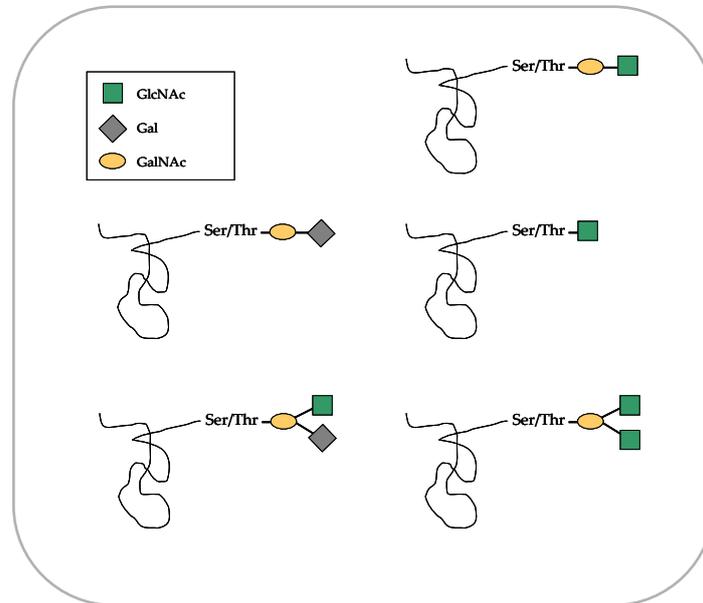


Figure 21 :Principales O-glycosylations (d'après Ozturk and Hu, 2005).

Les structures O-glycosidiques sont souvent retrouvées chez les protéines membranaires et chez les protéines qui couvrent et protègent les muqueuses des voies respiratoires et des glandes gastriques. Il semblerait que l'addition d'oligosaccharides sur ces protéines permette leur agrégation sous forme de réseaux muqueux conduisant à une protection de la surface des muqueuses contre les agents environnementaux néfastes. Par ailleurs, les structures O-glycosidiques jouent également un rôle important dans la localisation et le trafic des protéines, la solubilité, l'antigénicité et les interactions cellulaires. La présence de O-glycosylation sur la protéine permet de la rendre davantage résistante aux protéases (Jentoft, 1990).

4.1.2. La N-glycosylation

La liaison covalente du glycanne à la protéine s'établit entre le carbone anomérique d'un résidu N-acétylglucosamine et l'azote de la fonction amide d'un résidu asparagine, appartenant à une séquence consensus de type Asn-X-Ser/Thr (Figure 22) ; X symbolisant tous les acides aminés à l'exception de la proline. Les N-glycannes sont caractérisés par un

noyau pentasaccharidique, de type $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Ces structures invariantes constituent leur partie la plus interne associée à la chaîne peptidique et appelée « noyau » ou « *inner-core* » pour les anglophones (Figure 23). A cette structure se conjugue différentes séquences oligosaccharidiques nommées *antennes*, du fait de leur morphologie, de leur flexibilité et de leur rôle de signaux de reconnaissance. Ces antennes possèdent à leurs extrémités les sucres dits périphériques qui portent la spécificité biologique des glycanes.

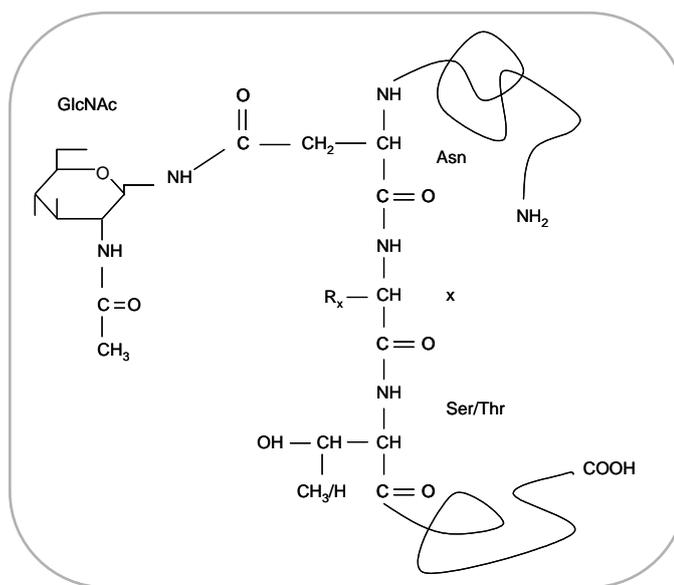


Figure 22 : Liaison *N*-glycannique de type $\text{GlcNAc}\beta 1\text{Asn}$.

La Figure 23 présente les trois types de structures *N*-glycanniques classiquement décrits chez les mammifères : complexe, hybride et oligomannosidique (Hossler *et al.*, 2007).

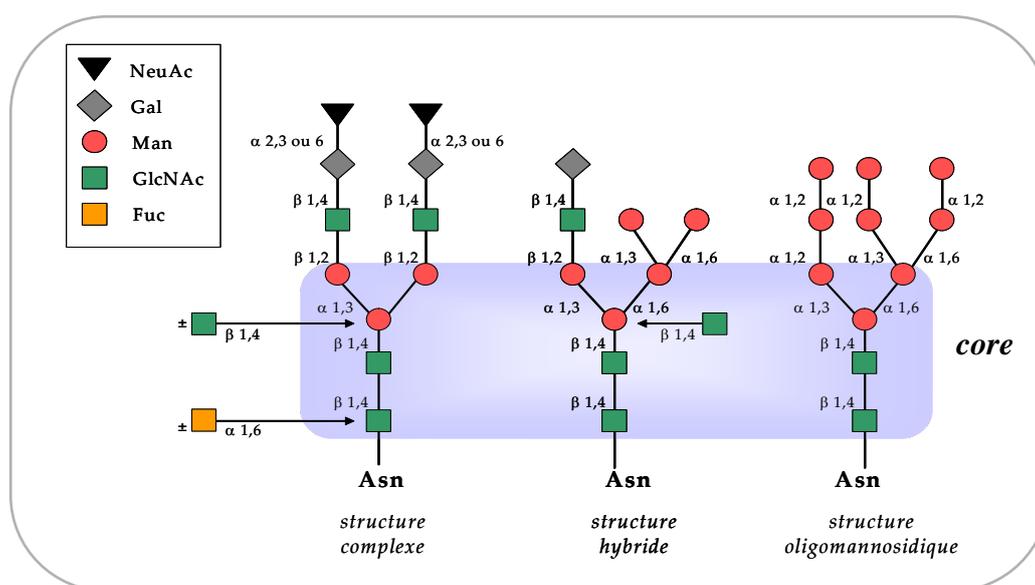


Figure 23 : Les 3 principaux types de *N*-glycannes (d'après Kornfeld and Kornfeld, 1985)

4.1.3. La biosynthèse des *N*-glycosylprotéines dans les cellules de mammifère

L'assemblage des glycoprotéines est effectué dans un premier temps dans le RE puis dans un second temps dans l'appareil de Golgi (Hirschberg and Snider, 1987). Les glycoprotéines sont en règle générale des protéines sécrétées, membranaires ou résidentes de ces deux compartiments, ce qui implique qu'elles possèdent une séquence signal gouvernant leur translocation vers le RE.

La synthèse d'une *N*-glycosylprotéine requiert l'élaboration préalable d'un glycanne constitué de quatorze monosaccharides sur un lipide de type polyisoprénique intégré dans la membrane du RE, le dol-P. L'assemblage de l'oligosaccharide s'effectue de manière séquentielle par l'intermédiaire d'un cycle métabolique bien particulier appelé le cycle des dolichols (Kornfeld and Kornfeld, 1985).

4.1.3.1. Les précurseurs nucléotidiques

Pour être transférés sur une protéine par l'intermédiaire d'une glycosyltransférase, les monosaccharides doivent au préalable être activés sous la forme de nucléotides-sucres. Seules des enzymes du RE ont pour substrat un monosaccharide lié à un lipide : le mannosyl phosphodolichol (Man-P-Dol), synthétisé à partir du GDP-Man.

Le Tableau 12 répertorie les formes activées des principaux monosaccharides utilisés dans le processus de glycosylation. A l'exception des acides *N*-acétylneuraminiques (Neu5Ac) et *N*-glycolylneuraminiques (Neu5Gc) liés à un nucléotide monophosphate, tous les autres monosaccharides sont liés à un nucléotide diphosphate (Kean, 1991).

Tableau 12 : Formes activées des principaux monosaccharides retrouvés chez les glycoprotéines

Monosaccharide	Forme activée	Abréviation
Glc	Uridine diphospho-glucose	UDP-Glc
Gal	Uridine diphospho-galactose	UDP-Gal
GlcNAc	Uridine diphospho- <i>N</i> -acétylglucosamine	UDP-GlcNAc
GalNAc	Uridine diphospho- <i>N</i> -acétylgalactosamine	UDP-GalNAc
Man	Guanosine diphosphomannose	GDP-Man
Fuc	Guanosine diphosphofucose	GDP-Fuc
Neu5Ac	Cytidine monophosphate-acide <i>N</i> -acétylneuraminique	CMP-Neu5Ac
Neu5Gc	Cytidine monophosphate-acide <i>N</i> -glycolylneuraminique	CMP-Neu5Gc

4.1.3.2. Les glycosyltransférases

Le processus de *N*-glycosylation se déroule dans deux compartiments cellulaires différents. Dans un premier temps, un oligosaccharide assemblé sur un précurseur lipidique est transféré en bloc sur une protéine en voie de synthèse dans le RE. Dans un second temps, le glycanne ainsi formé est transféré vers l'appareil de Golgi pour subir des modifications de maturation. Les étapes menant à la formation de la glycosylation des protéines sont décrites dans les paragraphes ci-après. Cependant, l'objectif est de permettre une compréhension globale du processus de glycosylation, c'est pourquoi, il est suggéré de se référer à la revue de Kornfeld and Kornfeld (1985) pour de plus amples détails.

4.1.3.3. La glycosylation dans le réticulum endoplasmique rugueux

La biosynthèse d'un précurseur tétradéca-saccharidique ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) est strictement réticulaire, mais présente la particularité de débiter du côté de la face cytosolique et de s'achever dans la face luminale (Figure 24).

❖ Face cytosolique

Les premières étapes correspondent au transfert successif de deux résidus GlcNAc à partir de l'UDP-GlcNAc sur un accepteur lipidique constitué entre 15 et 20 unités isopréniques, le dolichol-phosphate (Dol-P). La biosynthèse se poursuit par l'addition de cinq résidus mannoses apportés par le nucléotide sucre GDP-Man, sur l'accepteur lipidique, pour donner le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. A ce stade de la biosynthèse, le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ va être basculé dans la lumière du RE par l'intermédiaire d'une flippase nommée RFT1, mise en évidence récemment (Helenius and Aeby, 2002a ; Helenius *et al.*, 2002b).

❖ Face luminale

L'élongation se poursuit dans la face luminale du RE par l'ajout de 4 résidus mannose apportés par le Dol-P-Man, lui-même synthétisé à partir du GDP-Man. Un mécanisme similaire permet d'ajouter trois résidus glucose à partir du Dol-P-Glc, terminant ainsi la synthèse du précurseur tétradéca-saccharidique sur l'accepteur lipidique: $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$.

Ce glycanne constitué de quatorze monosaccharides peut alors être transféré sur une protéine en voie de synthèse ; cette réaction est catalysée par une enzyme spécifique, l'oligosaccharyltransférase (OST).

❖ **Transfert en bloc du précurseur oligosaccharidique sur une protéine en voie de synthèse**

Le transfert du précurseur tétradécasaccharidique ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) se fait sur une protéine en voie de synthèse. On parle donc de modification co-translationnelle. Cette étape s'effectue par un complexe enzymatique membranaire nommé l'oligosaccharyltransférase (OST) (Yan and Lennarz, 1999). Cette enzyme permet de catalyser la formation d'une liaison β 1-N glycosidique entre le résidu GlcNAc en position terminale réductrice du $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ et le résidu Asn.

L'oligosaccharyltransférase est un complexe multiprotéique ancré dans la membrane du RE. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'OST est composée de 8 sous-unités protéiques, Ost1p, Ost2p, Wbp1, Swp1, Stt3p, Ost3p/Ost6p, Ost4p et Ost5p, parmi lesquelles les 5 premières sont indispensables (Karaoglu *et al.*, 1995). Excepté pour les Ost4p et Ost5p, toutes les sous-unités présentes chez la levure ont leur homologue chez les cellules de mammifère (ribophorin I, DAD1, OST48, ribophorin II et Stt3-A/Stt3-B) auxquelles sont associées en périphérie les sous-unités N33 et IAP (Dempski and Imperiali, 2002 ; Kelleher *et al.*, 2003 ; Knauer and Lehle, 1999). En fonction de l'isoforme de la sous-unité Stt3 (A ou B), la spécificité vis-à-vis du donneur lipidique diffère. Lorsque l'OST contient la sous-unité Stt3-A, la structure glycanne doit être complète alors que si l'OST contient la sous-unité Stt3-B, des structures glycanne tronquées peuvent être acceptées. Ainsi, en fonction des types cellulaires, l'expression de l'une ou l'autre des isoformes de l'OST est différente, ce qui conduit à des différences de glycosylation.

Des études concernant la spécificité de l'OST vis-à-vis du précurseur lipidique ont montré que la structure $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ constitue le meilleur substrat. Des structures glycanne tronquées de type $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ peuvent également être des substrats de l'OST ; toutefois, l'efficacité de transfert est amoindrie (Helenius and Aebi, 2004). De plus, la présence des 3 résidus glucose semble être primordiale pour le transfert puisque seuls 10% des précurseurs oligosaccharidiques non glucosylés sont transférés sur les protéines (Spiro *et al.*, 1979). Concernant la spécificité de reconnaissance vis-à-vis du peptide accepteur, la présence du séquen Asn-X-Ser/Thr , où X est un acide aminé quelconque à l'exception de la proline, est une condition nécessaire (Bause, 1983 ; Pless and Lennarz, 1977). Ce critère est nécessaire

mais pas suffisant ; ainsi 50-60% des séquons sont glycosylés (Petrescu *et al.*, 2004). En outre, la présence d'un résidu Thr en position +2 de la séquence consensus représente un bien meilleur substrat de l'OST que lorsque ce résidu est une sérine (Gavel and von Heijne, 1990). D'autres critères structuraux tels que la conformation spatiale de la protéine semblent également intervenir.

Outre les critères décrits précédemment (OST, séquence consensus sur le peptide accepteur, conformation spatiale), des critères relatifs à l'équipement enzymatique propre des cellules sont également déterminants dans la régulation du cycle des dolichols.

Ainsi, la disponibilité en dol-P est un critère important pour l'amorçage de la synthèse du précurseur glycanique. Cette disponibilité dépend non seulement de son taux de synthèse mais également de celui de sa régénération par action d'une pyrophosphatase sur le dol-P-P lors de la dernière étape du cycle des dolichols. La disponibilité du GlcNAc-1-P et de l'enzyme dol-P N-acétylglucosamine 1-phosphate transférase (G1PT) est également un critère de régulation.

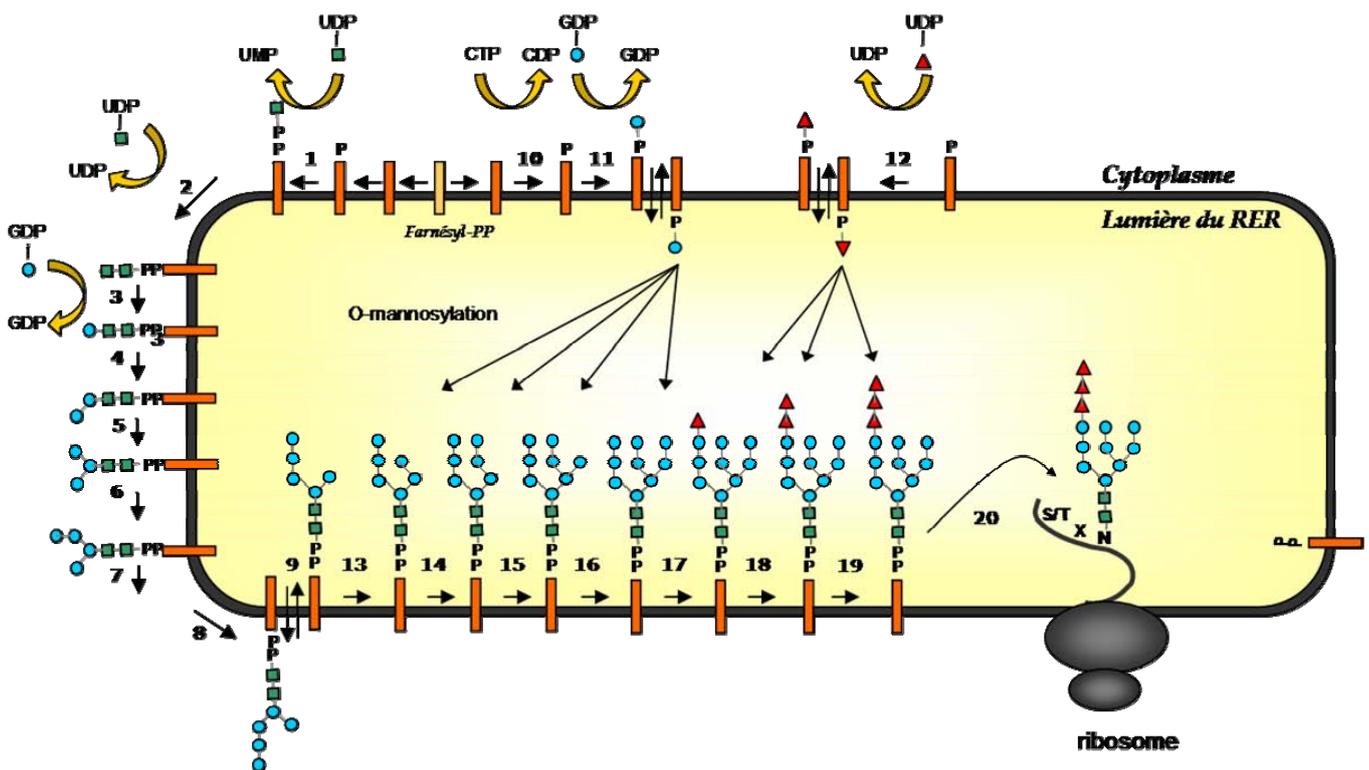


Figure 24: Cycle des dolichols dans le RE (Kornfeld and Kornfeld, 1985): (1) GlcNAc-P-Transférase; (2) GlcNAc-Transférase; (3-8) mannosyltransférases; (9) flippase, (10) dolichol kinase; (11) dol-P-Man synthase; (13-16) mannosyltransférases; (17-19) glucosylatransférase; (20) oligosaccharyltransférase; GlcNAc (■); mannose (●); glucose (▲), dolichol (|) (adaptée de Helenius and Aebi, 2004).

Enfin, il est maintenant bien établi que le processus de *N*-glycosylation s'accompagne de la libération d'oligosaccharides solubles de type oligomannosidique dans la lumière du RE (Cacan and Verbert, 1999). La fonction de cette double activité n'est pas déterminée à l'heure actuelle, mais on peut supposer que la formation d'oligosaccharides libres est susceptible de jouer un rôle dans la régulation du cycle des dolichols, en permettant un ajustement du transfert des précurseurs oligosaccharidiques sur les protéines en fonction des besoins cellulaires, en particulier si les précurseurs oligosaccharidiques sont présents en excès.

4.1.3.4. Maturation des glycoprotéines dans le RE et l'appareil de Golgi

❖ La maturation réticulaire

Une fois transféré sur le squelette d'une protéine en voie d'élongation, le *N*-glycane subit très rapidement (en 1 à 2 minutes) la perte d'un résidu glucose en position terminale grâce à l'action de l' α -glucosidase I (Figure 24 ; Daniel *et al.*, 1994). La glucosidase II peut alors retirer les deux derniers résidus glucose liés en α 1,3 pour donner le $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. La dernière étape de maturation réticulaire consiste en l'élimination du résidu mannose lié en α 1,2 par l'intermédiaire de la mannosidase I ; générant ainsi l'isomère B du $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$. A ce stade, les glycoprotéines déglucosylées et partiellement démannosylées vont être transférées, notamment via des lectines spécifiques des mannoses (ERGIC-53), vers l'appareil de Golgi où vont s'effectuer d'autres étapes de maturation.

Il paraît important de souligner que dans le RE, les formes $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}_2$ et $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ du *N*-glycane vont être le siège d'un contrôle qualité. Ce processus permet d'assurer que les glycoprotéines nouvellement synthétisées par la cellule ont acquis leur bonne conformation spatiale.

❖ La maturation golgienne

La Figure 25 présente les différentes étapes de la maturation golgienne. Le processus de maturation débute dans le compartiment cis-Golgi. Les réactions d'élagage du glycane $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ sont poursuivies grâce à la mannosidase golgienne I pour donner le $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. A défaut de l'action de l'enzyme, le glycane reste inchangé et la structure résultante est dite de type oligomannosidique.

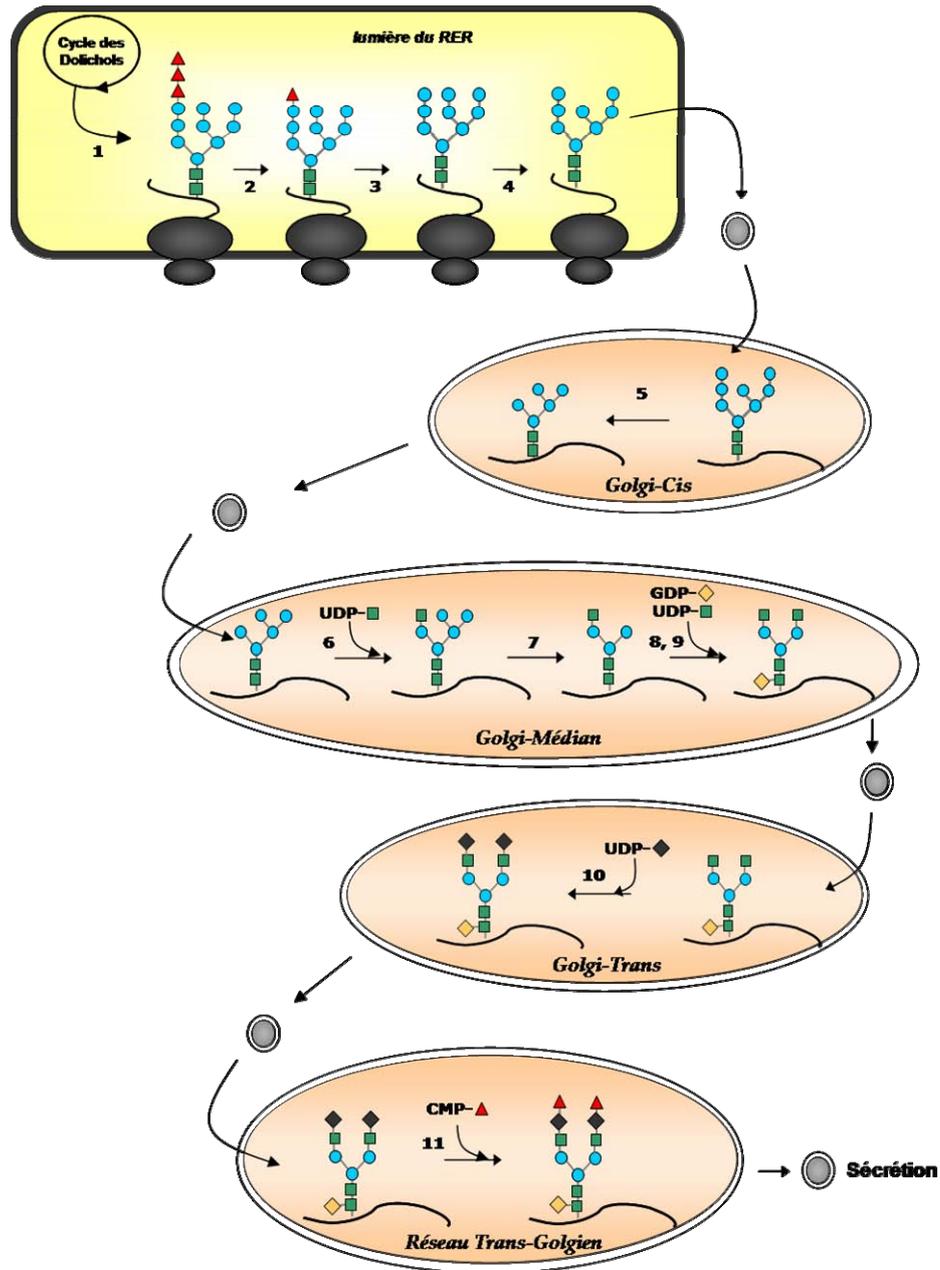


Figure 25 : Processus de maturation des N-glycannes dans le RE et l'appareil de Golgi (d'après Kornfeld and Kornfeld, 1985). 1 : OST, 2 : α -glucosidases I et II, 3 : α -glucosidase II, 4 : ER $\alpha(1,2)$ mannosidase, 5: mannose I golgienne, 6: GlcNAc-transférase, 7: mannose II golgienne, 8: GlcNAc-transférase II, 9 : $\alpha(1,6)$ fucosyltransférase, 10 : $\beta(1,4)$ galactosyltransférase, 11 : $\alpha(2,3)$ sialyltransférase, GlcNAc (■), mannose (●), galactose (◆), acide sialique (▲), fucose (◇) (adaptée de Goochee *et al.*, 1991).

Dans le compartiment median-Golgi, l'action de la *N*-acétylglucosaminyltransférase I (GlcNAc-Tf I) va permettre de brancher un résidu GlcNAc en $\beta 1,2$ sur le résidu mannose $\alpha 1,3$ du noyau. Cette structure est reconnue par la mannose golgienne II qui retire alors les résidus mannose de la branche $\alpha 1,6$. Son action détermine la structure finale du glycanne.

En effet, si l'enzyme GlcNAc-Tf III agit avant la mannosidase golgienne II, un résidu GlcNAc en β 1,4 (GlcNAc intercalaire) est ajouté sur le mannose central et la mannosidase golgienne II ne peut plus agir. Dans ce cas, la structure du glycanne sera dite de type hybride. Dans le cas contraire, la mannosidase golgienne II permet l'élimination des 2 résidus de mannose. L'action ultérieure des autres *N*-acétylglucosaminy-Tf, à savoir les IV, V et VI, conduit respectivement à des structures glycaniques dites de type complexe tri-, tétra- et penta-antennés.

Dans le compartiment trans-Golgi, des remaniements ultérieurs par diverses enzymes : *N*-acétylglucosaminy-, galactosyl-, fucosyl-, et sialyltransférases sur les glycannes de type hybride ou complexe permettent d'expliquer la diversité des structures glycaniques rencontrées sur les *N*-glycosylprotéines (Kornfeld and Kornfeld, 1985 ; Stanley *et al.*, 1996).

4.1.3.5. Le contrôle qualité des *N*-glycosylprotéines

Le RE est doté d'un mécanisme étroitement régulé lui permettant d'empêcher la sortie des protéines mal repliées (Figure 26). Ce mécanisme est appelé le cycle calnexine/calréticuline et se déroule dans la lumière du RE. Successivement à l'addition par l'OST de l'oligosaccharide $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ sur la protéine naissante, les glucosidases I et II vont éliminer deux molécules de glucose de la protéine encore mal repliée. Dans cette configuration, la protéine monoglucosidée peut alors se lier à une protéine chaperonne ; la calnexine (CNX) ou la calréticuline (CRT), voire les deux à la fois. Cette protéine chaperonne forme un complexe avec une thioloxydoréductase (ERp57) qui permet la formation des ponts disulfures de la protéine. L'élimination du dernier résidu de glucose par la glucosidase II permet de libérer la protéine du complexe CNX ou CRT. Trois voies peuvent alors être empruntées par la protéine en fonction de son état conformationnel (Helenius and Aebi, 2004) :

- ✓ Si la protéine est bien reliée, elle peut sortir du RE et s'engager vers l'appareil de Golgi. Des systèmes de transport existent pour l'aider à sortir du RE comme par exemple les lectines spécifiques des mannoses (ERGIC-53, VIP36 et VIPL).
- ✓ Si la protéine est mal repliée (mobilité trop importante de la protéine ou patch hydrophobes reconnus), elle est reconnue par une glucosyltransférase qui par l'intermédiaire de l'UDP-Glc reglucosyle la protéine pour recommencer le cycle de repliement jusqu'à son acheminement vers une conformation

correctement repliée de la protéine ou le cas échéant vers son entrée dans la voie de dégradation.

- ✓ Si la protéine ne parvient pas à acquérir une conformation correcte, la mannosidase I l'identifie comme présentant un repliement réfractaire, ce qui conduit à un oligosaccharide contenant 8 mannoses, qui est alors à son tour reglycosylé par la glucosyltransférase. Ce substrat défavorable pour la glucosidase, est alors reconnu par une lectine (EDEM) et dirigé vers la voie de dégradation appelée *ER-associated degradation* (ERAD). Elle subit un processus de rétro-translocation de la lumière du RE vers le cytoplasme afin d'être dégradée par la machinerie cytosolique du protéasome 26 (Bonifacino and Weissman, 1998 ; Hampton, 2002 ; Hiller *et al.*, 1996).

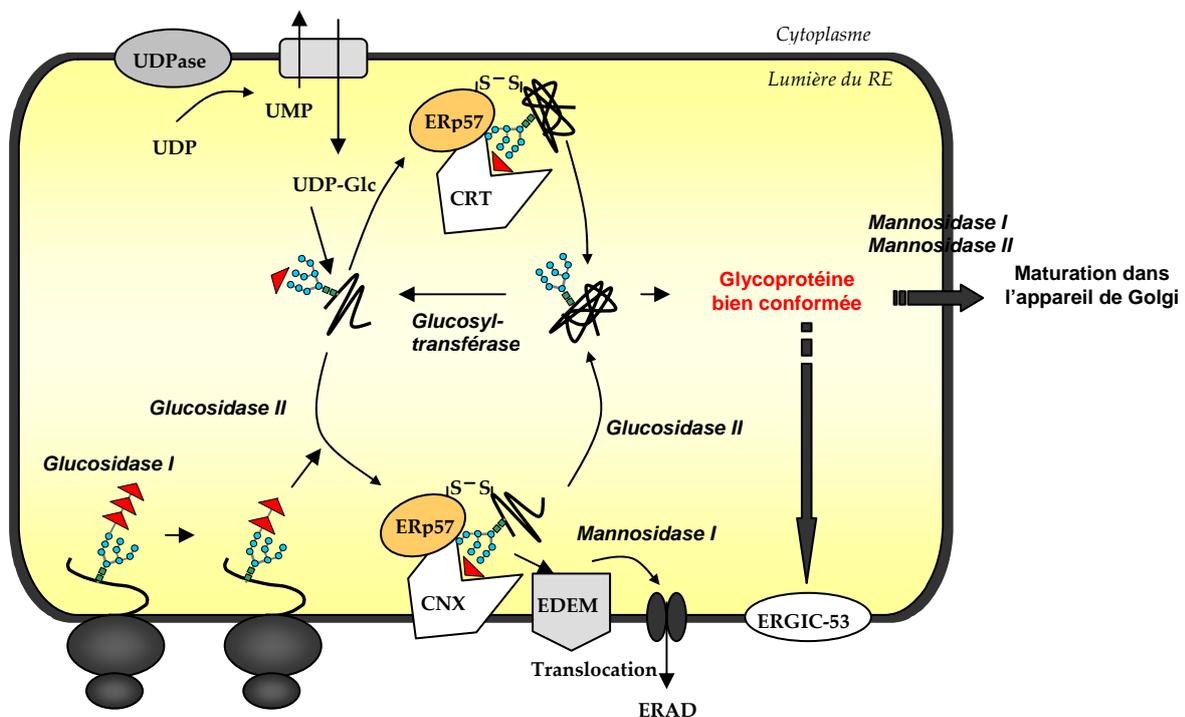


Figure 26 : Les premières étapes du contrôle qualité des glycoprotéines dans le RE : le cycle calnexine/calréticuline (adaptée de Helenius and Aebi, 2004).

Le mécanisme de contrôle qualité assure que seules les glycoprotéines correctement repliées, et par conséquent biologiquement actives, sont dirigées vers leur site d'action. Environ un tiers des protéines nouvellement synthétisées subit le processus de dégradation (Schubert *et al.*, 2000).

4.1.3.6. L'UPR dans les cellules de mammifère

En dépit de l'existence du contrôle qualité, il peut se produire un déséquilibre entre le taux de synthèse protéique et les capacités de mise en conformation, engendrant l'apparition de protéines mal conformées qui vont s'accumuler dans le RE. Ces conditions de « stress du RE » vont entraîner le déclenchement d'une réponse physiologique appelée UPR (*Unfolded Protein Response*) (Schroder and Kaufman, 2005). La réponse UPR permet ; (i) de ralentir la synthèse protéique globale de façon à réduire la quantité de protéines présentes dans la lumière du RE ; (ii) de synthétiser de nouvelles protéines chaperonnes ou des « foldases » pour stimuler les processus de repliement ; (iii) d'entraîner vers la dégradation les protéines mal repliées ; (iv) de déclencher l'apoptose de la cellule quand les processus précédents ont échoué.

Nous n'entrerons pas ici dans les détails des différents mécanismes de l'UPR ; nous suggérons de se référer pour le détail des mécanismes à la revue de Schroder and Kaufman, 2005. La réponse UPR entraîne l'activation de deux voies : une voie traductionnelle et une voie transcriptionnelle. Elle peut également déclencher, dans certains cas, l'activation d'une voie apoptotique.

La voie traductionnelle est la première qui se met en place. Elle permet de ralentir momentanément la synthèse protéique afin de ralentir l'arrivée de nouvelles protéines dans la lumière du RE. L'inhibition de la traduction s'effectue par l'intermédiaire de la kinase PERK qui lors d'un stress, se dimérise et s'autophosphoryle en *trans*. La voie transcriptionnelle va permettre d'activer un ensemble de gènes codant des protéines chaperonnes et des protéines impliquées dans la dégradation. Cette réponse est relayée par les protéines ATF6 et IRE1. Elle implique l'activation de trois protéines transmembranaires du RE : PERK (*PKR-like ER-associated protein kinase*), ATF6 (*activating transcription factor-6*) et IRE1 (*inositol-requiring enzyme-1*) (Rutkowski and Kaufman, 2004). L'activation de ces trois protéines nécessite leur dissociation de la protéine chaperonne BiP/GRP78 qui les maintient dans un état inactif dans les membranes du RE. L'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE entraîne la dissociation de BiP/GRP78 de ces 3 protéines transmembranaires qui va ensuite s'associer aux protéines en cours de repliement, permettant ainsi l'activation de la voie UPR. La voie apoptotique va se déclencher lorsque tous les efforts mis en œuvre pour prendre en charge l'excès de protéines dans le RE ont échoué (Zhang and Kaufman, 2006).

Ainsi, la réponse UPR, en association avec la voie de dégradation des protéines ERAD, a un rôle majeur dans l'adaptation du RE à la prise en charge d'une synthèse accrue de protéines.

4.1.4. La macro- et la microhétérogénéité de la glycosylation et les techniques de caractérisation

Rademacher *et al.* (1988) ont introduit le terme de glycoformes pour décrire des glycoprotéines ne différant les unes des autres que par leur structure glycanique. On parle alors de glycohétérogénéité (Rademacher *et al.*, 1988). Cette hétérogénéité peut être de deux ordres ; (i) l'hétérogénéité d'occupation des sites de glycosylation (macrohétérogénéité) qui se caractérise par l'occupation plus ou moins partielle des sites de glycosylation, (ii) l'hétérogénéité de structure des glycannes (microhétérogénéité) qui se traduit par la présence d'oligosaccharides différents sur un site de glycosylation donné d'une chaîne polypeptidique. Cette diversité de structure nécessite un contrôle multiple et complexe des diverses étapes de la glycosylation.

Le degré de la macrohétérogénéité et de la microhétérogénéité des glycoprotéines est dépendant des sites de glycosylation, de la conformation de la protéine, de l'état physiologique des cellules, le cas échéant du vecteur d'expression et de l'environnement.

Le profil de glycosylation des protéines recombinantes peut être obtenu par 4 méthodes : (i) la séparation des différentes glycoformes, (ii) la détermination du contenu en monosaccharides, (iii) le clivage des oligosaccharides de la glycoprotéine et (iv) la dégradation de la glycoprotéine par des peptidases (peptide mapping).

Les glycopeptides peuvent être analysés par les mêmes méthodes que celles utilisées pour la caractérisation de la glycoprotéine intacte.

Afin de répondre aux exigences de la FDA, l'analyse de la glycosylation de la protéine d'intérêt doit être effectuée au minimum par 2 techniques analytiques (Harcum, 2006). Le recoupement des données obtenues par les différentes techniques permet ainsi de valider le profil de glycosylation des protéines recombinantes. Plusieurs paramètres doivent être pris en considération pour la détermination des techniques analytiques à utiliser : concentration de l'échantillon, coût par échantillon, résolution, disponibilité de l'équipement et de l'expertise technique. Les différentes techniques d'analyse de la glycosylation sont regroupées dans le Tableau 13 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** La caractérisation de la macrohétérogénéité de la glycosylation d'une protéine se fait par recours à des techniques électrophorétiques. Concernant la caractérisation de la microhétérogénéité, les lectines peuvent être utilisées. Toutefois, les méthodes les plus courantes sont la chromatographie liquide, la spectrométrie de masse et la RMN (Morelle *et al.*, 2006).

Tableau 13: Synthèse des différentes techniques analytiques permettant de caractériser la glycosylation des glycoprotéines (PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis, SDS : sodium dodecylsulfate, IEF : isoelectrofocalisation, 2D : 2 dimensions, FACE : fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis, HPLC : high performance liquid chromatography, HPAEC-PAD : high performance anion exchange chromatography with pulse amperometric detection, MS : mass spectrometry, FAB : fast atom bombardment, ES : electrospray, MALDI : matrix assisted laser desorption ionization, TOF : time of flight, GS : gamma ray, LC : liquid chromatography, RMN : nuclear magnetic resonance) (d'après Harcum, 2006).

Méthodes	Techniques	Glycosylation	Quantité	Niveau de difficulté analytique
Electrophorèse	SDS-PAGE	Macrohétérogénéité	µg	Moyen
	IEF-PAGE	Macrohétérogénéité	µg	Moyen
	2D-PAGE	Microhétérogénéité (partielle)	µg	Moyen +
	Western-blot	Macrohétérogénéité	ng	Moyen
	FACE	Microhétérogénéité	pmol	Moyen
	Capillaire (CE)	Macrohétérogénéité	Microhétérogénéité (partielle)	fmol
Chromatographie Liquide	HPLC	Macrohétérogénéité	µmol	Moyen +
	HPAEC-PAD	Microhétérogénéité	pmol	Moyen +
Spectrométrie de masse	FAB-MS	Microhétérogénéité	nmol	Elevé
	ES-MS	Microhétérogénéité	fmol	Elevé
	MALDI-MS et MALDI-TOF-MS	Microhétérogénéité (localisation du site de glycosylation)	pmol	Elevé
	GS-MS	Microhétérogénéité	nmol	Elevé
	LC-MS	Microhétérogénéité	µg	Elevé
	RMN	Microhétérogénéité	mg	Très élevé
Digestion par des exoglycosidases		Microhétérogénéité (localisation du site de glycosylation)	µg	Moyen

4.1.5. La nécessité de produire des protéines recombinantes thérapeutiques de qualité constante

L'influence de la glycosylation sur les propriétés des protéines a été initialement mise en évidence grâce à la maladie de Wilson. Cette maladie entraîne une réduction du taux de céruléoplasmines plasmatiques. Ils ont observé que l'absence d'acides sialiques sur les céruléoplasmines glycosylées provoque une réduction du temps de demi-vie de la protéine (~ 30 min *vs.* ~ 56 min). En effet, l'absence de résidus d'acides sialiques entraîne une accumulation des céruléoplasmines dans le foie (Ashwell and Morell, 1974 ; Morell *et al.*, 1968).

Ainsi, ce n'est qu'au cours des années 1970 qu'a été reconnue ce que J. Montreuil (1993) dénomme « l'intelligence biologique des sucres ». En effet, il est clairement établi que les défauts de la glycosylation sont responsables, *in-vivo*, de maladies sévères regroupées sous le terme de *Congenital Disorders of Glycosylation* (CDG) (Grünewald *et al.*, 2002 ; Marquardt and Denecke, 2003). A titre d'exemples, les pathologies qui illustrent le mieux ces anomalies de glycosylation sont (Chirat, 2008):

- ✓ les cancers au cours desquels une antennarisation plus importante au niveau des *N*-glycannes est observée,
- ✓ la polyarthrite rhumatoïde qui conduit à une sous-galactosylation et à une sous-fucosylation des *N*-glycannes des IgG,
- ✓ les maladies hépatiques, comme par exemple la cirrhose, qui se caractérisent par une hyposialylation et une hypogalactosylation mais une hyperfucosylation au niveau du résidu de GlcNAc du point d'attache et un taux élevé de GlcNAc intercalaire.

L'impact d'un changement de glycoformes sur les fonctions biologiques diffère d'une protéine à l'autre et il convient donc de le déterminer pour chaque protéine. Dans la plupart des cas, la reproduction la plus fidèle possible des glycoprotéines humaines est adoptée en choisissant judicieusement le système d'expression de la protéine recombinante en fonction de ses potentialités de glycosylation.

Les fonctions jouées par les glycannes sont très diverses : ils peuvent réguler le trafic intracellulaire de la protéine, sa localisation et influencer son temps de demi-vie (Figure 27). Leurs fonctions peuvent être classées en trois principales catégories. Leur première vocation est d'ordre physico-chimique : les glycannes contribuent à la mise en place de la structure tridimensionnelle de la protéine en influençant son repliement. Ils jouent également un rôle sur la solubilité de la molécule de par leur caractère hydrophile. Enfin, ils couvrent plus ou moins la surface de la protéine, jouant ainsi un rôle déterminant dans la résistance aux protéases ou dans le masquage d'épitopes, potentiellement immunogènes. La deuxième fonction des structures glycaniques n'est pas directement liée à l'activité biologique des glycoprotéines, mais la présence de glycannes est fortement susceptible de réguler ou moduler l'activité des protéines en contrôlant leur demi-vie. Enfin, les glycannes peuvent eux-mêmes porter une fonction biologique, par le biais de leur interaction spécifique avec des molécules cibles. Néanmoins, les fonctions biologiques des glycannes diffèrent d'une protéine à l'autre : dans certains cas, l'absence de glycosylation ne modifie guère la fonction

de la protéine considérée alors que dans d'autres cas, la protéine peut ne plus être fonctionnelle.

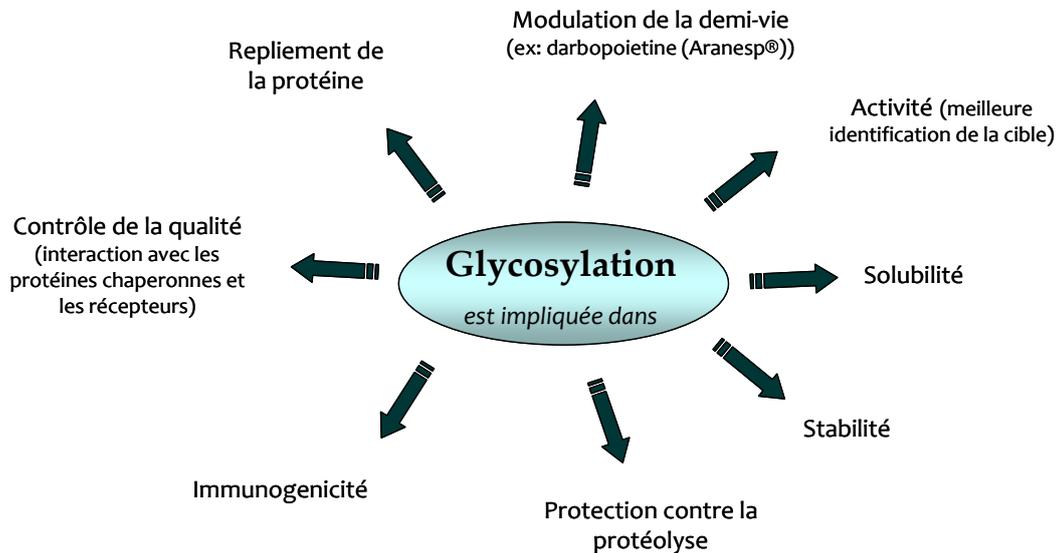


Figure 27 : Fonctions possibles de la glycosylation des protéines

4.1.5.1. Les modifications physicochimiques dues aux glycanes

La présence d'oligosaccharides sur la protéine implique un changement structurel de la protéine et par conséquent peut engendrer un changement de reconnaissance de la protéine vis-à-vis de son récepteur. Ils apportent également des modifications en termes de solubilité, oligomérisation, charge électrique, masse, taille et viscosité. Par exemple, l'addition d'acide sialique n'augmente pas seulement la taille et la masse de la protéine mais modifie également sa charge et sa solubilité (Lis and Sharon, 1993 ; Reuter and Gabius, 1999). La présence d'oligosaccharides permet de faciliter le repliement de la protéine (Helenius and Aebi, 2001), de stabiliser sa conformation, d'augmenter sa stabilité thermique ainsi que sa résistance aux protéases (Ashford *et al.*, 1993). Ces dernières propriétés sont liées à l'impact des oligosaccharides sur les fonctions chimiques à la surface des protéines ainsi que sur la structure tertiaire de la protéine. La glycosylation permet donc d'augmenter la stabilité de la protéine, notamment en évitant ou réduisant les effets liés aux réactions d'oxydation, de dénaturation par le pH, de précipitation ou encore d'agrégation (Sola and Griebenow, 2009).

De nombreuses études relatent l'amélioration de la stabilisation *in-vitro* des protéines en raison de la présence de glycannes : alpha-galactosidase (agrégation, précipitation), alpha-glucosidase (dénaturation thermique), alpha 1-antitrypsine (dénaturation chimique et thermique), chymotrypsine (dénaturation chimique, thermique et agrégation), choriogonadotropine alpha (dénaturation thermique), EPO alpha (dénaturation chimique, thermique, par le pH, oxydation, agrégation), tyrotropine alfa (agrégation), lenograstime (dénaturation thermique, par le pH, ponts disulfures), ranpirnase (ribonucléase) (dénaturation thermique), IFN- β (ponts disulfures, précipitation, dénaturation thermique, agrégation), urokinase alpha (dénaturation thermique), insuline (ponts disulfures, agrégation), anticorps (IgG) (dénaturation thermique) (Sola and Griebenow, 2010).

L'activité spécifique de la protéine est donc affectée par la suppression partielle ou complète des oligosaccharides mais est rarement complètement abolie.

4.1.5.2. Les modifications du temps de demi-vie dues aux glycannes

La glycosylation des protéines joue un rôle significatif au niveau de la clairance *in-vivo* de la protéine et détermine donc son efficacité. Pour la majorité des enzymes, la glycosylation n'affecte pas l'activité biologique mais peut avoir un effet sur l'efficacité thérapeutique. En effet, l'efficacité thérapeutique est la combinaison de l'activité biologique et du taux de clairance chez le patient. Ainsi, l'activité biologique peut être extrêmement élevée mais l'efficacité est nulle si la glycoprotéine est immédiatement éliminée *in-vivo*. En revanche, une glycoprotéine avec une activité biologique relativement faible peut avoir une efficacité élevée si la clairance *in-vivo* est faible (Lis and Sharon, 1993 ; Reuter and Gabius, 1999), généralement en raison d'une protection de la protéine vis-à-vis des protéases. L'EPO, le t-PA, la Pulmozyme (DNase), les facteurs VIII et IX sont des exemples de glycoprotéines thérapeutiques dont l'efficacité est augmentée grâce à la présence des oligosaccharides. En effet, dans le cas de l'EPO injectée par voie intra-veineuse, le temps de demi-vie est de 5 à 6 h si la protéine est sialylée alors qu'il n'est que de 2 min dans le cas contraire (Walsh and Jefferis, 2006). Une diminution de la sensibilité des protéines vis-à-vis de l'attaque protéolytique grâce à la présence d'oligosaccharides a également été montrée pour plusieurs protéines : glucagon, lenograstime, bucélipase alpha, drotrécogine alfa, ranpirnase, thyrosine alpha, urokinase alpha, IFN- γ et de nombreux anticorps (IgG) (Sola and Griebenow, 2010). Par l'utilisation de techniques de glyco-ingénierie, il est possible d'augmenter le nombre d'acides sialiques. Il a été montré qu'une hyperglycosylation permet d'augmenter le temps de demi-vie de l'IFN- α , l'IFN- γ , la fraction Fv d'un anticorps, l'asparaginase, la

darbopoéitine alpha, la thrombopoéitine, la leptine, l'hormone FSH, l'albumine, l'IFN- α -2 et la corifollitropine alpha (Sola and Griebenow, 2010).

Plusieurs mécanismes de clairance sont associés à des récepteurs cellulaires qui ont une forte affinité pour le monosaccharide situé en position terminale du glycanne. Le récepteur asialique situé sur les cellules hépatiques se lie aux glycannes se terminant par un résidu galactose ou GalNAc des structures *N*-asialoglycosidiques complexes et *O*-asialoglycosidiques. Ce récepteur joue probablement un rôle majeur dans le turnover important des glycoprotéines du sérum (Ashwell and Morell, 1974).

Les glycannes peuvent également influencer la clairance par un mécanisme qui n'implique pas le processus de haute affinité des récepteurs cellulaires pour les oligosaccharides. En effet, les protéines humaines qui ont un poids moléculaire inférieur à 70 kDa sont continuellement éliminées de la circulation sanguine par les reins. Les tubules des reins impliqués dans la filtration sont sensibles à la structure tertiaire de la protéine et à son poids moléculaire. Ils sont complètement inhibés par la présence d'une charge électrique à la surface des protéines. Ainsi, les glycannes peuvent prolonger le temps de demi-vie circulatoire en augmentant à la fois la taille et la charge de la glycoprotéine.

4.1.5.3. Les modifications biologiques dues aux glycannes

Les glycannes contribuent indirectement au rôle antigénique de la glycoprotéine. Par exemple, l'oligosaccharide peut réduire l'accessibilité à un site antigénique par son encombrement stérique ou par la charge électrique liée à la présence d'acides sialiques. D'un autre côté, le rôle antigénique de la glycoprotéine peut être altéré par l'influence des oligosaccharides sur la conformation de la protéine.

Les glycannes peuvent moduler l'activité enzymatique et hormonale, avoir un rôle de récepteur cellulaire pour les lectines, les anticorps, les toxines et les interactions entre cellules. Un exemple d'activité hormonale modifiée par la présence d'oligosaccharides est celui de la gonadotropine chorionique humaine (hCG) : la forme déglycosylée a une activité *in-vitro* mais aucune *in-vivo* (Lis and Sharon, 1993 ; Lustbader *et al.*, 1996). La présence de la glycosylation (macrohétérogénéité) sur la protéine a donc un impact important pour son activité biologique. Par ailleurs, l'activité *in-vivo* de l'EPO est amplifiée lorsque la présence d'acide sialique est plus importante. Dans ce dernier cas, la microhétérogénéité de la glycosylation de la protéine joue donc un rôle important pour son activité biologique.

L'activité biologique des protéines est fortement variable en raison du nombre de glycoformes possibles. C'est pourquoi, le profil de glycosylation (empreinte) devra faire

partie intégrante des spécifications recommandées par la FDA. Actuellement, chaque protéine est produite selon un procédé qui lui est propre afin d'obtenir la même empreinte d'un lot à l'autre. Toutefois, si des progrès sont effectués dans la compréhension des mécanismes impliquant la variation de la glycosylation des protéines, la fidélité de l'empreinte glycosidique sera plus facilement obtenue. L'amélioration du contrôle de la qualité sera également plus facilement réalisée tout en ayant davantage de flexibilité dans le procédé de production (Jenkins *et al.*, 1994 ; Geisow, 1992 ; Liu, 1992).

Le processus de glycosylation des protéines est sous le joug des facteurs environnementaux et génétiques (Goochee *et al.*, 1991). Par ailleurs, le choix de la cellule hôte ainsi que du vecteur d'expression ont également un impact majeur sur le profil de glycosylation (Jenkins *et al.*, 1996). La glycosylation n'apparaît donc pas comme un élément superflu mais plutôt comme un attribut nécessaire au bon fonctionnement de la protéine recombinante. Des exemples de protéines glycosylées produites à partir de cellules animales entre 1987 et 2007 sont donnés dans le Tableau 14. En 2008, deux autres glycoprotéines produites à partir de cellules CHO ont obtenu une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis : une alpha-trombine (Recothrom) et un facteur de coagulation VIII (Xyntha) (Grillberger *et al.*, 2009). Au vue des fonctions jouées par les glycannes, il apparaît clairement qu'au cours d'un procédé, les paramètres de productivité et de glycosylation doivent être pris en compte simultanément.

Ainsi, la glycosylation des protéines recombinantes va influencer sur leurs propriétés biologiques et leur temps de demi-vie. L'impact de la glycosylation sur ces deux paramètres pharmacocinétiques est principalement lié à une réduction de la clairance hépatique et rénale ainsi qu'à une diminution des dégradations protéolytiques potentielles grâce à la présence de glycannes chargés par des acides sialiques à titre d'exemple.

Tableau 14 : Exemples de glycoprotéines recombinantes thérapeutiques produites par les cellules animales ; listées par ordre de 1^{ère} date d'AMM (d'après Hossler *et al.*, 2009)

Nom commercial	Molécule	Société	Indication	Lignée cellulaire	Milieu de culture (sans plasma)	Formulation (sans plasma)	Année de 1 ^{ère} AMM
Activase	tPA	Genentech	Infarctus du myocarde	CHO	Non	Oui	1987 (US)
Cerezyme	b-gluco-cérébrosidase	Genzyme	Maladie de Gaucher	CHO	Non	Oui	1994 (US) 1997 (UE)
Avonex	IFN-b-1-a	Biogen Idec	Sclérose en plaques	CHO	Non	Oui, dans la nouvelle formulation (EU 2003)	1996 (US) 1997 (UE)
Rituxan	Anticorps monoclonal anti-CD20	Genentech (IDEC)	Lymphome non-Hodgkinien	CHO	Non	Oui	1997 (US) 1998 (UE)
Remicade	Anticorps monoclonal anti-TNF-a	Centocor Johnson&Johnson	Maladie de Crohn Arthrite rhumatoïde	SP2/0	Non	Oui	1998 (US) 1999 (UE)
Herceptine	Anticorps monoclonal anti-HER2	Genentech	Cancer du sein	CHO	Oui	Oui	1998 (US) 2000 (UE)
Enbrel	Récepteur TNF- α associé à la protéine de fusion IgG	Amgen	Arthrite rhumatoïde	CHO	Non	Oui	1998 (US) 2000 (UE)
TNKase	tPA	Genentech	Infarctus du myocarde	CHO	Non	Oui	2000 (US)
Aranesp	Darbopoiétine a	Amgen	Anémie	CHO	Non	Non (US) Oui (EU)	2001 (US) 2001 (UE)
Rebif	IFN-b-1-a	Merck Serono	Sclérose en plaques	CHO	Non	Non	2002 (US) 1998 (UE)
Avastin	Anticorps monoclonal anti-VEGF	Genentech	Cancer du colon	CHO	Oui	Oui	2004 (US) 2005 (UE)
Orencia	Protéine de fusion Ig-CTLA4	Bristol-Myers Suibb	Arthrite rhumatoïde	CHO	Oui	Oui	2005 (US) 2007 (UE)
Myozyme	α -glucosidase	Genzyme	Maladie de Pompe	CHO	Non	Oui	2006 (US) 2006 (UE)
Vectibix	Anticorps monoclonal anti-EGRF	Amgen	Carcinome du colon	CHO	Oui	Oui	2006 (US) 2007 (UE)
Soliris	Anticorps monoclonal anti-C5	Alexion	Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	NS0	Non	Oui	2007 (US) 2007 (UE)
Mircera	Méthoxy polyéthylène glycopoiétine b	Hoffmann-La Roche	Anémie	CHO	Oui	Oui	2007 (US) 2007 (UE)
Rebif New	rh IFN-b-1a	Merck Serono	Sclérose en plaques	CHO	Oui	Oui	2007 (UE)

4.1.6. Les paramètres opératoires pouvant influencer la glycosylation

La glycosylation des protéines dépend de l'environnement cellulaire, à savoir la source de carbone, l'oxygène dissous, le pH, la température etc. L'expression des protéines recombinantes en quantité beaucoup plus importante que lorsqu'elles sont produites par les voies naturelles augmente potentiellement l'influence des facteurs environnementaux qui altèrent l'expression ou la fonction des enzymes impliquées dans le processus de glycosylation.

Plusieurs stratégies de contrôle du processus de glycosylation peuvent être mis en place :

- ✓ choix de la lignée cellulaire
- ✓ choix du mode de culture
- ✓ paramètres contrôlés
- ✓ milieux de culture
- ✓ ingénierie cellulaire
- ✓ ingénierie des protéines

4.1.6.1. Choix de la lignée cellulaire

La lignée cellulaire CHO est la lignée la plus utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour la production de protéines recombinantes, à l'exception de quelques autres lignées cellulaires telles que la lignée Sp2/0 (myélome de souris), la lignée humaine HT-1080, les lymphoblastes humains et les myélomes de souris (NS0). D'autres lignées cellulaires telles que les cellules embryonnaires humaines de rein (HEK), les cellules de rein de hamster nouveau-né (BHK) et les cellules de la rétine humaine (PERC.6) sont à l'heure actuelle de plus en plus utilisées (Hossler *et al.*, 2009). Le choix de la lignée cellulaire peut avoir un impact important sur les profils de glycosylation obtenus pour une protéine recombinante donnée. Par exemple, il a été montré que la glycosylation de la partie Fc d'un anticorps monoclonal (qu'il soit chimérique ou humanisé) peut varier en fonction de la lignée cellulaire utilisée (CHO, NS0, Sp2/0, YB2/0, EBX) et dépend également du mode et des conditions de culture (Raju *et al.*, 2000). Les cellules animales ont des capacités de glycosylation différentes en raison de l'expression et de la fonctionnalité des enzymes impliquées dans le processus de glycosylation qui varient d'un tissu à un autre pour un même organisme. Ainsi, le niveau d'expression de l'enzyme $\alpha(2,6)$ SiaT peut varier entre 50 et 100 fois entre différents tissus de rat (Lee *et al.*, 1989). En outre, contrairement aux cellules murines et humaines, les cellules

CHO et BHK ne possèdent pas le gène de l'enzyme $\alpha(2,6)$ SiaT et peuvent donc ajouter des acides sialiques uniquement par l' $\alpha(2,3)$ SiT. De plus, des acides sialiques de type glycolique (NeuGc) ont également été mis en évidence dans les cellules CHO. Or, ces structures se sont révélées être immunogènes pour l'homme (Noguchi *et al.*, 1995). Enfin, les cellules murines expriment une $\alpha 1,3$ galactosyltransférase, susceptible de rendre immunogènes les glycanes portant des résidus Gal liés en $\alpha 1,3$ (Jenkins and Curling, 1994).

4.1.6.2. Choix du mode de culture

Les trois principaux modes de culture sont le mode discontinu, le mode semi-continu et le mode perfusé. Le choix du mode de culture est important puisque la glycosylation d'une protéine recombinante peut varier en fonction du mode de culture. Il a par exemple été montré que l'addition d'acides sialiques est augmentée pour la protéine SEAP en mode perfusé par rapport à celle retrouvée en mode semi-continu (Lipscomb *et al.*, 2005). Une des explications possibles serait que la vitesse de croissance cellulaire plus faible obtenue en mode perfusé permettrait une glycosylation plus complète de la protéine recombinante. Toutefois, ce mode de culture est principalement utilisé en laboratoire pour la compréhension du métabolisme cellulaire et il est peu utilisé par les industriels en raison de la complexité de sa mise en oeuvre. Cependant, de nombreux types de réacteurs perfusés commerciaux ont été mis au point ces dernières années. De nombreuses discussions ont actuellement lieu au sein des industries des biotechnologies quant au choix de l'utilisation du mode perfusé plutôt que du mode semi-continu sur la base du coût et du temps de développement. Cette décision devrait être considérée en fonction de la protéine produite plutôt que par rapport aux considérations de temps et de prix.

4.1.6.3. Paramètres contrôlés

Les paramètres de contrôle tels que la température, le pH, l'oxygène dissous, la pression partielle en CO₂ ou encore la concentration en ions ammonium produits peuvent également avoir un impact sur la glycosylation des protéines recombinantes. Un résumé des différents impacts de ces paramètres sur la glycosylation décrits dans la littérature est présenté dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Impacts de certains paramètres de contrôle sur la glycosylation des protéines recombinantes (d'après Hossler *et al.*, 2009).

Paramètres	Effets sur la glycosylation de la protéine	Références
Oxygène dissous (DO) (hypoxie)	Impact variable sur la glycosylation : <ul style="list-style-type: none"> - changements mineurs pour le t-PA produit par des cellules CHO - changements importants pour la sialylation de la FSH produit par des cellules CHO - réduction de la galactosylation d'une IgG 	Lin <i>et al.</i> , 1993 ; Chotigeat <i>et al.</i> , 1994 ; Kunkel <i>et al.</i> , 1998
Oscillation de l'oxygène dissous	Changements importants des antennes et de la sialylation d'un anticorps monoclonal produit par des hybridomes	Serrato <i>et al.</i> , 2004
pH	Impact sur la galactosylation, sialylation, de la microhétérogénéité et de la macrohétérogénéité de la glycosylation pour des variations de pH entre 6,8 et 7,8	Borys <i>et al.</i> , 1993 ; Muthing <i>et al.</i> , 2003 ; Gawlitzek <i>et al.</i> , 2009
pCO ₂	Diminution de la polysialylation des protéines d'adhésion de cellules neuronales (NCAM) présentes sur la membrane des cellules CHO	Zanghi <i>et al.</i> , 1999b
Température	Impact variable sur la glycosylation <ul style="list-style-type: none"> - Augmentation des sites d'occupation du tPA produit par des cellules CHO lorsque la température est diminuée (33 et 31°C) - Diminution de la sialylation de l'EPO-Fc produite par des cellules CHO lorsque la température est diminuée (33 et 31°C) - Profils identiques de glycosylation de l'EPO produite par des cellules CHO entre 32°C et 37°C. En-dessous de 32°C, il y a diminution des formes tétraantennées et sialylées 	Gawlitzek <i>et al.</i> , 2009 ; Trummer <i>et al.</i> , 2006b Woo <i>et al.</i> , 2008
Contraintes de cisaillement (élevées)	Diminution de l'occupation des sites de glycosylation du tPA Amélioration des capacités de glycosylation d'un anticorps produit par des cellules CHO	Senger and Karim, 2003 Godoy-Silva <i>et al.</i> , 2009
Ions Ammoniums (devraient être idéalement inférieurs à 2 mM)	Altération de la sialylation de l'EPO à des concentrations élevées	Yang and Butler, 2000a ; Yang and Butler, 2002

4.1.6.4. Milieux de culture

Les milieux de culture sont généralement constitués de 50 à 100 composés chimiquement définis auxquels sont souvent ajoutés des suppléments de composition non définie : extraits de levure, hydrolysats de plante et sérum (cf. paragraphe 2.2.1. de la synthèse bibliographique). Toutefois, il a été montré que la Primatone RL, un hydrolysat d'origine animale, affecte la sialylation de l'IFN- γ produit par des cellules CHO en mode discontinu et

semi-continu (Gu *et al.*, 1997). Par ailleurs, la présence de sérum ou non lors de cultures de cellules BHK-21 en mode perfusé exprimant une variante d'IL-2 a un impact sur le profil de glycosylation : ratio de N- et O-glycannes, quantité de protéine non glycosylée et composition des oligosaccharides (Gawlitzeck *et al.*, 1995a).

L'impact de différents composés chimiquement définis de milieu de culture est synthétisé dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Impacts de certains composés du milieu de culture sur la glycosylation de protéines recombinantes (d'après Hossler *et al.*, 2009)

Composé(s)	Effet sur la glycosylation de la protéine	Références
Faible concentration en glucose/glutamine et galactose	Pas de glycosylation de l'IFN- γ produit par des cellules CHO ; Diminution de la sialylation et augmentation des profils de type hybride et <i>high-mannose</i> de l'IFN- γ produit par des cellules CHO en mode semi-continu	Hayter <i>et al.</i> , 1992 ; Wong <i>et al.</i> , 2005
Manganèse (Mn)	Modulation du profil de glycosylation Inhibition de la O-glycosylation	Crowell <i>et al.</i> , 2007 ; Gawlitzeck <i>et al.</i> , 2009 Kaufman <i>et al.</i> , 1994
Butyrate de sodium	Diminution de la qualité d'une protéine produite par des cellules CHO (augmentation de la microhétérogénéité, diminution de la sialylation et diminution de l'activité <i>in-vivo</i>)	Sung <i>et al.</i> , 2004
Glycérol	Augmentation de la sialylation de l'IFN- β produit par des cellules CHO	Rodriguez <i>et al.</i> , 2005
Pool de nucléotides-sucre	Amélioration de la sialylation de l'IFN- γ produit par des cellules CHO mais pas celle de TIMP-1 par ajout de N-Acétylemannosamine bien que le pool d'acides sialiques CMP augmente dans les deux cas	Baker <i>et al.</i> , 2001 ; Gu and Wang, 1998
Glycine bêtaïne	Inhibition des polysialylations quand l'osmolarité est < 435 mmHg mais les protègent quand l'osmolarité est > à cette valeur	Schmelzer and Miller, 2002
Supplémentation en Lipides et Dolichol	Amélioration de l'occupation des sites de glycosylation de l'IFN- γ produit par des cellules CHO	Castro <i>et al.</i> , 1995 ; Jenkins <i>et al.</i> , 1994

Ainsi, la composition du milieu de culture a de nombreux effets sur la glycosylation des protéines recombinantes produites par les cellules animales. La connaissance et le contrôle de l'impact des composés des milieux de culture sont donc indispensables pour aboutir à une meilleure maîtrise des processus de glycosylation des protéines recombinantes.

4.1.6.5. Ingénierie cellulaire

L'un des objectifs de l'ingénierie cellulaire est de permettre d'augmenter l'activité biologique de la protéine recombinante d'intérêt. Les modifications portent principalement sur la sialylation et la fucosylation. En effet, ces deux motifs permettent respectivement d'augmenter le temps de demi-vie et de réduire la clairance (lorsque les acides sialiques sont présents) et d'augmenter l'activité ADCC (lorsque le taux de fucose est réduit ou absent) (Shields *et al.*, 2002).

Ainsi, la maîtrise des techniques du génie génétique a permis de modifier efficacement la machinerie intracellulaire des cellules CHO. Plusieurs stratégies peuvent alors être adoptées. L'une des stratégies consiste à faire exprimer à des cellules CHO des glycosyltransférases qu'elles n'exprimaient pas auparavant, telles l' α 2,6-ST (Monaco *et al.*, 1996), l' α 1,3 FucT (Potvin *et al.*, 1990) ou encore la GnTIII (Umana *et al.*, 1999). L'expression de ces deux dernières enzymes permet d'obtenir une meilleure activité ADCC des anticorps cytotoxiques produits par des cellules CHO. Une autre stratégie, au contraire, consiste à réduire l'activité de certaines enzymes exprimées dans les cellules CHO mais non chez l'homme, telle la CMP-NeuAc hydroxylase (Chenu *et al.*, 2003). L'utilisation de siRNA contre le gène de l'enzyme α 1,6-FucT a permis de défucosyler 60% des anticorps produits, conduisant ainsi à une activité ADCC 100 fois plus élevée. Il faut toutefois souligner que des profils légèrement différents de croissance cellulaire ont été obtenus par rapport aux cellules CHO sauvages (Mori *et al.*, 2004 ; Mori *et al.*, 2007). Par ailleurs, la société Biowa Inc. utilise la technologie knock-down pour supprimer l'expression de α 1,6-FucT dans les cellules CHO productrices d'anticorps. La société a donc créé une lignée cellulaire, appelée Potelligent®, capable de produire des anticorps dépourvus de fucose. Ces types d'anticorps permettent d'avoir une activité ADCC 50 à 100 fois plus importante. D'autres auteurs ont utilisé une stratégie d'ARN anti-sens afin de réduire le taux de sialidase relarguée par des cellules CHO dans le milieu de culture et empêcher ainsi la désialylation des protéines recombinantes. Dans cette lignée CHO mutante, l'activité sialidasique est réduite de 40% par rapport aux cellules sauvages. Le contenu en acide sialique de la protéine modèle, une DNase, est également augmenté de 20-37% (Ferrari *et al.*, 1998).

4.1.6.6. Ingénierie génétique

L'ingénierie des protéines permet de modifier la macrohétérogénéité de la glycosylation des protéines considérées.

L'insertion d'un site supplémentaire de *N*-glycosylation sur une protéine d'intérêt par mutagène dirigée permet d'améliorer l'efficacité de la protéine *in-vivo*. En effet, l'ajout de 2 sites supplémentaires de *N*-glycosylation sur l'EPO a permis d'augmenter l'efficacité *in-vivo* de l'EPO ainsi que ses propriétés pharmacocinétiques (Elliott *et al.*, 2003). Cette EPO modifiée est nommée darbopoéitine alpha et est actuellement commercialisée sous le nom d'Aranesp®. D'autres études ont permis d'augmenter la durée de demi-vie de la FSH de 3 à 4 fois par l'insertion d'un site de *N*-glycosylation supplémentaire (Perlman *et al.*, 2003). Cette technique d'ingénierie des protéines a récemment été réalisée avec succès pour un fragment d'anticorps (Stork *et al.*, 2008).

4.1.6.7. Stratégies pour les années à venir

Les différentes stratégies citées précédemment ont montré que dans certains cas, l'influence d'un paramètre du procédé sur la glycosylation varie en fonction de la protéine exprimée. A l'heure actuelle, ces différences obtenues en fonction des protéines demeurent non comprises. Une compréhension physiologique plus approfondie des réponses cellulaires et des profils de glycosylation induits par des conditions particulières est donc requise. La caractérisation des niveaux d'expression des gènes des protéines impliquées dans les processus de glycosylation pourrait permettre une meilleure maîtrise des procédés conduisant à une glycosylation de qualité et d'efficacité constantes. Cette caractérisation pourrait ensuite être utilisée pour le choix du clone producteur par le biais du criblage de l'expression des gènes des protéines et enzymes impliquées dans le processus de glycosylation ainsi que la localisation des enzymes et des nucléotides-sucres. Ainsi, la prise en compte de la qualité de la protéine devrait avoir lieu dès la sélection du clone cellulaire, autrement dit en parallèle des critères de croissance et de production (Walsh and Jefferis, 2006).

En raison des contraintes de temps et de l'impossibilité de purifier correctement l'ensemble des différentes glycoformes pour une protéine donnée, l'étude de la relation entre le profil de glycosylation d'une protéine et son efficacité pharmacologique demeure encore difficile. La constitution d'une banque de données de glycoformes tenant compte des capacités pharmacologiques et de clairance *in-vivo* pourrait permettre de définir des profils de glycosylation optimisés pour une application chez l'homme. Cette stratégie ferait alors partie intégrante de la méthodologie QbD (Quality by Design) établie par la FDA et qui prend en compte les divers paramètres pouvant influencer la qualité du produit final.

5. L'interféron-gamma humain

5.1. Historique

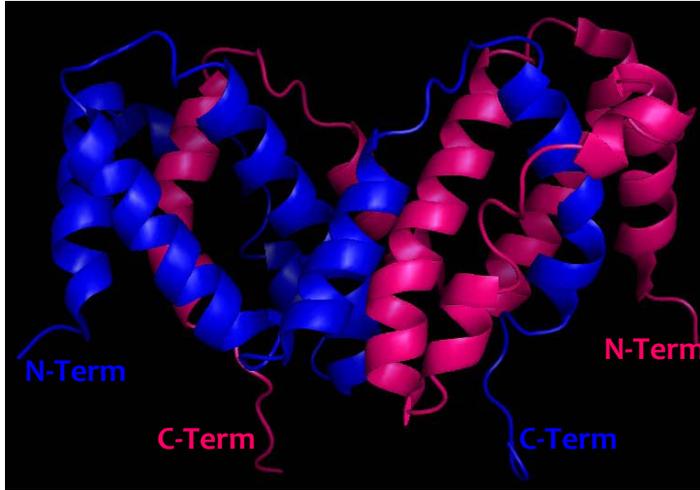
L'interféron a été découvert par Isaacs et Lindenmann en 1957. Ils observèrent que certaines cultures cellulaires, infectées par un virus, étaient capables de produire une protéine qui les rendait résistantes aux infections virales. Depuis 1980, les interférons ont été divisés en 2 types différents par le comité international de nomenclature: type I (IFN- α , β , ω) et type II (IFN- γ). Ils ont en commun une activité anti-virale. Toutefois, l'IFN- γ a surtout des propriétés immunomodulatrices. Les travaux de Wheelock en 1965, initiés une année auparavant par ceux de Gresser et Naficy, ont permis de définir le facteur activateur de macrophage (MAF) en tant qu'interféron (Gresser and Naficy, 1964 ; Wheelock, 1965). *In-vivo*, l'IFN- γ est produit par les cellules du système immunitaire : les lymphocytes T de type 1 (CD4⁺), les lymphocytes cytotoxiques (CD8⁺), les cellules tueuses naturelles (NK), les lymphocytes B, les cellules présentatrices d'antigènes.

5.2. Structure protéique

Chez l'homme, l'interféron- γ est porté par le chromosome 12. Les travaux de Bureau *et al.* ont plus précisément localisé le gène de l'IFN- γ humain sur la bande 12q25 (Bureau *et al.*, 1995). Le gène de l'IFN- γ a une taille de 6 kb et contient trois introns et quatre exons codant pour un polypeptide de 166 acides aminés. Un peptide signal de 23 acides aminés est clivé dans le RE, générant ainsi une protéine comportant 143 résidus (Devos *et al.*, 1982). Son extrémité N-terminale est bloquée par un résidu glutamine sous forme de pyroglutamate (Rinderknecht *et al.*, 1984). L'extrémité C-terminale peut être partiellement clivée de plusieurs acides aminés avant sécrétion (Curling *et al.*, 1990). La séquence de l'ADNc codant l'IFN- γ humain a une taille de 1,2 kb et a été clonée pour la première fois en 1982 (Gray *et al.*, 1982). La masse moléculaire de la protéine établie sur la base de la structure primaire est théoriquement de 17,1 kDa. En 1991, Ealick *et al.* ont établi la structure tridimensionnelle de l'IFN- γ (Ealick *et al.*, 1991). L'IFN- γ est constitué de deux monomères identiques. Ces deux polypeptides sont agencés tête-bêche de sorte que l'extrémité N-terminale d'un monomère est située à proximité de l'extrémité C-terminale du second. Chaque monomère est constitué de six hélices α reliées par plusieurs boucles et une séquence C-terminale (acides aminés 124 à 143) (Ealick *et al.*, 1991 ; Figure 28). Cette région C-terminale de l'IFN- γ contient deux domaines d'acides aminés basiques (domaine 1 : 125-131 et domaine 2 : 137-140) qui confèrent à la

cytokine une grande sensibilité aux attaques protéolytiques (cf. paragraphe 3.2.3 de la synthèse bibliographique).

Il n'apparaît pas de feuillet β . L'IFN- γ humain ne possède pas de cystéine, ce qui exclut toute conformation tertiaire liée à des ponts disulfures. Sous forme cristalline et non glycosylée,



l'IFN- γ est un homodimère de 34 kDa stabilisé par des liaisons non covalentes et par l'imbrication entre les hélices α des deux monomères. Chaque monomère possède deux sites de glycosylation sur les résidus asparagines en position 25 et 97. L'IFN- γ est donc une glycoprotéine homodimérique.

Figure 28 : Structure cristallographique de l'homodimère d'IFN- γ (une couleur par monomère) (d'après Thiel *et al.*, 2000).

5.3. Principales activités biologiques

L'IFN- γ , comme beaucoup d'autres cytokines, a de nombreuses fonctions et est capable de réguler et moduler plus de 200 gènes distincts (Boehm *et al.*, 1997). Il joue un rôle essentiel dans la régulation des différents stades de la réponse immune par ses propriétés antivirales, antiprolifératives et immunomodulatrices. Il participe également à la régulation de diverses protéines de la MEC.

5.3.1. Principales activités *in-vitro*

L'une des activités les plus étudiées de l'IFN- γ est l'induction des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (HLA-DR) sur de nombreux types cellulaires. De façon beaucoup plus sporadique, l'IFN- γ est capable d'induire les antigènes des molécules de classe I. Les cellules exprimant ces molécules vont ainsi être des cibles facilement identifiables pour les lymphocytes T cytotoxiques. De plus, l'activité pro-inflammatoire a également été montrée *in-vitro*. En effet, l'IFN- γ permet d'augmenter l'expression des récepteurs Fc γ RI des phagocytes et des neutrophiles. Par ailleurs, l'activité

anti-virale a également été étudiée *in-vitro*. L'IFN- γ est capable d'induire chez les cellules un état de résistance aux infections virales. Enfin, l'IFN- γ permet de potentialiser la chaîne respiratoire des macrophages. Cette activité permet d'augmenter la production d'ions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) ou d'espèces réactives de l'oxygène (H_2O_2) (Nathan *et al.*, 1983).

5.3.2. Principales activités *in-vivo*

Différentes études *in-vivo* ont été effectuées pour l'identification du rôle joué par l'IFN- γ dans les maladies infectieuses. Il a notamment été montré que l'induction de macrophages par l'IFN- γ permet de protéger l'organisme vis-à-vis de bactéries telles que *Listeria* (Peck, 1989) ou *Salmonella* (Kagaya *et al.*, 1989). En outre, des souris déficientes en IFN- γ ne peuvent survivre à une infection par *Mycobacterium tuberculosis*.

Concernant l'activité anti-virale de l'IFN- γ , il a, en particulier, été montré que l'apport en IFN- γ permet aux souris et aux rats de combattre une infection expérimentale par le cytomegalovirus ou CMV (Fennie *et al.*, 1988; Haagmans *et al.*, 1994) ou par le MHV (Mouse Hepatitis Virus) (Lucchiari *et al.*, 1991). Toutefois, au regard de ces modèles expérimentaux, il est difficile d'être catégorique quant à savoir s'il s'agit d'une activité anti-virale ou immunomodulatrice de l'IFN- γ .

Enfin, des études sur des souris déficientes STAT-1 (facteur de transcription du récepteur de l'IFN- γ) ont montré le rôle important que semble jouer l'IFN- γ pour éviter ou réduire la propagation de tumeurs (Billiau and Vandebroek, 2001).

5.4. Rôle et utilisation thérapeutique

Les applications de l'IFN- γ couvrent plusieurs domaines. Il peut être utilisé en tant que prophylaxie ou pour des applications thérapeutiques. Les résultats les plus probants sont obtenus dans le traitement de pathologies parasitaires et bactériennes (leishmaniose, toxoplasmose, lèpre, salmonellose, listériose). L'IFN- γ est également un facteur clef pour la stimulation du système immunitaire chez les patients immunodéprimés (Lewis and Wilson, 1990). Il est également utilisé pour combattre des pathologies cancéreuses dont celle du poumon (Jett *et al.*, 1994).

L'IFN- γ est actuellement commercialisé sous le nom d'Actimmune par la société Genentech et d'Imukin par la société Boehringer Ingelheim. Dans les deux cas, il est produit chez *E. coli*

et est, par conséquent, non glycosylé. Bien que faisant l'objet de nombreuses études pharmacologiques et cliniques, en particulier dans le cadre de la mise au point et du développement de thérapies anti-cancéreuses, les applications thérapeutiques de l'IFN- γ recombinant sont à l'heure actuelle limitées à deux maladies, l'ostéoporose et la maladie granulomateuse chronique (Vilcek and Feldmann, 2004).

Lorsqu'il est produit par des cellules CHO, des travaux ont montré que l'IFN- γ est susceptible d'inhiber la synthèse protéique (Tomlinson, 1991). En outre, l'IFN- γ intracellulaire peut également affecter la croissance cellulaire en absence de récepteurs spécifiques (Fidler *et al.*, 1985 ; Sanceau *et al.*, 1987).

5.5. Protéolyse de l'IFN- γ recombinant produit par les cellules CHO

La protéolyse de l'IFN- γ produit au cours de cultures de cellules CHO en présence ou non de sérum a été rapportée dans de nombreuses études depuis les années 90. Toutefois, aucun consensus n'a pu être clairement établi quant à l'identification de la ou des activités protéasiques(s) responsable(s) de la protéolyse de l'IFN- γ .

5.5.1. Cultures de cellules CHO en présence de sérum

La production, à partir de cellules CHO, d'IFN- γ de structure primaire clivée a été décrite à partir de 1987 (Curling *et al.*, 1990; Dijkmans *et al.*, 1987; James *et al.*, 1996). D'après leurs travaux, le clivage de la protéine a lieu avant, pendant ou juste après la sécrétion de la protéine sur au moins 2 sites potentiels.

Une endoprotéase appelée furine est capable de cliver une séquence « (Lys/Arg)-X-(Lys/Arg)-Arg » positionnée du côté C-terminal (Watanabe *et al.*, 1992). Le clivage de la structure primaire de l'IFN- γ produit par des cellules CHO 320 a été établi pour des cultures réalisées en présence de sérum (Castro *et al.*, 1995). En revanche, ces mêmes auteurs n'ont identifié aucune hétérogénéité de structure primaire lors de cultures sans sérum. Castro *et al.* (1995) avancent l'hypothèse selon laquelle la protéine sécrétée serait soumise à l'attaque de protéases présentes initialement dans le sérum. Cependant, l'incubation pendant 48 h à 37°C de surnageant provenant de la culture effectuée dans le milieu sans sérum avec un volume égal de sérum n'a pas permis de mettre en évidence la protéolyse de l'IFN- γ . En outre, les travaux de Teige *et al.* (1994) ont montré que la présence de sérum dans le milieu de culture n'induit pas obligatoirement la dégradation protéolytique des protéines sécrétées (Teige *et al.*,

1994). Ainsi, ces auteurs ont détecté une protéolyse partielle de l'antithrombine III recombinante produite chez BHK uniquement lors de cultures sans sérum, l'intégrité de la protéine n'étant pas altérée en culture avec sérum (10%).

Les travaux de Lamotte ont également montré une protéolyse de l'IFN- γ lors de cultures réalisées en présence de sérum (Lamotte, 1997). En revanche, en l'absence de sérum dans le milieu RPMI, aucune protéolyse de l'IFN- γ n'a été observée. Dans sa thèse, les deux hypothèses suivantes sont retenues:

- ✓ l'IFN- γ présente une séquence alanine-proline en position 122-123. Or, une enzyme membranaire externe appelée dipeptidyl aminopeptidase, identifiée chez de nombreux types de cellules, clive spécifiquement la séquence alanine-proline (McDonald and Barrett, 1986). La séquence alanine-proline n'est pas impliquée dans une hélice alpha et son orientation permet un accès aisé à une telle protéase. Ainsi, l'action de l'enzyme pourrait libérer un peptide composé de 21 acides aminés ayant une masse moléculaire de 2,4 kDa.
- ✓ l'IFN- γ présente une séquence Lys-Arg-Lys-Arg en position 128 à 131. Or, une endoprotéase déjà citée précédemment et appelée furine a été identifiée chez plusieurs types de cellules animales (Smeekens, 1993) et en particulier chez les cellules CHO (Hatsuzawa *et al.*, 1992). Ainsi, un peptide d'environ 2 kDa pourrait être libéré et expliquer la présence des deux masses moléculaires pour l'IFN- γ non glycosylé sur gel SDS.

Différents auteurs ont montré que la région C-terminale de l'IFN- γ contient deux domaines d'acides aminés basiques (D1 : 125-131 et D2 : 137-140) conférant à la cytokine une grande sensibilité aux attaques protéolytiques (Curling *et al.*, 1990 ; Dobeli *et al.*, 1988 ; Trinchieri and Perussia, 1985). Ces domaines semblent jouer un rôle important dans l'activité de la protéine (Nacheva *et al.*, 2003). En effet, ces derniers ont montré que la suppression de 3 à 9 premiers acides aminés de la région C-terminal permettait d'augmenter l'activité anti-virale et l'activité immunomodulatrice de l'IFN- γ d'un facteur 10. En revanche, la suppression de plus de 9 acides aminés (la suppression jusqu'à 27 acides aminés a été étudiée) conduit à une diminution d'un facteur 10 des 2 activités biologiques précédemment citées. Selon d'autres auteurs, la suppression de 13 acides aminés (Arakawa *et al.*, 1986a) et de 15 acides aminés (Arakawa *et al.*, 1989) du côté C-terminal conduit à une activité anti-virale réduite d'un facteur 1000.

D'autres études ont montré que l'activité biologique de l'IFN- γ ainsi que sa fixation à son récepteur sont réduites lorsque l'extrémité C-terminale n'est pas intacte (suppression des

acides aminés Lys¹³⁰ – Arg¹³¹ – Ser¹³²) (Lundell *et al.*, 1991). Ainsi, la protéolyse de l'IFN- γ n'est pas sans conséquence pour l'activité biologique de l'IFN- γ .

5.5.2. Cultures de cellules CHO en absence de sérum

Lors de cultures sans sérum, l'inhibiteur de protéases (BSA) d'ordinaire présent dans le sérum, ne peut donc pas protéger la protéine recombinante contre des protéolyses endogènes.

Les travaux de Mols *et al.* (2005) ont été effectués à partir de cultures en suspension de cellules CHO 320 exprimant l'IFN- γ recombinant humain et avec 3 milieux différents :

- ✓ un milieu avec sérum
- ✓ un milieu sans sérum avec peptones végétales
- ✓ un milieu sans sérum avec peptones végétales (autre fournisseur de peptones)

Leurs travaux ont montré l'expression d'au moins 2 membres des métalloprotéases (MMP), l'une à la surface cellulaire (pro-MMP-14 et MMP14), l'autre sécrétée (pro-MMP-9) (Mols *et al.*, 2005).

Par zymographie, ils ont également identifié des bandes pouvant correspondre aux protéases à sérine suivantes :

- ✓ t-PA ou u-PA associé avec un membre du PAI (107 kDa),
- ✓ t-PA (63 kDa)
- ✓ HMW u-PA (52 kDa)
- ✓ LMW u-PA (32 kDa)
- ✓ un fragment du LMW u-PA (21 kDa).

Par ailleurs, l'activité de 2 protéases à sérine membranaires, une dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) et une tripeptidyl peptidase II (TPPII), a été mesurée à la surface des cellules CHO viables.

Selon leurs travaux, il est possible mais peu probable que la dégradation partielle de l'IFN- γ soit liée à la MMP-9, la MMP-14, le t-PA, l'u-PA ou encore la TPPII. En effet, les activités de ces protéases sont probablement très faibles en raison de:

- ✓ leur expression sous forme zymogène (pro-MMP-9 et pro-MMP-14) et de la présence de leurs inhibiteurs (TIMP-1 et TIMP-2),
- ✓ la présence de l'inhibiteur (PAI) du t-PA et de l'u-PA,
- ✓ la diminution au cours de la culture de l'activité des protéases DPPIV et TPPII et de l'inhibition de la TPPII par les peptones végétales.

Satoh *et al.* (1990) ont montré la présence de 2 types de protéases au cours de cultures de cellules CHO, à savoir une exoprotéase et une endoprotéase (Satoh *et al.*, 1990). L'activité de l'exoprotéase augmente au cours de la culture, parallèlement au nombre croissant de cellules mortes. En revanche, l'endoprotéase, ayant une activité protéase à cystéine, est sécrétée tout au long de la culture par les cellules viables.

D'après Goldman *et al.*, l'IFN- γ est soumis à l'action d'une endoprotéase non identifiée dès le début de la culture (Goldman *et al.*, 1997). Cette dernière cliverait l'IFN- γ au niveau de la glutamine 133, relarguant de cette façon un peptide de 10 acides aminés. Par ailleurs, en fin de culture, les cellules mortes relarguent dans le surnageant des carboxypeptidases et des protéases à sérine. Ces dernières clivent l'IFN- γ au niveau de la séquence Lys 130 – Arg 131 – Ser 132. Or cette région Lys-Arg-Ser joue un rôle particulièrement important dans l'activité biologique de l'IFN- γ . Ainsi, l'IFN- γ produit en début de culture aurait une activité biologique supérieure à celle de l'IFN- γ sécrété en fin de culture.

Comme décrit dans le paragraphe 3.1, l'hétérogénéité de structure des protéines peut être liée à une infidélité de transcription. Cette dernière n'a malheureusement pas pu être déterminée pour l'IFN- γ en raison d'un nombre insuffisant d'ESTs répertorié (n = 22).

La Figure 29 synthétise les différents sites de l'IFN- γ pouvant potentiellement être clivés par des protéases excrétées ou libérées par les cellules CHO.

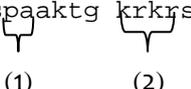
Travaux de McDonald (1986), Smeekens (1993) et Hatsukawa (1992)

1 site potentiel de protéolyse par l'enzyme membranaire externe appelée dipeptidyl aminopeptidase (1) et 1 site par l'endoprotéase appelée furine (2)

```

1 mkytsyilaf qlcivlgslg cycqdpvyke aenlkkyfna ghsdvdnngt lflgilknwk
61 eesdrkimqs qivsfyfklf knfkddqsiq ksvetikedm nvkffnsnkk krddfekltn
121 ysvtdlnvqr kaiheliqvm aelspaaktg krkrsqmlfr grrasq

```



(1) (2)

Travaux de Goldman (1997)

1 site potentiel pour des carboxypeptidases et des protéases à sérine (3) et 1 site potentiel de protéolyse pour une endoprotéase non identifiée (4)

```

1 mkytsyilaf qlcivlgslg cycqdpvyke aenlkkyfna ghsdvdnngt lflgilknwk
61 eesdrkimqs qivsfyfklf knfkddqsiq ksvetikedm nvkffnsnkk krddfekltn
121 ysvtdlnvqr kaiheliqvm aelspaaktg krkrsqmlfr grrasq

```



(3)(4)

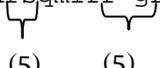
Travaux de Mols (2005)

2 sites potentiels de protéolyse par le t-PA ou u-PA (5)

```

1 mkytsyilaf qlcivlgslg cycqdpvyke aenlkkyfna ghsdvdnngt lflgilknwk
61 eesdrkimqs qivsfyfklf knfkddqsiq ksvetikedm nvkffnsnkk krddfekltn
121 ysvtdlnvqr kaiheliqvm aelspaaktg krkrsqmlfr grrasq

```



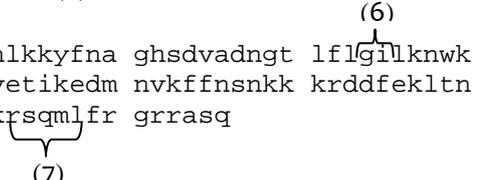
(5) (5)

2 sites potentiels de protéolyse par les MMP-9 (6) et MMP14 (7)

```

1 mkytsyilaf qlcivlgslg cycqdpvyke aenlkkyfna ghsdvdnngt lflgilknwk
61 eesdrkimqs qivsfyfklf knfkddqsiq ksvetikedm nvkffnsnkk krddfekltn
121 ysvtdlnvqr kaiheliqvm aelspaaktg krkrsqmlfr grrasq

```



(6) (7)

Figure 29 : Synthèse des différents sites potentiels de clivage au sein de la structure primaire de l'IFN- γ (séquence grisée = peptide signal de 23 acides aminés de l'IFN- γ).

5.6. Rôle des glycanes de l'IFN- γ

L'IFN- γ naturel ou produit par les cellules eucaryotes possède 2 sites de *N*-glycosylation potentiels situés sur les asparagines en position 25 et 97. Trois macro-glycoformes de l'IFN- γ sont donc possibles. Les molécules d'IFN- γ peuvent être glycosylées sur deux sites (glycoforme 2N), sur un site (glycoforme 1N) et sur aucun site (glycoforme 0N) (Curling *et al.*, 1990). Dans le cas de la glycoforme 1N, c'est l'Asn 25 qui est glycosylée dans 95% des cas (James *et al.*, 1995).

5.6.1. A l'échelle de la macrohétérogénéité de la glycosylation

L'occupation du site Asn 25 de l'IFN- γ par un oligosaccharide favorise sa dimérisation, sa sécrétion (Sareneva *et al.*, 1994) et sa résistance aux protéases (Sareneva *et al.*, 1995). Par ailleurs, la glycosylation de l'IFN- γ permet également d'augmenter sa durée de demi-vie ; il a été montré qu'un interféron non glycosylé est éliminé plus rapidement de la circulation sanguine que l'IFN- γ naturel qui présente les 3 glycoformes (Bocci *et al.*, 1985 ; Sareneva *et al.*, 1993). Enfin, l'IFN- γ naturel glycosylé est moins immunogène que l'IFN- γ non glycosylé produit chez *E. coli* (Meager and Leist, 1986). En revanche, l'activité anti-virale *in-vitro* de l'IFN- γ non-glycosylé et celle de l'IFN- γ glycosylé sont similaires (Sareneva *et al.*, 1994).

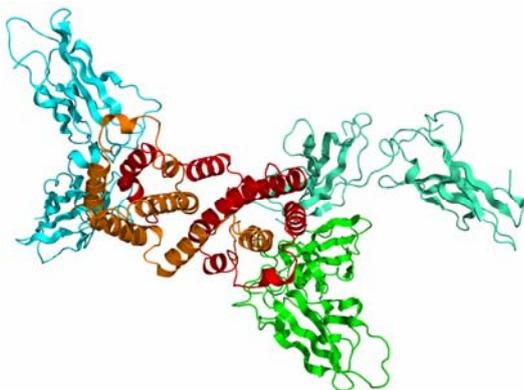
5.6.2. A l'échelle de la microhétérogénéité de la glycosylation

Les lignées de cellules de hamster CHO et BHK ne possèdent pas l'enzyme α 2,6-sialyltransférase (Lee *et al.*, 1989). En conséquence, les acides sialiques sont liés en position α 2,3 aux résidus de galactose chez les protéines exprimées dans ces systèmes. Les techniques du génie génétique permettent l'expression de certaines glycosyltransférases. Ainsi, contrairement à la lignée CHO 320, la lignée C5 a été transfectée par l' α 2,6 sialyltransférase de rat et elle peut donc sialyler les galactoses en position 3 ou 6, autrement dit comme chez l'homme. Il a été montré que la sialylation en α 2,6 permet d'augmenter les qualités pharmacocinétiques de l'IFN- γ (Bragonzi *et al.*, 2000). Par ailleurs, une hypersialylation de l'IFN- γ permet d'augmenter le temps de demi-vie de la protéine (Sareneva *et al.*, 1993).

5.7. Le récepteur membranaire de signalisation de l'IFN- γ : IFN- γ R

Le récepteur de l'IFN- γ (IFN- γ R) est exprimé sur une très grande majorité des cellules (Schroder *et al.*, 2004). Entre 500 et 20 000 récepteurs de l'IFN- γ par cellule peuvent être exprimés en fonction du type cellulaire et des conditions microenvironnementales. L'IFN- γ R est composé de deux sous-unités : les chaînes polypeptidiques α et β . L'IFN- γ R est une protéine glycosylée. Les glycannes permettraient d'apporter au récepteur une plus grande stabilité ; il est peu probable qu'ils aient un rôle dans l'interaction entre l'IFN- γ et l'IFN- γ R (Van Loon *et al.*, 1991). Par ailleurs, il a été montré que la glycosylation de l'IFN- γ R ne permet pas de protéger le récepteur ni contre la protéolyse ni contre la dénaturation par la chaleur (Fountoulakis and Gentz, 1992b).

L'affinité de l'IFN- γ pour son récepteur est de l'ordre de la nanomolaire. L'interaction de l'IFN- γ avec son récepteur met en jeu un IFN- γ dimérique et deux hétérodimères d'IFN- γ R(α/β) (Fountoulakis *et al.*, 1992a). Lundell *et al.* (1994) ont montré que trois régions de l'IFN- γ R sont nécessaires pour assurer l'interaction avec l'IFN- γ (Lundell and Narula, 1994):



- ✓ boucle entre les deux premières hélices alpha (résidus 18-26),
- ✓ séquence de l'hélice F (résidus 108-124),
- ✓ courte section de la région C-terminale (résidus 128-131).

Figure 30 : Structure cristallographique du complexe entre l'IFN- γ et la partie soluble de la chaîne α du récepteur à IFN- γ .

L'interaction de l'IFN- γ avec deux IFN- γ R α est présentée sur la Figure 30. Les chaînes polypeptidiques de l'IFN- γ (rouge/orange) et de son récepteur (vert, cyan et vert/cyan) sont différenciées par une couleur différente.

La Figure 31 présente les voies de signalisation de l'IFN- γ . Ces voies aboutissent à l'homodimérisation de STAT-1 α . En s'homodimérisant, elle forme le complexe GAF et traverse la paroi nucléaire pour aller se fixer sur les sites GAS (*IFN- γ activation sequence*) au

niveau des promoteurs des gènes inductibles par l'IFN- γ ce qui permet le déclenchement de plusieurs réponses:

- ✓ l'activation des systèmes enzymatiques interférant avec la synthèse des capsides virales,
- ✓ l'activation des macrophages et de la phagocytose,
- ✓ l'induction des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité,
- ✓ l'activation des cellules NK ou cellules naturelles tueuses,
- ✓ la modulation de la production d'anticorps par les lymphocytes B et T,
- ✓ la régulation de la différenciation cellulaire.

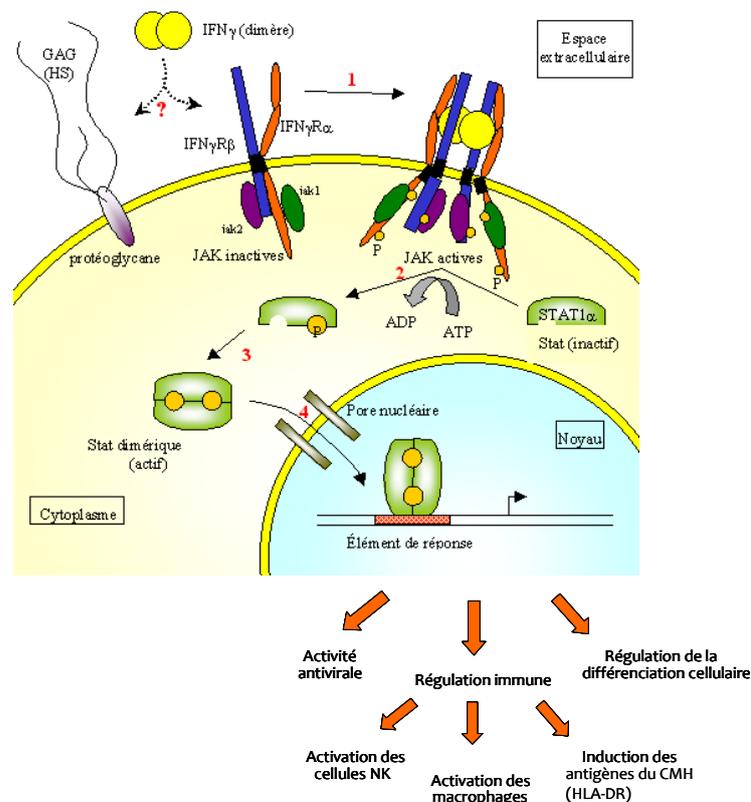


Figure 31 : voie de signalisation de l'IFN- γ . 1 : rapprochement de deux chaînes du récepteur, 2 : phosphorylation réciproque des Janus kinases (JAK) 1 et 2 et phosphorylation des facteurs de transcription STAT-1 α , 3 : homodimérisation de STAT-1 α , 4 : déclenchement des éléments de réponse (adaptée de Sarrazin, 2007)

Comme le présente la Figure 31, l'IFN- γ possède deux ligands, à savoir les protéoglycannes à héparine sulfate (HS) et l'IFN- γ R. Bien que les affinités soient comparables, les protéoglycannes à HS étant très abondants, ils constituent une voie de passage quasiment obligatoire pour l'IFN- γ .

Matériels & Méthodes

Matériels & Méthodes

1. CULTURE CELLULAIRE	- 115 -
1.1. Lignées cellulaires.....	- 115 -
1.1.1. La lignée CHO 320	- 115 -
1.1.2. La lignée THP-1	- 115 -
1.2. Conservation des lignées cellulaires	- 115 -
1.2.1. Constitution des banques de cellules	- 115 -
1.2.2. Congélation des cellules	- 116 -
1.2.3. Décongélation des cellules	- 116 -
1.3. Culture des cellules CHO	- 117 -
1.3.1. Cultures en système statique	- 117 -
1.3.2. Cultures agitées en fioles d'Erlenmeyer.....	- 117 -
1.3.3. Culture en flacon agité de type « <i>spinner</i> »	- 118 -
1.4. Croissance et viabilité cellulaires.....	- 118 -
1.4.1. Cellules viables et bleues (nécrotiques).....	- 118 -
1.4.2. Cellules lysées.....	- 118 -
1.4.3. Cellules apoptotiques	- 120 -
1.5. Milieux de culture.....	- 121 -
2. DOSAGES DES METABOLITES ET DES PRODUITS EXTRACELLULAIRES ...	- 123 -
2.1. Glucose et Lactate	- 123 -
2.2. Glutamine	- 123 -
2.3. Ions ammoniums	- 123 -
2.4. Pyruvate et α -cétoglutarate	- 124 -
3. PRODUCTION ET CARACTERISATION DE L'INTERFERON-γ.....	- 125 -
3.1. Quantification de la production d'IFN- γ par ELISA	- 125 -
3.2. Caractérisation des modifications post-traductionnelles de l'IFN- γ	- 125 -
3.2.1. Analyse de la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ par Western-blot ..	- 125 -
3.2.2. Analyse de la protéolyse par zymographie	- 128 -
3.3. Analyse de l'activité biologique <i>in-vitro</i>	- 129 -
4. CALCUL DES PARAMETRES CINETIQUES	- 131 -
4.1. Paramètres caractéristiques de la croissance cellulaire	- 131 -
4.2. Paramètres caractéristiques des métabolites et des produits.....	- 132 -

MATERIELS ET METHODES

1. Culture cellulaire

1.1. Lignées cellulaires

1.1.1. La lignée CHO 320

La lignée cellulaire CHO 320 a été créée en 1985 par la *Wellcome Foundation Laboratories* (Beckenham, Grande-Bretagne). Elle résulte de la co-transfection de la lignée CHO Dux-B11 dhfr^r des ADNc codant respectivement pour l'IFN- γ humain et la dihydrofolate réductase. L'ADNc codant pour l'IFN- γ a été inséré dans un vecteur plasmidique dérivé du plasmide pSV2-dhfr contenant le promoteur SV40. Les clones ont ensuite été sélectionnés pour leur résistance au méthotrexate suivant la méthode de Page et Sydenham (1991). La lignée CHO 320 a été adaptée à la culture en suspension et en milieu sans sérum (Hayter *et al.*, 1991).

1.1.2. La lignée THP-1

La lignée cellulaire THP-1 est une lignée leucémique monocyttaire humaine. Les cellules THP-1 possèdent à leur surface des récepteurs Fc et C3b, des immunoglobulines cytoplasmiques et peuvent produire de l'IL-1. Dans notre étude, nous avons utilisé cette lignée cellulaire afin de caractériser le taux d'expression des récepteurs HLA-DR induit en présence d'IFN- γ ; l'objectif final étant de déterminer l'efficacité de l'IFN- γ produit au cours de nos différents procédés de production (cf. paragraphe - 129 - du chapitre « Matériels & Méthodes »). Cette lignée cellulaire nous a gracieusement été donnée par le Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB).

1.2. Conservation des lignées cellulaires

1.2.1. Constitution des banques de cellules

De façon à éviter toute dérive propre aux cellules, deux banques de cellules CHO 320 ont été réalisées. Tout d'abord, une banque primaire ou *Master Cell Bank (MCB)* constituée de 10 cryules a été effectuée à partir de cultures de cellules CHO dans du milieu FCS-RPMI avec 3 passages en flacon de Roux puis 2 passages en flacon agité. Ensuite, à partir d'une cryule de la MCB, 10 cryules ont été réalisées dans les mêmes conditions de culture. Ces dernières

constituent la banque de travail ou *Working Cell Bank (WCB)*. Ainsi, les cellules utilisées au cours des 3 années de thèse ont donc été soumises aux mêmes conditions de culture avant leur congélation.

1.2.2. Congélation des cellules

Les lignées cellulaires sont conservées dans l'azote liquide (-196°C). Préalablement à la congélation, 1×10^7 à 2×10^7 cellules sont mises en suspension dans 1 mL de milieu contenant 10% de DMSO (Prolabo). Pour les lignées cultivées dans un milieu avec sérum, le milieu de congélation contient également 20% de sérum de veau foetal (SVF) (Eurobio – réf : CVFSVF00-01 – lot : S31808). En revanche, lorsque les cellules sont cultivées sans sérum, la congélation est réalisée dans un milieu dépourvu de sérum. Les 20% de sérum de veau foetal sont remplacés par 2% de pluronic F-68 (Sigma) (Hernandez and Fisher, 2007). La suspension cellulaire est répartie en tubes cryogéniques de matière plastique (Nunc). La congélation est ensuite réalisée à l'aide de l'appareil Nicool LM 10. Le barème de congélation est le suivant : 25 minutes en position 3 (-11.5°C), 10 minutes en position 10 (-61°C) suivi d'une immersion des tubes cryogéniques pendant une minute dans l'azote liquide (-196°C).

1.2.3. Décongélation des cellules

La décongélation est réalisée en plaçant le tube cryogénique dans un bain-marie thermostaté à 37°C. Après décongélation, le contenu du tube est repris dans 10 mL de milieu de culture. L'ensemble est centrifugé à 800 tr/min pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est remis en suspension dans 10 mL de milieu de culture FCS-RPMI puis placé en flacon de Roux (T75).

Pour les cellules adaptées à la culture en milieu SF-RPMI, les cellules sont reprises dans ce milieu de culture sans sérum après la décongélation.

1.3. Culture des cellules CHO

Toutes les cultures de cellules CHO décrites dans ces travaux de thèse ont été effectuées en mode discontinu.

1.3.1. Cultures en système statique

La lignée CHO 320 peut être propagée de façon adhérente en flacons de Roux. Les flacons de Roux (Greiner) sont ensemencés à raison de $2,5 \times 10^8$ cellules/L puis placés dans un incubateur régulé à 37°C et 5% de CO₂ (réf. IGO150 Cell Life, Jouan ; réf. MCO-20AIC Sanyo). Les flacons de Roux sont munis de bouchons aérés permettant les échanges gazeux. Lorsque la confluence est atteinte, au bout de 48 à 60 heures, le surnageant est éliminé et, pour les cellules adhérentes, le tapis cellulaire est lavé par 5 mL de PBS. Les cellules sont ensuite détachées du support sous l'action d'environ 1 à 3 mL de trypsine (trypsine 0.5 g/L, EDTA 4 Na 0.2 g/L - Invitrogen) et incubées pendant environ 3 minutes à 37°C. L'action de l'enzyme est stoppée par ajout de 10 mL de milieu de culture neuf contenant du sérum de veau foetal. La suspension est alors centrifugée dans une tube conique (800 tr/min, 5 minutes) et le culot cellulaire, repris dans du milieu frais, peut être propagé en flacon de Roux.

1.3.2. Cultures agitées en fioles d'Erlenmeyer

Les cellules adaptées à la culture en suspension ont été propagées en fiole d'Erlenmeyer de polycarbonate de 500 mL (Corning). La densité d'ensemencement est de $2,5 \times 10^8$ cellules/L. Le ciel de la fiole est rempli pendant 1 minute d'un mélange gazeux constitué de 5% de CO₂ et 95% d'air. La fiole est ensuite bouchée et déposée sur une table d'agitation (IKA) de 30 mm d'amplitude placée dans une étuve régulée à 37°C. La vitesse d'agitation est fixée à 70 tr/min. Pour certaines conditions de culture, la vitesse d'agitation a été diminuée à 40 tr/min. Le volume utile de la culture est égal au cinquième de la contenance maximale de la fiole. Après 48 heures de culture, la suspension cellulaire est centrifugée dans un tube conique puis le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu de culture frais pour l'ensemencement de nouvelles fioles ou pour un suivi cinétique.

Avant chaque suivi cinétique, les cultures ont été propagées entre 5 et 7 passages en fioles d'Erlenmeyer. Les pré-cultures ont donc été effectuées en flacon de Roux uniquement pour les deux premiers passages après décongélation.

1.3.3. Culture en flacon agité de type « spinner »

Des flacons agités cylindriques (spinner) (Techne) ont également été utilisés pour les cultures en suspension. Ces flacons, de 250 mL de volume utile, sont en verre borosilicaté et pourvus d'une tige aimantée centrale, dont l'extrémité supérieure est fixée au bouchon. Ils sont placés sur une table d'agitation magnétique (Techne MCS 1045) dont la vitesse est fixée à 40 tr/min. La table est elle-même située dans un incubateur, réglé à 37°C, sous une atmosphère de 5% de CO₂ (Jouan EG 1101R ou Sanyo MCO-20AIC). Les bouchons latéraux des flacons sont légèrement dévissés de façon à permettre les échanges gazeux.

1.4. Croissance et viabilité cellulaires

1.4.1. Cellules viables et bleues (nécrotiques)

Les cellules sont dénombrées par observation microscopique à l'aide d'un hématocytomètre ou cellule de Thoma. Les densités cellulaires présentées dans notre étude résultent de la moyenne obtenue après comptages de six grilles. L'incertitude sur la valeur de la densité cellulaire est de l'ordre de 15% (Nielsen *et al.*, 1991).

La viabilité cellulaire est déterminée par coloration à l'aide d'une solution de bleu trypan (réf. T8154, Sigma). A 900 µL de suspension cellulaire sont ajoutés 100 µL de bleu trypan. Ce colorant pénètre dans les cellules dont l'intégrité membranaire est endommagée et les colore ainsi en bleu. Les cellules bleues sont donc considérées comme mortes (morts visibles), alors que les cellules qui l'excluent sont considérées comme viables.

1.4.2. Cellules lysées

La numération des cellules lysées a été réalisée par une mesure indirecte. En effet, le dosage de l'activité lactate déshydrogénase (LDH) libérée permet de déterminer la concentration des cellules mortes totales. La LDH est une enzyme responsable de la réduction du pyruvate en lactate. Son relargage par les cellules a été largement étudié afin d'estimer la quantité de cellules mortes totales (Bour *et al.*, 1988; Racher *et al.*, 1990; Legrand *et al.*, 1992; Goergen *et al.*, 1993). Les cellules mortes dénombrées par coloration à l'aide d'une solution de bleu trypan relarguent la plupart de leur contenu en LDH intracellulaire. La concentration en cellules lysées a donc été calculée à partir de la différence entre la concentration en cellules mortes

totales obtenues par mesure de l'activité LDH et la concentration en cellules mortes dénombrées au bleu trypan (Figure 32).

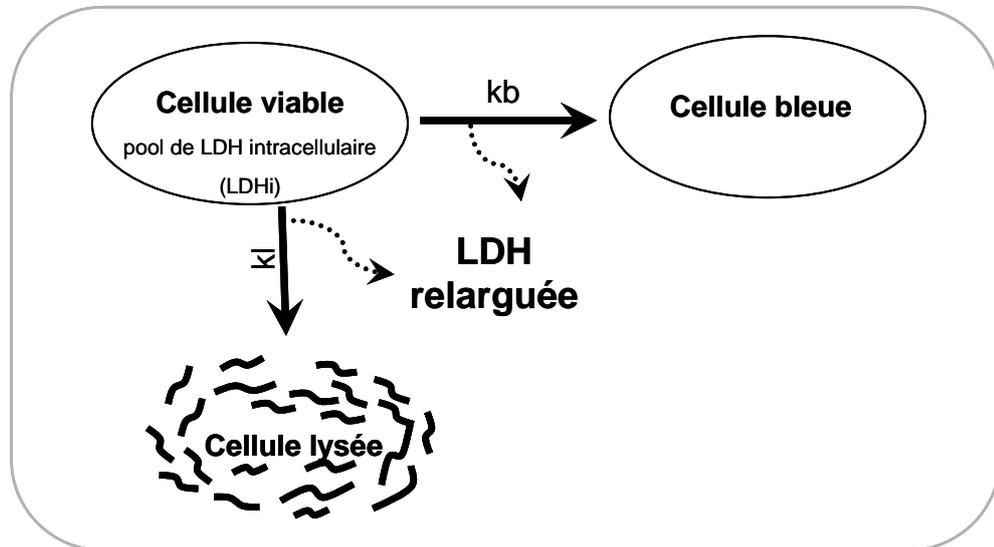


Figure 32 : Représentation schématique du mécanisme de mort cellulaire et du relargage de la LDH.

Le dosage de l'activité LDH a été effectué à l'aide d'un kit enzymatique (LDH PAP réf. LDSL-0420, Ellitech, France) et d'un automate Vitalab Selectra E (Vital Scientific, Pays-bas). L'erreur sur la mesure est de l'ordre de 10%. La détermination au préalable de l'activité LDH intracellulaire par cellule viable est nécessaire puisqu'elle varie en fonction de la lignée cellulaire mais également en fonction des conditions de culture. A partir de la méthode développée par Goergen *et al.* (1993), le contenu intracellulaire en LDH a été déterminé pour les cellules CHO 320 à 2 temps différents de la phase exponentielle de croissance cellulaire et pour différentes conditions de milieux de culture (Goergen *et al.*, 1993). La détermination du contenu intracellulaire en LDH a été réalisée à partir de 10^5 cellules lysées pendant une nuit à 4°C par une solution de Tween-20 (2‰)/PBS.

Le nombre de cellules lysées est ensuite déduit par la formule suivante.

$$C_{\text{lys}} = \frac{LDH_{\text{extra}}}{LDH_{\text{intra}}}$$

C_{lys} : concentration en cellules lysées (cell.ml⁻¹)

LDH_{extra} : activité LDH dans le surnageant de culture (U.ml⁻¹)

LDH_{intra} : activité LDH par cellule (U.cell⁻¹)

1.4.3. Cellules apoptotiques

La caractérisation et la quantification de l'apoptose ont été réalisées par le cytomètre Guava EasyCyte (Guava Technologies, France) à l'aide du kit Guava Nexin®. L'acquisition des résultats a été effectuée sous le module ExpressPro, et leur traitement a été réalisé avec le logiciel Cyflogic™ (CyFlo Ltd, Finlande). Les cellules peuvent diffracter la lumière à différents angles; le capteur correspondant est le FSC (Forward Scatter) placé en face du Laser (petit angle) permettant une analyse de la taille relative des cellules. Les cellules peuvent aussi diffracter le laser, le capteur correspondant est le SSC (Side Scatter) placé à 90° par rapport à l'incidence du laser (grand angle) permettant ainsi une analyse de la granulosité des cellules. Les paramètres de taille et de granulosité cellulaires, FSC et SSC, sont mesurés en mode logarithmique, la population de cellules analysées ayant été définie à partir de cellules témoins viables à 95% afin de ne pas tenir compte des débris cellulaires. Les cellules marquées émettent une fluorescence qui est détectée par des capteurs détectant différentes longueur d'onde en fonction du fluorochrome utilisé. Le kit Guava Nexin® utilise deux marqueurs différents, à savoir l'Annexine-V conjuguée au fluorochrome qu'est la phycoérythrine (PE) et le 7-AAD. L'Annexine-V est une protéine classiquement utilisée pour marquer les cellules en apoptose. Elle se fixe à la phosphatidyl-sérine (PS), un composé normalement uniquement présent sur le feuillet interne de la membrane cellulaire, et externalisé à la surface membranaire lors du processus d'apoptose. Le 7-AAD, un intercalant de l'ADN, est un marqueur exclus des cellules vivantes et des cellules en phase précoce d'apoptose, mais qui est incorporé dans les cellules en phase avancée d'apoptose (apoptose tardive). Les différentes populations cellulaires qui peuvent ainsi être distinguées sont regroupées dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Populations cellulaires analysées dans un mélange grâce aux réactifs du kit d'apoptose Guava Nexin®.

Cellules	Annexine-V	7-AAD
Non apoptotiques	-	-
Apoptose précoce	+	-
Apoptose avancée	+	+

La suspension cellulaire est diluée pour obtenir une concentration finale comprise entre 10^4 et 5×10^5 cellules/ml, puis additionnée par du SVF, afin d'obtenir une concentration de 2% de SVF dans l'échantillon. L'addition de SVF permet de saturer les sites non spécifiques de liaison des marqueurs fluorescents. Préalablement aux analyses d'échantillons de culture, des analyses témoins ont été réalisées par induction de l'apoptose et de la nécrose cellulaire, respectivement par l'actinomycine D ($40 \mu\text{M}$ pendant 48h) et en chauffant à 95°C pendant 5 minutes. Ces inductions ont été effectuées sur des cultures en phase exponentielle. Ces deux témoins ont permis de déterminer les limites des différentes populations cellulaires (Figure 33).

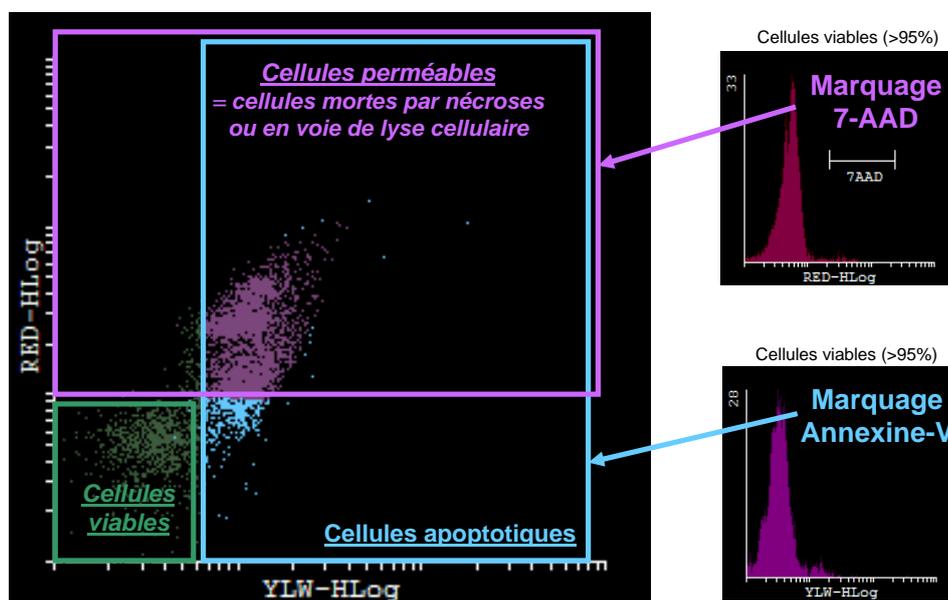


Figure 33 : Quantification de l'apoptose précoce et tardive par cytométrie.

1.5. Milieux de culture

Différents milieux de culture ont été utilisés au cours de notre étude. Les cellules CHO 320 ont été cultivées dans le milieu RPMI (Sigma) supplémenté par 10% de sérum de veau foetal (SVF) (réf. 04-001-AE, ATGC). Le sérum utilisé durant notre étude provient d'un même lot et l'inactivation de potentiels virus dans ce lot de sérum a été effectuée par irradiation aux rayons gamma. Le fournisseur étant dans l'impossibilité de fournir la composition du lot de sérum que nous avons utilisé, celle d'un lot de sérum de veau foetal irradié, commercialisé par Hyclone, est présentée dans le Tableau 19 placé en Annexes. Bien que la composition du

sérum varie d'un lot à l'autre, ce tableau nous permet d'avoir une idée de l'ordre de grandeur des concentrations des composants présents dans le sérum.

Les études cinétiques présentées dans nos travaux ont été réalisées à partir de 3 milieux de culture.

✓ Le milieu BDM (*Basal Defined Medium*) est un milieu sans sérum, sans protéine, dont la composition a été optimisée pour la croissance d'hybridomes (Schneider, 1989). Ce milieu est composé d'un mélange d'IMDM, de Ham's F-12 et de NCTC-135 dans un ratio 5/5/1 (vol/vol/vol). Ce milieu est ensuite supplémenté par 0,1% (m/vol) de pluronic F-68 (réf. P-1300, Sigma), 500 μ M de citrate de fer (réf. 3388, Sigma) et 750 μ M d'éthanolamine (réf. E-0135, Sigma). Les concentrations initiales en glucose (réf. G8769, Sigma) et glutamine (réf. CSTGLU00-0U, Eurobio) sont respectivement de 15 mM et 5 mM.

✓ Le second milieu utilisé est du milieu RPMI-1640 supplémenté avec du sérum (FCS-RPMI). Enfin d'éviter toute variabilité pouvant être engendrée par des lots différents de sérum, le même lot de sérum (réf. CVFSVF00-01, lot n° S31808, Eurobio) a été utilisé tout au long des travaux. Du glucose et de la glutamine sont ajoutés à ce milieu afin d'obtenir des concentrations initiales respectives de 20 mM et 4 mM.

✓ Enfin, le milieu RPMI sans sérum (SF-RPMI) a été formulé. Ce milieu dérive du milieu Roswell Park Memorial Institute auquel sont ajoutés des éléments nutritifs de faible poids moléculaire conformément aux recommandations de Hamilton and Ham, 1977. Les concentrations des éléments nutritifs ajoutés au RPMI ont été optimisées pour la croissance de la lignée CHO 320 (Castro *et al.*, 1992). Les éléments nutritifs ajoutés sont les suivants : albumine bovine sérique, insuline bovine (réf. I1882, Sigma), transferrine humaine (réf. T1147, Sigma), pyruvate de sodium (réf. P5280, Sigma), alanine (réf. A3534, Sigma), putrescine (réf. P5780, Sigma), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (réf. F8633, Sigma), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (réf. Z0251, Sigma) Na_2SeO_3 (réf. S5261, Sigma), CuSO_4 (réf. 61240, Fluka). Du glucose et de la glutamine sont ajoutés à ce milieu afin d'obtenir des concentrations initiales respectives de 20 mM et 4 mM.

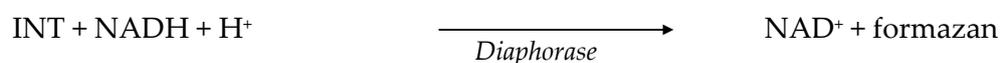
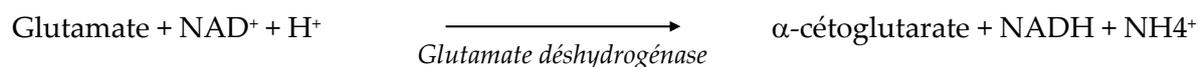
2. Dosages des métabolites et des produits extracellulaires

2.1. Glucose et Lactate

Les dosages du glucose et du lactate ont été réalisés à l'aide des kits enzymatiques (Glucose PAP, ref. GPSL 0500, Elitech, France ; Lactate PAP, ref. 61192, Biomérieux, France) et de l'automate Vitalab Selectra E (Vital Scientific, Pays-bas). L'erreur sur la mesure a été évaluée à moins de 5 %.

2.2. Glutamine

Le dosage est basé sur le dosage de glutamate. Dans un premier temps, la glutamine est transformée en glutamate grâce à une asparaginase (réf. A3809, Sigma). Le glutamate est dosé par méthode enzymatique sur micro-plaque de 96 puits à l'aide du kit de dosage (réf. 139092, Roche, France). Les réactions du dosage du glutamate sont les suivantes :



L'apparition de formazan est détectée à 492 nm par spectrophotométrie (Multiskan MCC/340, Titertek Instruments, Etats-Unis). La concentration en glutamine est déterminée par différence, en dosant, d'une part le glutamate seul, et d'autre part le glutamate et la glutamine après désamination par l'asparaginase. L'erreur sur la mesure est de l'ordre de 10%.

2.3. Ions ammoniums

Le dosage des ions ammoniums est réalisé à l'aide d'une électrode à diffusion gazeuse (Orion, Etats-Unis). En milieu fortement alcalin, les ions ammonium du milieu de culture sont transformés en NH_3 gazeux selon la réaction suivante :



L'équilibre est déplacé vers la formation d'ammoniac par addition de 3 mL de soude 0,2N à 3 mL de l'échantillon à analyser. Le pH final du mélange final est proche de 12. L'ammoniac formé diffuse à travers la membrane perméable de l'électrode et entraîne une variation du potentiel selon la loi de Nernst : $E = E_0 - S \times \log[\text{NH}_3]$, où E_0 est le potentiel de référence (ordonnée à l'origine) (mV) et S est la pente de la courbe d'étalonnage. L'étalonnage est réalisé avec des solutions de NH_4Cl de molarité connue (0,5 à 20 mM) en traçant $\log [\text{NH}_4\text{Cl}]$ en fonction du potentiel de l'électrode (mV). L'erreur sur la mesure est de l'ordre de 10%.

2.4. Pyruvate et α -cétoglutarate

Les acides organiques extracellulaires, pyruvate et α -cétoglutarate, ont été quantifiés par HPLC (Waters, Etats-Unis) à 65°C sur une colonne polypore H (Brownlee Lab.) en utilisant un gradient d'élution isocratique, une solution H_2SO_4 et un détecteur UV réglé à 210 nm.

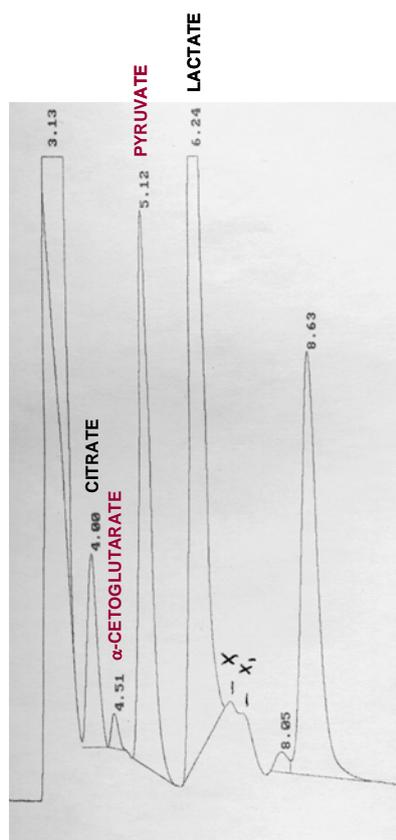


Figure 34 : Exemple d'un chromatogramme de dosage d'acides organiques extracellulaires.

3. Production et caractérisation de l'interféron- γ

3.1. Quantification de la production d'IFN- γ par ELISA

La production d'IFN- γ est déterminée par la méthode ELISA, à l'aide d'un kit commercial (réf. DY285, R&D Systems). L'anticorps polyclonal de souris dirigé contre l'IFN- γ humain recombinant est dilué dans une solution de PBS et fixé durant une nuit au fond d'une microplaque 96 puits (Nunc). Les puits sont ensuite rincés à l'aide d'un tampon de lavage (solution de PBS contenant 0,05% Tween 20 (vol/vol), pH 7.2-7.4). Les sites de fixation non occupés sont saturés durant minimum 1 heure à l'aide d'un tampon de lavage (solution de PBS contenant 1% BSA (m/vol) (FractionV, Sigma) et 0.05% d'azide de sodium (m/vol) (Sigma). Après trois rinçages, échantillons et standards (IFN- γ humain recombinant dont les concentrations sont comprises entre 0 pg/mL et 1000 pg/mL) sont déposés en triplicate dans les puits pour une incubation de 2 heures. La microplaque est rincée trois fois avec le tampon de lavage avant de déposer l'anticorps de chèvre anti-IFN- γ conjugué à la biotine et l'ensemble est incubé pendant 2 heures. Après 3 rinçages, la peroxydase de radis noir (HRP) conjuguée à la streptavidine est ajoutée au complexe anticorps-antigène précédemment formé pour une durée de 20 minutes. Après 3 lavages, le substrat (mélange d'une solution d' H_2O_2 et d'une solution de tétraméthylbenzidine, ratio 1/1, vol/vol) est alors ajouté pour une incubation de 20 minutes. La réaction est stoppée par ajout d' H_2SO_4 2 N et l'absorbance est mesurée à 450 nm sur le spectrophotomètre Multiskan MCC/340 (Titertek) avec une correction de DO à 540 nm. Les échantillons à doser sont dilués au 1/2000 et 1/4000e. L'erreur sur la mesure est de l'ordre de 10%.

3.2. Caractérisation des modifications post-traductionnelles de l'IFN- γ

3.2.1. Analyse de la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ par Western-blot

Les différentes glycoformes de l'IFN- γ humain recombinant présent dans les surnageants de culture sont d'abord séparées en fonction de leur taille sur un gel d'électrophorèse d'après la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). Dans un deuxième temps, les protéines sont transférées sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Amersham Biosciences), puis révélées spécifiquement par immunomarquage (Mols *et al.*, 2003). La méthode de révélation choisie est la chimiluminescence, en raison de sa grande sensibilité, de l'ordre du nanogramme.

❖ Electrophorèse des protéines

Les protéines présentes dans les surnageants de culture sont d'abord séparées en fonction de leur taille sur un gel d'électrophorèse. L'appareil utilisé pour la migration électrophorétique est le XCell Surelock™ Mini-Cell (Invitrogen). Les protéines sont concentrées grâce un gel d'acrylamide de 4%, puis séparées sur un gel d'acrylamide à 12% (NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel, Invitrogen).

Les surnageants issus des cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées dans le milieu FCS-RPMI sont concentrés sur des membranes de filtration possédant un seuil de coupure de 3 kDa (Nanosep 3K, Pall). Ceux issus de culture de cellules CHO 320 cultivées dans les milieux BDM avec ou sans PF-68 sont concentrés avec de l'acétone pendant toute une nuit à -30°C puis centrifugés à 14 000 rpm pendant 20 min et à 4°C. Les surnageants de culture sont ensuite dilués au 1/2 ou entièrement repris dans le tampon de charge (réf. S3401, Sigma) et déposés sur le gel à raison de 12 µL par puits. Afin de vérifier la séparation des protéines et d'estimer la taille de l'IFN-γ analysé, 5 µL du marqueur de taille commercial précoloré (réf. LC5925, SeeBlue® Plus2 Prestained, Invitrogen) ainsi que de l'IFN-γ humain standard non glycosylé (réf. 285-IF, R&D Systems) sont déposés en parallèle sur le même gel de polyacrylamide. La migration se déroule dans un premier temps avec une tension constante de 80 Volts et après environ une demi-heure de migration, la tension imposée est augmentée entre 120 et 150 Volts. La migration se déroule pendant environ 1 heure 30 dans le tampon de migration (250 mM MES, 250 mM Tris, 0,5% SDS et 5 mM EDTA, pH 7).

❖ Transfert sur membrane de PVDF

Le transfert est réalisé en milieu liquide sur l'appareillage Mini-Protean II (Biorad). Avant de réaliser le transfert, la membrane de PVDF (Hybond-P, réf. RPN 2020F, Amersham Biosciences) est incubée 5 minutes dans l'éthanol, rincée brièvement à l'eau distillée puis incubée au moins 5 minutes dans le tampon de transfert (125 mM Trizma-Base, 960 mM Glycine, 0,5% SDS). Les éponges et les papiers filtre Whatman sont également imprégnés de tampon de transfert. Le gel et la membrane sont ensuite mis en sandwich entre les éponges et les papiers filtre. Le schéma du montage est présenté sur la Figure 35.

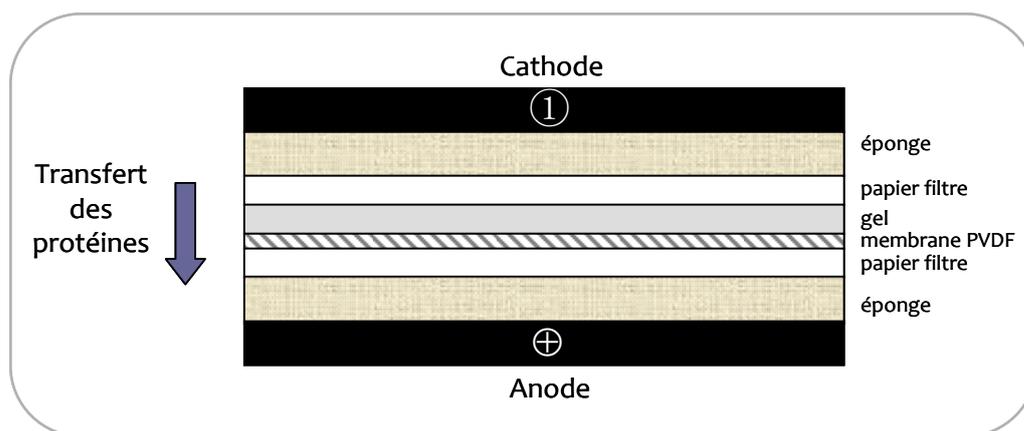


Figure 35: Montage utilisé lors du transfert des protéines sur membrane de PVDF

Le transfert se déroule pendant 45 minutes à intensité constante (350 mA). L'efficacité du transfert est vérifiée grâce à l'utilisation d'un marqueur de taille précoloré transféré sur la membrane dans les mêmes conditions.

❖ Immunomarquage

La membrane est ensuite incubée successivement dans plusieurs bains sous agitation. La membrane est tout d'abord saturée par une solution de lait écrémé à 5% pendant toute la nuit à 4°C. Ensuite, la membrane est incubée pendant 1h30 avec l'anticorps primaire anti-IFN- γ humain (Pierce Endogen). La membrane est alors lavée à trois reprises pendant 10 minutes dans une solution tampon de PBS contenant 0,05% (v/v) de Tween 20 et incubée pendant 1h avec l'anticorps secondaire conjugué à la horseradish peroxydase (immunoglobulines de chèvre dirigées contre des immunoglobulines de lapin, Dako, Danemark). Après trois lavages identiques aux précédents, la révélation est effectuée à l'aide du kit ECL d'Amersham Biosciences. La quantification relative des trois macro-glycoformes est réalisée par analyse densitométrique par le biais du logiciel Bio1D++ (Biorad).

3.2.2. Analyse de la protéolyse par zymographie

La zymographie est une technique de séparation des protéines, basée sur SDS-PAGE ou PAGE, qui inclut un substrat copolymérisé avec le gel de polyacrylamide, pour la détection d'activité enzymatique (Lantz and Ciborowski, 1994). L'étude d'enzymes par SDS-PAGE a pour limite que certaines enzymes ne se renaturent pas après migration et leurs activités ne peuvent être détectées. Cependant, un avantage majeur est l'estimation possible de la masse moléculaire de l'enzyme. La séparation de protéines sur PAGE natif permet la détection de nombreuses activités enzymatiques ; toutefois, l'estimation de la masse moléculaire de l'enzyme n'est pas possible. En effet, sans SDS, des protéines ayant des masses moléculaires similaires migreront différemment à cause de leur différence de charge liée à des points isoélectriques différents. L'ajout de SDS résout ce problème puisqu'en se liant à la protéine et en la dépliant, il lui donne une charge négative.

Dans notre étude, les zymogrammes ont été réalisés sur SDS-PAGE. Les protéines sont concentrées grâce un gel d'acrylamide de 4%, puis séparées sur un gel d'acrylamide à 10% additionné de 0,1% de gélatine ou 0,05% de caséine. La composition du gel de concentration et du gel de séparation est présentée dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Composition des gels de concentration et de séparation utilisés pour la séparation des protéases présentes dans les surnageants de culture.

	Gel de concentration (4%)	Gel de séparation (10%)
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (mL)	-	2,5
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (mL)	2,5	-
H ₂ O (mL)	5,96	2,96
Acrylamide-bisacrylamide 30% (mL)	1,33	3,33
Gélatine 1% ou Caséine 0,5% (ml)	-	1
SDS 10% (µl)	100	100
Persulfate d'ammonium 10% (µL)	100	100
Temed (µL)	10	10

Les surnageants issus des cultures discontinues de cellules CHO 320 sont concentrés 2 fois sur des membranes de filtration possédant un seuil de coupure de 10 kDa (Nanosep 10K, Pall). Les échantillons concentrés sont additionnés de tampon de charge (x3) non dénaturant

sans β -mercaptoéthanol (4,8 ml H₂O ; 1,2 ml Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 ; 2 ml SDS 10% ; 1 ml glycérol ; 0,5 ml bleu de bromophénol 0,5%). Les échantillons ne sont pas chauffés préalablement au chargement sur le gel. Afin de vérifier la séparation des protéines et d'estimer leur taille, 5 μ l du marqueur de taille commercial précoloré (réf. #161-0374, Precision Plus Protein™ Standards, BioRad) sont déposés en parallèle sur le même gel de polyacrylamide. La migration se déroule à une intensité constante (25 mA/gel – tension limite 180V) pendant environ 1 heure dans le tampon de migration (glycine 14,4 g/L, Tris-Base 3 g/L et SDS 1 g/L).

Après migration, les gels sont incubés à 2 reprises pendant 30 minutes à température ambiante et sous agitation dans une solution de triton X-100 2% afin d'éliminer le SDS et permettre la renaturation des protéines. Les gels sont rincés avec de l'eau distillée puis incubés dans le tampon (0,5 M Tris, pH 7,4, 1 μ M Zn²⁺ et 5 mM Ca²⁺) pendant 24 heures à 37°C et sous agitation. Dans certaines conditions, les inhibiteurs suivants ont été ajoutés :

- ✓ Cocktail anti-protéases (Roche, réf. 11 836 170 001) ne contenant pas d'EDTA : inhibiteur des protéases à sérine et à cystéine
- ✓ PMSF (Sigma, réf. P-7626): inhibiteur des protéases à sérine
- ✓ EDTA (Sigma, réf. ED2SS): inhibiteur des métalloprotéases

Après l'incubation, les gels sont rincés avec de l'eau distillée afin d'éliminer les traces de calcium qui pourraient précipiter. Les gels sont ensuite colorés au Bleu de Coomassie pendant au minimum 3 heures, puis décolorés jusqu'à apparition des bandes de dégradation de la gélatine ou caséine témoignant de la présence de protéases.

La présence de la métalloprotéase MMP-9 a été mise en évidence à l'aide d'un anticorps spécifique anti-MMP-9 (réf. AB19016, Millipore) et par Western-blot, selon la méthode décrite dans le paragraphe 3.2.1.

3.3. Analyse de l'activité biologique *in-vitro*

Les cellules THP-1 (10⁵ cellules) sont stimulées par de l'IFN- γ purifié produit par *E.coli* (commercial) ou non purifié produit par les cellules CHO (0-5 ng/mL) en milieu RPMI contenant 10 % SVF. Les cellules sont incubées pendant 72 heures, à 37°C, puis l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (antigènes des leucocytes humains ou HLA-DR) est mesurée par cytométrie (Figure 36). Pour cela, les cellules sont réparties en plaques 96 puits (Nunc), puis transférées en tubes eppendorfs et lavées deux fois en PBS/SVF 2 % (1600 trs/min, 5 min, 4°C). Les anticorps anti-HLA-DR-FITC

(1/10^{ème}, BD Pharmingen) sont incubés avec les cellules en PBS/SVF 2 %, pendant 30 minutes, à 4°C et à l'obscurité. Les cellules sont ensuite lavées deux fois en PBS/SVF 2 % (1600 trs/min, 5 min, 4°C), puis elles sont resuspendues dans 600 µL de PBS/SVF 2 % et transférées en plaques 96 puits (Costar 3596).

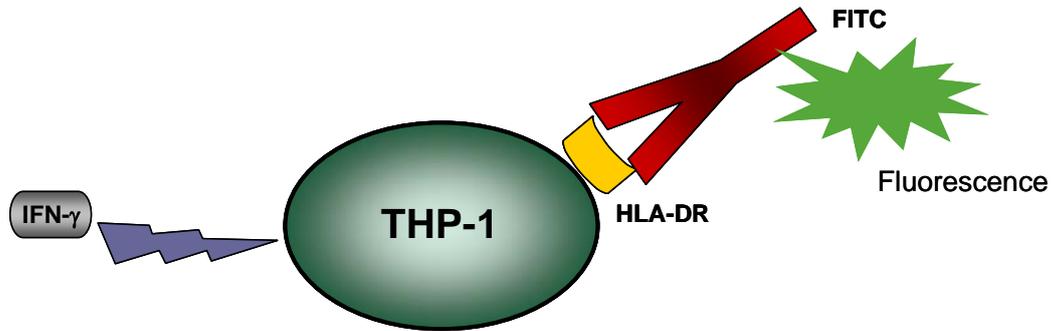


Figure 36 : Schéma de principe du test d'activation des cellules THP-1 par de l'IFN- γ

Les cellules sont analysées par le cytométrie Guava EasyCyte (Guava Technologies, France). L'acquisition des résultats utilise le module Express Pro, et leur traitement est fait avec le logiciel CyflogicTM (CyFlo Ltd, Finlande). A chaque expérience, un témoin négatif est effectué et seuls 3 à 4% de l'ensemble des cellules visualisées par le cytomètre présentent un marquage HLA-DR (Figure 37). Ce témoin négatif permet donc de placer les fenêtres d'analyses et d'éliminer les débris.

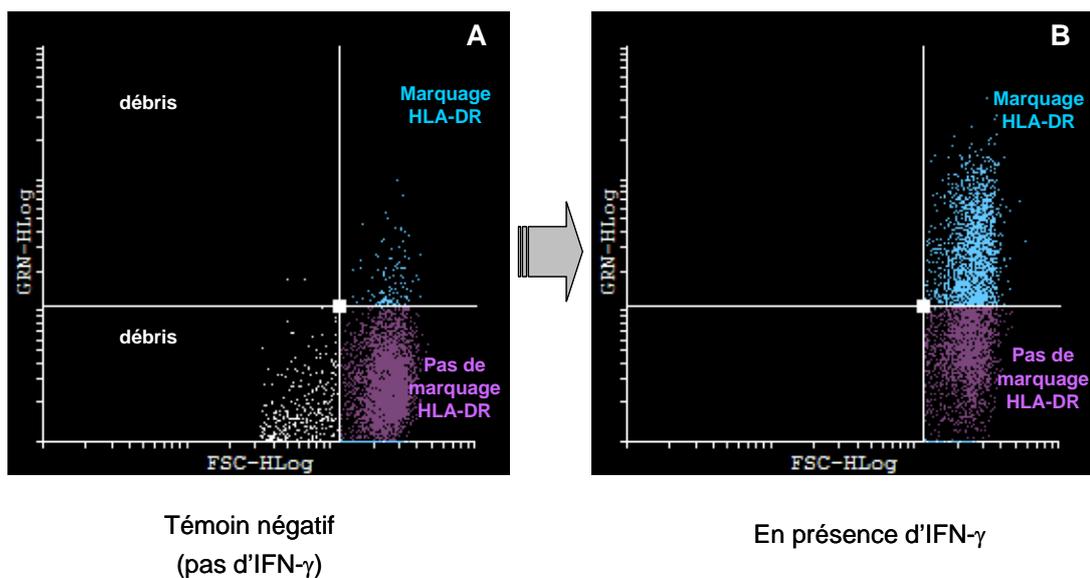


Figure 37 : Quantification de l'activation des cellules THP-1.

4. Calcul des paramètres cinétiques

Les valeurs de comptages et dosages expérimentaux sont lissées et interpolées à l'aide du logiciel Kyplot (KyensLab Inc., Japon) et de la fonction « regression spline ». Les vitesses spécifiques instantanées sont calculées à partir des valeurs lissées en utilisant un pas de 1h. Le détail des calculs de paramètres cinétiques défini ci-après s'applique pour des cultures de cellules réalisées en mode discontinu.

4.1. Paramètres caractéristiques de la croissance cellulaire

On définit r_x et r_d comme étant les vitesses de production et de décès cellulaires, tandis que X_v est la concentration en cellules viables et X_m la concentration en cellules mortes. Les bilans matière sur les différentes formes de la biomasse donnent les relations suivantes :

$$r_x = \frac{dX_v}{dt} + r_d \quad \text{et} \quad r_d = \frac{dX_m}{dt}$$

$\mu_{réel}$ et k_d sont respectivement les vitesses spécifiques de croissance et de décès cellulaires.

Elles sont définies par :

$$\mu_{réel} = \frac{r_x}{X_v} \quad \text{et} \quad k_d = \frac{r_d}{X_v} \quad \text{avec} \quad \mu_{app} = \mu_{réel} - k_d = \left(\frac{1}{X_v} \right) \left(\frac{dX_v}{dt} \right)$$

μ_{app} est définie comme la vitesse spécifique maximale de croissance apparente. Pour l'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire, la vitesse spécifique de croissance apparente a été notée : μ .

$$k_d = k_b + k_L$$

k_b et k_L sont respectivement les vitesses spécifiques de cellules mortes comptées avec le bleu trypan et de cellules mortes par lyse. On considérera que les cellules viables et les cellules bleues (morts visibles) peuvent se lyser.

Elles sont définies par :

$$k_b = \left(\frac{1}{X_v} \right) \left(\frac{dX_b}{dt} \right)$$

$$k_L = \left(\frac{1}{X_v + X_b} \right) \left(\frac{dX_L}{dt} \right)$$

4.2. Paramètres caractéristiques des métabolites et des produits

On définit r_s et r_p comme étant les vitesses de consommation du substrat S et de formation du produit P par unité de volume à un temps t. Les bilans sont définis de la façon suivante:

$$r_s = -\frac{dS}{dt} \text{ et } r_p = \frac{dP}{dt}$$

Les vitesses spécifiques de consommation (ν) et de production (π) sont définies par :

$$\nu = -\left(\frac{1}{X_v} \right) \left(\frac{dS}{dt} \right) \text{ et } \pi = \left(\frac{1}{X_v} \right) \left(\frac{dP}{dt} \right)$$

Les rendements de produit généré par rapport au substrat, $Y_{P/S}$ sont calculés selon les formules suivantes :

$$Y_{P/S} = \left(\frac{P_i - P_{i-1}}{S_{i-1} - S_i} \right)$$

Résultats & Discussion

Résultats & Discussion

1. INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE SUR LA MACROHETEROGENEITE DE LA GLYCOSYLATION DE L'IFN- γ PRODUIT AU COURS DE CULTURES DE CELLULES CHO 320.....- 137 -

1.1. Introduction.....	- 139 -
1.2. Etude cinétique et physiologique des cellules CHO 320 cultivées dans deux milieux de culture différents.....	- 140 -
1.2.1. Cinétiques de croissance et de décès cellulaires	- 141 -
1.2.2. Cinétiques de production d'IFN- γ	- 142 -
1.2.3. Cinétiques de consommation de substrats et de formation de produits.....	- 143 -
1.2.4. Macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ	- 145 -
1.3. Démarche adoptée au cours de notre étude.....	- 146 -

2. INFLUENCE DE DIFFERENTES SUPPLEMENTATIONS DU MILIEU RPMI SUR LA CROISSANCE, LE DECES CELLULAIRE, LE METABOLISME ET LA PRODUCTION DE L'IFN- γ AU COURS DE CULTURES DE CELLULES CHO 320- 149 -

2.1. Introduction.....	- 151 -
2.2. <i>Projet de Publication</i> : Influence de 3 suppléments (citrate de fer, éthanolamine et pluronic F-68) sur les cinétiques de croissance et de décès cellulaires, du métabolisme et de production de l'IFN- γ au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 réalisées avec le milieu RPMI sans sérum.....	- 153 -
2.3. Principales contributions de l'article.....	- 173 -
2.4. Influence de l'apport en fer sur les cinétiques de croissance et de décès cellulaires, du métabolisme et de production de l'IFN- γ lors de cultures discontinues de cellules CHO 320 réalisées avec le milieu FCS-RPMI	- 174 -
2.4.1. Effet de l'ajout du citrate de fer dans le milieu RPMI avec sérum	- 174 -
2.4.1.1. Cinétiques de croissance et de décès cellulaires	- 174 -
2.4.1.2. Cinétiques de production de l'IFN- γ	- 177 -
2.4.1.3. Cinétiques de consommation de substrats et de formation de produits	- 178 -
2.4.2. Effet de différentes formes d'apport en fer au milieu FCS-RPMI.....	- 181 -
2.4.2.1. Cinétiques de croissance et de décès cellulaires	- 181 -
2.4.2.2. Cinétiques de production de l'IFN- γ	- 186 -
2.4.2.3. Cinétiques de consommation de substrats et de formation de produits	- 189 -
2.5. Conclusions du chapitre IV	- 191 -

3. INFLUENCE DE LA MODIFICATION DE LA COMPOSITION DU MILIEU BDM (SUPPRESSIONS/SUPPLEMENTATIONS DE COMPOSES) SUR LA CROISSANCE, LE DECES CELLULAIRE, LE METABOLISME ET LA PRODUCTION DE L'IFN- γ AU COURS DE CULTURES DE CELLULES CHO 320- 197 -

3.1. Introduction.....	- 199 -
3.2. Influence de la suppression de citrate de fer sur les cinétiques de croissance et de décès cellulaires, du métabolisme et de production de l'IFN- γ au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 réalisées avec le milieu BDM.....	- 200 -
3.2.1. Cinétiques de croissance et de décès cellulaires	- 200 -
3.2.2. Cinétiques de production de l'IFN- γ	- 202 -
3.2.3. Cinétiques de consommation de substrats et de formation de produits.....	- 204 -

3.3. Etude cinétique et physiologique des cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM : influence du pluronic F-68	- 209 -
3.3.1. Introduction de l'article.....	- 209 -
3.3.2. <i>Article</i> : Influence du PF-68 sur la croissance cellulaire et le métabolisme et sur la production et la glycosylation de l'IFN- γ produit au cours de cultures de cellules CHO 320 réalisées avec le milieu BDM	- 210 -
3.3.3. Contributions de l'article.....	- 230 -
3.4. Influence de l'apport de sérum et de la suppression du citrate de fer sur les cinétiques de croissance et de décès cellulaires, du métabolisme et de la production de l'IFN- γ au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 réalisées avec le milieu BDM	- 233 -
3.4.1. Cinétiques de croissance et de décès cellulaires	- 233 -
3.4.1.1. Cinétiques de production de l'IFN- γ	- 236 -
3.4.2. Cinétiques de consommation de substrats et de formation de produits.....	- 238 -
3.5. Conclusions du chapitre V	- 242 -
4. INFLUENCE DE LA COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE SUR LA QUALITE DE L'IFN-γ PRODUIT PAR LES CELLULES CHO 320: CARACTERISATION DE L'HETEROGENEITE DE STRUCTURE, DE LA MACROHETEROGENEITE DE LA GLYCOSYLATION ET DE LA RELATION STRUCTURE/ACTIVITE.....	- 243 -
<hr/>	
4.1. Introduction.....	- 245 -
4.2. Macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ	- 246 -
4.2.1. Influence de l'ajout de citrate de fer sur la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ produit au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 effectuées avec le milieu FCS-RPMI	- 246 -
4.2.2. Influence de différentes formes d'apport en fer sur la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ produit au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 effectuées avec le milieu FCS-RPMI.....	- 249 -
4.2.3. Influence de l'ajout de sérum et de la suppression du citrate de fer sur la glycosylation de l'IFN- γ produit au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 effectuées avec le milieu BDM	- 251 -
4.2.4. Influence de la suppression du citrate de fer sur la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ produit au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 effectuées avec le milieu BDM.....	- 254 -
4.3. Conclusions	- 256 -
4.4. Hétérogénéité de la structure primaire de l'IFN- γ	- 258 -
4.4.1. Caractérisation de l'hétérogénéité de la structure primaire de l'IFN- γ par zymographie ..	- 258 -
4.4.1.1. Mise en évidence des activités gélatinase.....	- 258 -
4.4.1.2. Mise en évidence d'activités caséinase	- 263 -
4.4.1.3. Conclusions	- 267 -
4.4.2. Etude de la relation structure/activité de l'IFN- γ	- 269 -
4.4.2.1. Mise au point de la méthode.....	- 269 -
4.4.2.2. Suivis cinétiques de l'activité de l'IFN- γ produit au cours de cultures de cellules CHO 320 effectuées avec le milieu BDM	- 272 -
4.4.2.3. Activité de l'IFN- γ produit par les cellules CHO après traitement enzymatique par la N-Glycosidase F	- 273 -
4.5. Conclusions du chapitre VI.....	- 276 -

Chapitre III : Préambule

Influence du milieu de culture sur la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ produit au cours de cultures de cellules CHO
320

1.1. Introduction

La protéine modèle de notre étude est l'IFN- γ . Cette cytokine apparaît comme un bon modèle puisqu'elle possède deux sites de *N*-glycosylation sur les résidus asparagines 25 (Asn 25) et 97 (Asn 97). Trois glycoformes résultant de la variation d'occupation des sites de glycosylation peuvent être distinguées. On parle alors de macrohétérogénéité. Ainsi, des molécules d'IFN- γ peuvent être glycosylées sur deux sites (glycoforme 2N), sur un site (glycoforme 1N) et sur aucun site (glycoforme 0N) (Rinderknecht *et al.*, 1984). Dans le cas de la glycoforme 1N, c'est l'Asn 25 qui est glycosylée dans 95% des cas (James *et al.*, 1995).

Au cours d'une culture discontinue de cellules CHO, la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ humain recombinant produit par des cellules CHO varie au cours du temps ; la glycoforme 2N étant toujours majoritaire tandis que la glycoforme 0N est minoritaire. En effet, au début du procédé, 80% des molécules d'IFN- γ sont doublement glycosylées, 10 à 15% sont monoglycosylées et 0-5% ne sont pas glycosylées. Lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance, les proportions évoluent progressivement pour atteindre 60% (2N), 20% (1N) et 20% (0N). Ces valeurs se maintiennent pendant la phase de décès cellulaire (Castro *et al.*, 1995; Curling *et al.*, 1990; Goldman *et al.*, 1998; Hayter *et al.*, 1991, Hayter *et al.*, 1992; Kochanowski, 2005; Lamotte, 1997; Xie *et al.*, 1997; Yuk and Wang, 2002). Les conditions de culture peuvent modifier le métabolisme cellulaire, et par conséquent affecter le processus de glycosylation intracellulaire (Goochee and Monica, 1990). En effet, une culture de cellules CHO en chémostat limité en glucose produit de l'IFN- γ doublement glycosylé en proportion inférieure à celle obtenue lors de cultures discontinues de cellules CHO (Hayter *et al.*, 1992). Toutefois, l'addition supplémentaire de glucose et de glutamine au début d'une culture discontinue de cellules CHO ne permet pas de maintenir un profil de glycosylation de l'IFN- γ constant au cours du procédé (Curling *et al.*, 1990; Hayter *et al.*, 1991). D'autres auteurs ont également montré qu'une limitation en glutamine pourrait donner lieu à une diminution du pourcentage de glycoformes 2N de l'IFN- γ produit par les cellules CHO (Castro *et al.*, 1995; Nyberg *et al.*, 1999). Lorsqu'un milieu à base de RPMI est utilisé, la substitution partielle de la fraction V de la BSA, par une préparation commerciale constituée de cholestérol, de phospholides, d'acides gras et de protéines de composition non définie, permet de maintenir un profil constant des différentes macroglycoformes de l'IFN- γ produit par les cellules CHO. L'hypothèse privilégiée est que la présence de lipides oxydés, associés à la fraction V de la BSA, aurait un effet toxique au niveau cellulaire conduisant à l'altération du processus de glycosylation (Jenkins *et al.*, 1994). En revanche, la supplémentation au cours de cultures discontinues de cellules CHO par du

dol-P (100 $\mu\text{g/mL}$) n'a eu aucune influence sur la synthèse des précurseurs oligosaccharidiques et n'a pas empêché le phénomène de sous-glycosylation (Yuk and Wang, 2002). Ainsi, en dépit de ces nombreuses études, les causes de l'évolution de la variation d'occupation des sites de glycosylation de l'IFN- γ produit au cours d'une culture discontinue de cellules CHO n'ont, jusqu'à présent, jamais pu être déterminées avec certitude.

Au cours d'une thèse précédente réalisée au LRGP, Nadine Kochanowski (2005) a montré que la glycoforme 2N de l'IFN- γ produit par les cellules CHO était maintenue constante tout au long de la culture discontinue lorsque le milieu BDM était utilisé, alors qu'avec le milieu RPMI supplémenté par 5% de sérum, une chute de la glycoforme 2N de l'IFN- γ était observée après environ 50 h de culture (Kochanowski, 2005; Kochanowski *et al.*, 2008).

A partir de ces acquis, les travaux présentés dans ce chapitre mettent en évidence les différences physiologiques et cinétiques de cellules CHO productrices d'IFN- γ en fonction des milieux de culture utilisés, BDM et RPMI supplémenté par 5% de sérum, ce dernier étant par la suite dénommé FCS-RPMI. Le milieu BDM contient en particulier des vitamines, des cofacteurs, des précurseurs de nucléotides et des éléments minéraux. La composition finale de ces deux milieux est présentée dans le Tableau 19 de la partie « Annexes ». Pour le milieu supplémenté par 5% de sérum de veau fœtal, le sérum utilisé au cours de ces travaux provient d'un même lot. Excepté pour l'hémoglobine et l'albumine bovine, le fournisseur ayant été dans l'impossibilité de nous fournir la composition exacte de notre lot de sérum, celle d'un lot de sérum de veau fœtal irradié, commercialisé par Hyclone est présentée dans le Tableau 19.

Ainsi, la première partie de ce travail permet de mettre en évidence les principales différences physiologiques et cinétiques obtenues par les cellules CHO en fonction du milieu de culture utilisé : soit le milieu BDM, soit le milieu FCS-RPMI.

1.2. Etude cinétique et physiologique des cellules CHO 320 cultivées dans deux milieux de culture différents

La lignée cellulaire CHO 320 productrice d'IFN- γ a été utilisée au cours de notre étude. Cette lignée a été transfectée avec l'ADNc codant l'IFN- γ humain (Curling *et al.*, 1990). Elle ne possède pas le gène codant l' α -2,6 sialyltransférase. Cette lignée a été adaptée à la culture en suspension dans un milieu RPMI sans sérum (Hayter *et al.*, 1991). De façon à éviter toute dérive propre aux cellules au cours de ces travaux de thèse, une banque de cellules CHO 320 a été effectuée (cf. paragraphe 1.2.1 du chapitre « Matériels & Méthodes »). Les travaux

présentés dans cette étude ont été réalisés à partir de cellules de la banque de travail ou *Working Cell Bank (WCB)*.

1.2.1. Cinétiques de croissance et de décès cellulaires

Les cinétiques de croissance des cellules CHO au cours de cultures discontinues réalisées dans deux milieux de culture différents sont présentées sur la Figure 38. Les milieux utilisés sont le milieu riche BDM dépourvu de protéine et chimiquement défini et le milieu pauvre RPMI supplémenté par 5% de sérum (FCS-RPMI). La densité d'ensemencement de chacune des cultures est voisine de $2,5 \times 10^8$ cellules/L.

Lorsque le milieu BDM est utilisé, les cellules viables atteignent une densité maximale d'environ 30×10^8 cellules/L au bout de 130 h de culture. Pendant cette phase de croissance, la viabilité des cellules est importante puisque les concentrations en cellules mortes (visibles et lysées) sont inférieures à $2,5 \times 10^8$ cellules/L. Avec le milieu FCS-RPMI, la densité cellulaire maximale est en revanche presque deux fois moins élevée (18×10^8 cellules/L) par rapport à celle obtenue avec le milieu BDM.

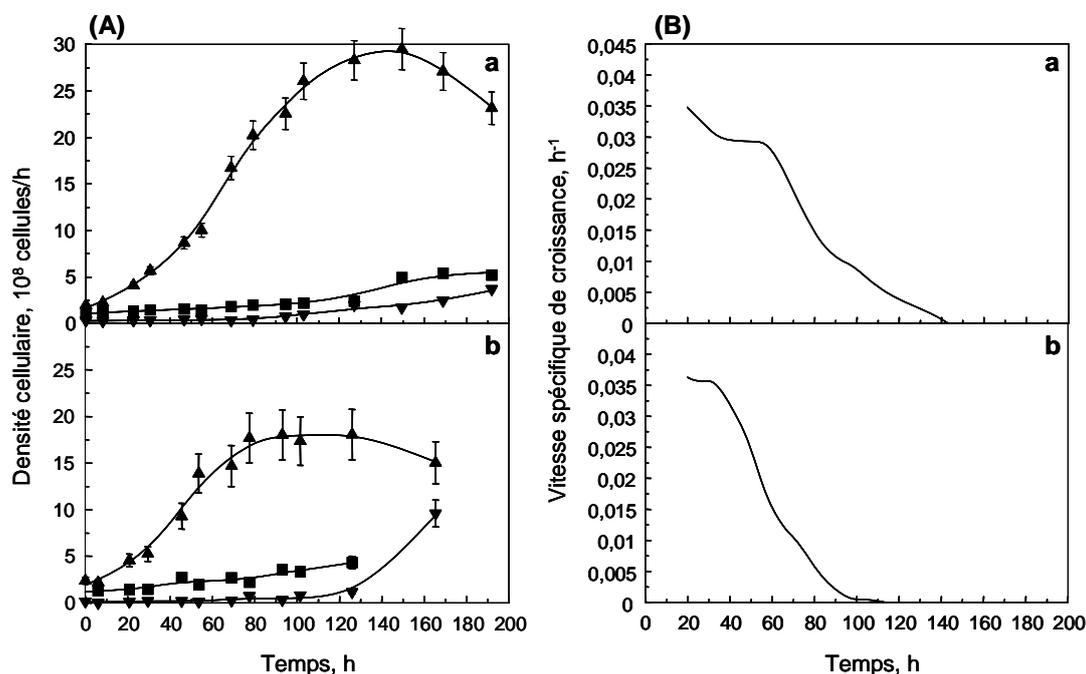


Figure 38 : (A) Cinétiques de croissance (\blacktriangle) et de décès cellulaires (cellules mortes visibles : \blacktriangledown ; cellules mortes lysées : \blacksquare) réalisées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM (a) et avec le milieu FCS-RPMI (b). (B) Vitesses spécifiques de croissance des cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM (a) et avec le milieu FCS-RPMI (b).

Cette densité cellulaire plus importante obtenue dans le milieu BDM est en accord avec les résultats de Nadine Kochanowski (2005). Elle est notamment due au fait que la croissance s'arrête après 100 h de culture dans le milieu FCS-RPMI alors que dans le milieu BDM l'arrêt de la croissance n'est obtenu qu'après 150 h de culture. Avec le milieu FCS-RPMI, une phase stationnaire de croissance des cellules CHO est observable pendant environ 70 h (jusqu'à 150 h de culture). Les vitesses spécifiques de croissance cellulaire maximale (μ_{\max}) sont similaires et proches de $0,035 \text{ h}^{-1}$.

1.2.2. Cinétiques de production d'IFN- γ

La Figure 39 présente les cinétiques de production d'IFN- γ par les cellules CHO au cours des cultures discontinues effectuées dans les deux milieux de culture. Quel que soit le milieu utilisé, la production de l'IFN- γ recombinant est associée à la croissance des cellules CHO.

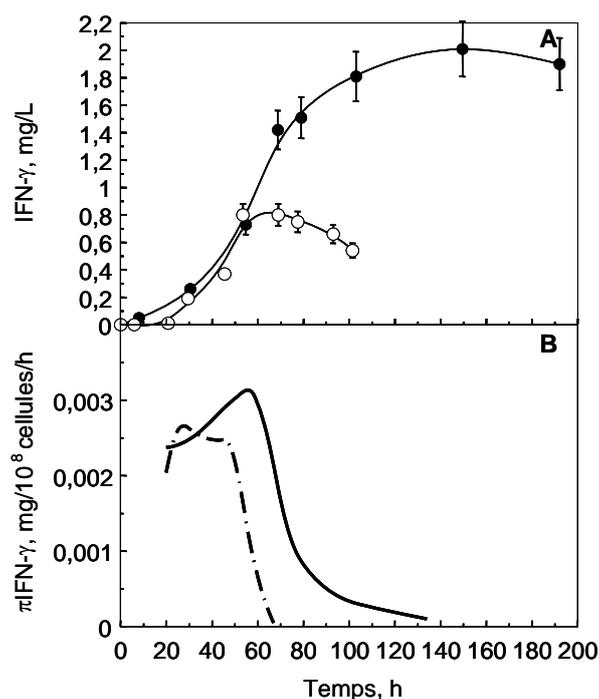


Figure 39 : (A) Cinétiques de production de l'IFN- γ réalisées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM (●) et avec le milieu FCS-RPMI (○). (B) Vitesses spécifiques de production de l'IFN- γ produit par les cellules CHO 320 cultivées dans le milieu BDM (—) et dans le milieu FCS-RPMI (—♦).

Avec le milieu BDM, la production de l'IFN- γ est augmentée d'un facteur 2 pour atteindre une concentration maximale voisine de 2 mg/L. Cette concentration d'IFN- γ plus importante

pour la culture effectuée avec le milieu BDM est donc pour une large part la conséquence d'une densité cellulaire maximale plus élevée obtenue avec ce milieu. En effet, la vitesse spécifique maximale de production de l'IFN- γ par les cellules CHO cultivées avec le milieu BDM n'est que légèrement supérieure à celle obtenue pour la culture effectuée avec le milieu FCS-RPMI (0,003 mg/10⁸ cellules/h *vs.* 0,0025 mg/10⁸ cellules/h), elle semble se maintenir à des valeurs significatives plus longtemps, tout comme la croissance cellulaire.

Par ailleurs, la relation entre la quantité d'IFN- γ produit et la quantité de cellules, au cours des deux cultures discontinues, est présentée sur la Figure 40. Le rendement de production d'IFN- γ ($Y_{\text{IFN}/\text{cellule}}$), exprimé en mg/10⁸ cellules, est plus important avec le milieu BDM (0,08 mg/10⁸ cellules) qu'avec le milieu FCS-RPMI (0,065 mg/10⁸ cellules).

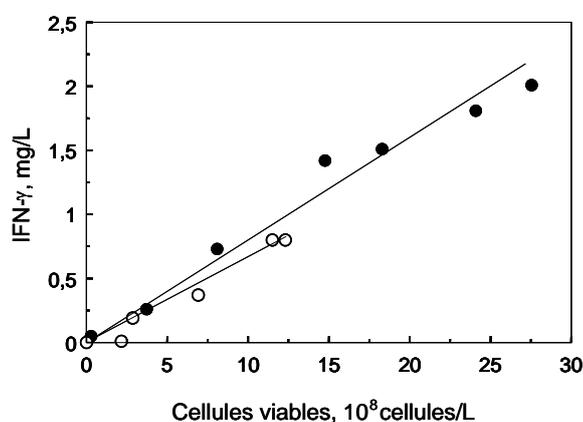


Figure 40 : Relation entre la croissance cellulaire et la concentration d'IFN- γ établie au cours des cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées dans le milieu BDM (●) et dans le milieu FCS-RPMI (○).

1.2.3. Cinétiques de consommation de substrats et de formation de produits

Au cours des cultures effectuées avec les 2 milieux, BDM et FCS-RPMI, les concentrations résiduelles de glucose et de glutamine décroissent parallèlement à la croissance cellulaire (Figure 41). Lors de l'arrêt de la croissance des cellules CHO dans le milieu FCS-RPMI, la concentration résiduelle en glucose est encore de 8 mM. En revanche, l'arrêt de la croissance cellulaire coïncide avec la disparition de la glutamine dans le milieu de culture FCS-RPMI. De façon similaire, avec le milieu BDM, la disparition de la glutamine se produit simultanément à l'arrêt de la croissance cellulaire avec le milieu BDM ; le glucose étant encore présent dans le milieu à une concentration voisine de 4 mM. En conséquence, les concentrations finales en lactate et ions ammonium produits atteignent respectivement des

valeurs de 15 et 5,5 mM pour les cultures effectuées avec le milieu BDM contre 30 et 3,5 mM avec le milieu FCS-RPMI. De telles concentrations ne sont toutefois pas considérées comme toxiques pour les cellules CHO (Hayter *et al.*, 1991; Lao and Toth, 1997).

Il est à noter que l'accumulation de lactate par les cellules CHO est plus importante pour les cultures réalisées avec le milieu FCS-RPMI que pour celles effectuées avec le milieu BDM. En effet, les vitesses spécifiques maximales de consommation du glucose (0,04 mmoles/ 10^8 cellules/h) et de production de lactate (0,06 mmoles/ 10^8 cellules/h) obtenues pour les cultures effectuées avec le milieu FCS-RPMI sont presque deux fois plus élevées que celles mesurées lors des cultures réalisées avec le milieu BDM. En outre, les rendements de production de lactate $Y_{lac/glc}$ sont de l'ordre de 1,8 mole/mole pour les cultures effectuées avec le milieu FCS-RPMI alors que ce rendement est plus faible et proche de 1,3 mole/mole pour les cultures réalisées avec le milieu BDM. En revanche, les vitesses spécifiques maximales de consommation de la glutamine pour l'ensemble des cultures sont similaires et voisines de 0,008 mmoles/ 10^8 cellules/h.

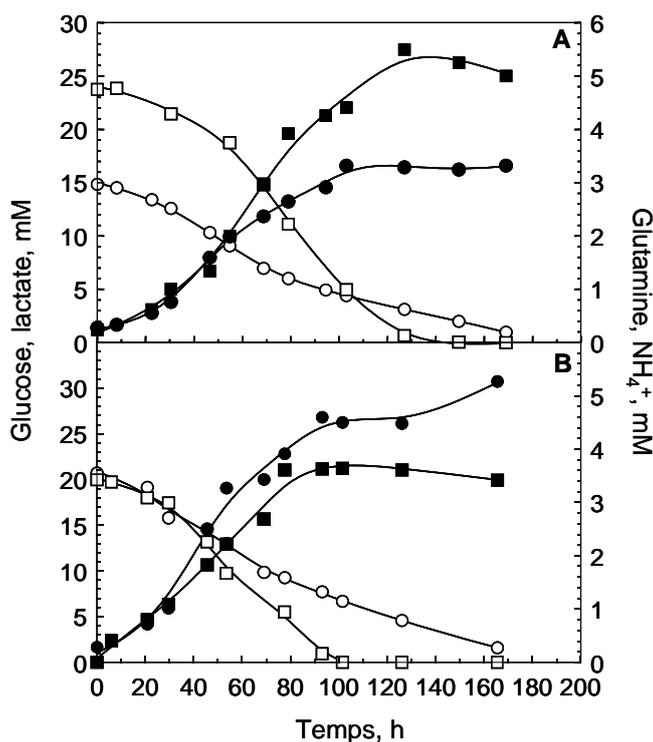


Figure 41 : Cinétiques de consommation du glucose (○) et de la glutamine (□) et de production de lactate (●) et des ions ammonium (■) réalisées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM (A) et avec le milieu FCS-RPMI (B).

La culture de cellules CHO avec le milieu BDM permet donc d'obtenir une meilleure croissance cellulaire, une meilleure production de l'IFN- γ et un rendement $Y_{lac/glc}$ plus faible par rapport à une culture effectuée avec le milieu FCS-RPMI. L'ensemble de ces résultats traduit un métabolisme du glucose différent, certainement plus efficace d'un point de vue énergétique.

1.2.4. Macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ

La variation d'occupation des sites de glycosylation de l'IFN- γ (macrohétérogénéité) a été mise en évidence par Western-blot. Les résultats obtenus pour les cultures de cellules CHO productrices d'IFN- γ réalisées en mode discontinu avec les milieux BDM et FCS-RPMI sont présentés sur la Figure 42. Pour chacune des cultures, trois glycoformes de l'IFN- γ peuvent être distinguées. Pour les deux cultures, la glycoforme 2N est majoritaire tout au long du procédé.

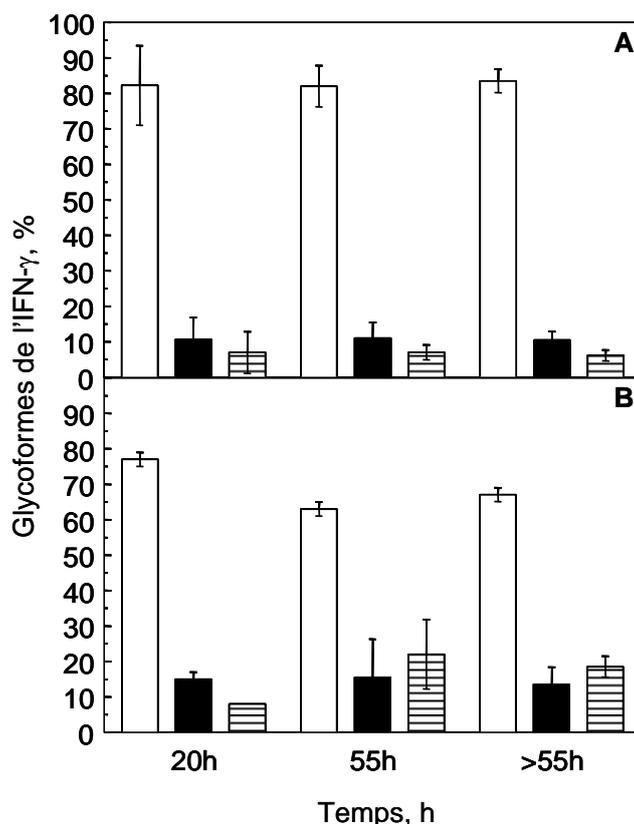


Figure 42 : Macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM (A) et avec le milieu FCS-RPMI (B). Les histogrammes représentent la moyenne des quantifications issues de 2 Western-blots indépendants des proportions des glycoformes 2N (□), 1N (■) et 0N (▨) de l'IFN- γ . Les barres d'erreur indiquent un indice de confiance de 95%.

Avec le milieu FCS-RPMI, les proportions des différentes glycoformes en début de culture sont de l'ordre de 70-80% pour la glycoforme 2N, 10-15% pour la glycoforme 1N et de 5-10% pour la forme non-glycosylée.

Ce profil de glycosylation évolue au bout de 50 heures vers une diminution du pourcentage de glycoformes 2N au profit d'une augmentation du pourcentage de glycoformes 0N, ce qui se traduit par des proportions de l'ordre de 60-65% (2N), 10-15% (1N) et 20-25% (0N) en fin de culture. En revanche, lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu BDM, le profil de glycosylation de l'IFN- γ demeure constant tout au long de la culture discontinuée avec des proportions de l'ordre de 80-85% (2N), 10% (1N) et 5-10% (0N).

La charge énergétique, de formule $(ATP+0,5ADP/ATP+ADP+AMP)$, représente la capacité de la cellule à produire de l'énergie par le recyclage des nucléotides phosphates et sa valeur théorique maximale est égale à 1 (Atkinson and Walton, 1967). Les résultats de Nadine Kochanowski (2005) ont montré que la charge énergétique de la cellule demeurait constante et proche de 1 avec le milieu BDM alors qu'elle diminue au bout de 50 h de culture avec le milieu RPMI.

L'étude de la composition du milieu BDM révèle qu'il s'agit d'un milieu riche en vitamines, acides aminés, cofacteurs, précurseurs nucléotidiques et qu'il contient 3 composés, par ailleurs absents dans le milieu RPMI:

- ✓ Pluronic F-68
- ✓ Citrate de fer
- ✓ Ethanolamine

L'ajout respectivement des vitamines, cofacteurs et précurseurs nucléotidiques au milieu RPMI n'a pas permis de maintenir une charge énergétique élevée. En revanche, l'ajout de ces 3 composés au milieu RPMI a permis ce maintien (Kochanowski *et al.*, 2007).

1.3. Démarche adoptée au cours de notre étude

Sur la base de ces résultats comparables à ceux de Nadine Kochanowski (2005), mes travaux se sont focalisés sur les composés précédemment cités et capables d'influencer les cinétiques des cellules CHO productrices d'IFN- γ au cours des procédés : pluronic F-68 (PF-68), citrate de fer et éthanolamine. Par ailleurs, l'influence du sérum de veau foetal sur les cinétiques des cellules CHO productrices d'IFN- γ a également été étudiée. En particulier, l'un des objectifs de mon travail a été d'étudier en quoi leur présence dans un milieu de culture pauvre (RPMI)

ou riche (BDM) peut modifier la croissance et la mort cellulaire, la production et la glycosylation d'une protéine d'intérêt (IFN- γ).

La Figure 43 représente de façon schématique la composition initiale des milieux BDM et FCS-RPMI.

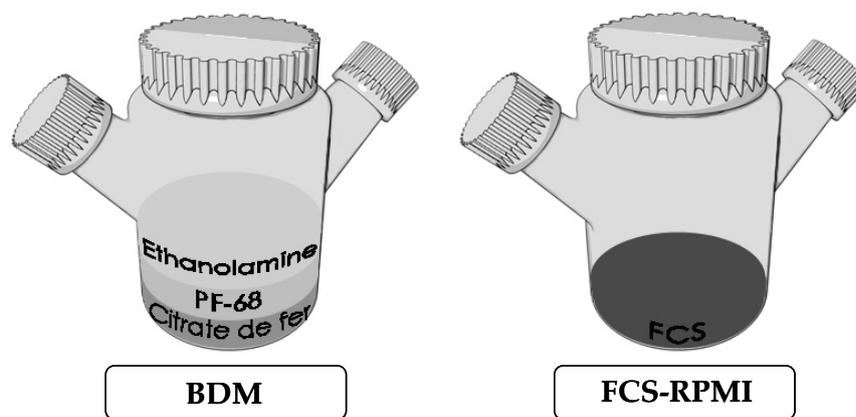


Figure 43 : Représentation schématique de la composition initiale en suppléments des milieux BDM et FCS-RPMI (FCS :sérum de veau foetal).

Dans le milieu BDM, on retrouve de l'éthanolamine, du pluronic F-68 (PF-68) et du citrate de fer. Par conséquent, les cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu BDM seront présentées avec ces 3 composés. Quant au milieu RPMI, il ne contient aucun de ces 3 composés mais contient du sérum de veau foetal (FCS).

Les deux chapitres suivants décrivent l'influence de différentes supplémentations et/ou suppressions de composés du milieu RPMI (**chapitre IV**) et du milieu BDM (**chapitre V**) sur les cinétiques de croissance, de décès et de métabolisme des cellules CHO et sur les cinétiques de production de l'IFN- γ .

Le **chapitre VI** présente l'influence des différentes supplémentations/suppressions détaillées dans les chapitres IV et V, sur la qualité de l'IFN- γ produit par les cellules CHO, en termes de glycosylation et de protéolyse. De plus, la mise en évidence de familles de protéases est également explicitée dans ce chapitre. Enfin, la relation entre le degré de glycosylation macroscopique de l'IFN- γ et son activité biologique *in-vitro* est présentée.

Chapitre IV

Influence de différentes suppléments du milieu RPMI sur la croissance, le décès cellulaire, le métabolisme et la production de l'IFN- γ au cours de cultures de cellules CHO 320

CHAPITRE IV

2.1. Introduction

Les travaux présentés dans ce chapitre ont pour but de déterminer l'influence de 3 composés (citrate de fer, pluronic F-68 et éthanolamine) sur les caractéristiques cinétiques des cellules CHO 320 lors de cultures réalisées avec un milieu de culture pauvre (RPMI). L'étude cinétique et physiologique comparée des cellules CHO cultivées dans différentes conditions de culture a été réalisée à travers le suivi cinétique de différents paramètres, tels que la croissance et le décès cellulaires, la production de l'IFN- γ , la consommation de glucose et de glutamine et la production de lactate et d'ions ammonium. L'ensemble des travaux a été réalisé en flacons agités de 500 mL.

La première partie de ces travaux est présentée en détails sous le format d'un projet de publication. Dans cette partie, la formulation d'un milieu de culture pauvre a été élaborée à partir du milieu RPMI sans sérum développé par Hayter *et al.* (1991) et optimisé à l'aide de plans d'expérience par Castro *et al.* (1992). Ce milieu contient notamment de la transferrine, de l'insuline, du sélénium et de l'albumine (TIBS). Nous avons ajouté à ce milieu trois suppléments (le citrate de fer, l'éthanolamine et le pluronic F-68), présents dans le milieu BDM mais absents dans le milieu RPMI. Les cellules CHO 320 ont été progressivement adaptées à la culture dans ce milieu sans sérum, nommé SF-RPMI pour la suite du document. La Figure 44 représente de façon schématique la démarche adoptée pour la caractérisation de l'effet de ces trois suppléments lorsque les cellules CHO sont cultivées avec un milieu pauvre RPMI.

A partir de cette composition de milieu pauvre et chimiquement défini, le retrait des suppléments, individuellement, puis par groupes de deux, et enfin par groupes de trois, a été réalisé de façon à caractériser l'impact de chaque supplément sur les paramètres cinétiques et physiologiques de la cellule CHO au cours des procédés de culture.

Dans une seconde partie, les résultats de l'étude de l'ajout de citrate de fer dans le milieu RPMI supplémenté par 5% de sérum (FCS-RPMI) sont présentés. Enfin, cette étude a été complétée par la caractérisation de l'effet de différentes formes d'apports en fer dans ce milieu de culture FCS-RPMI.

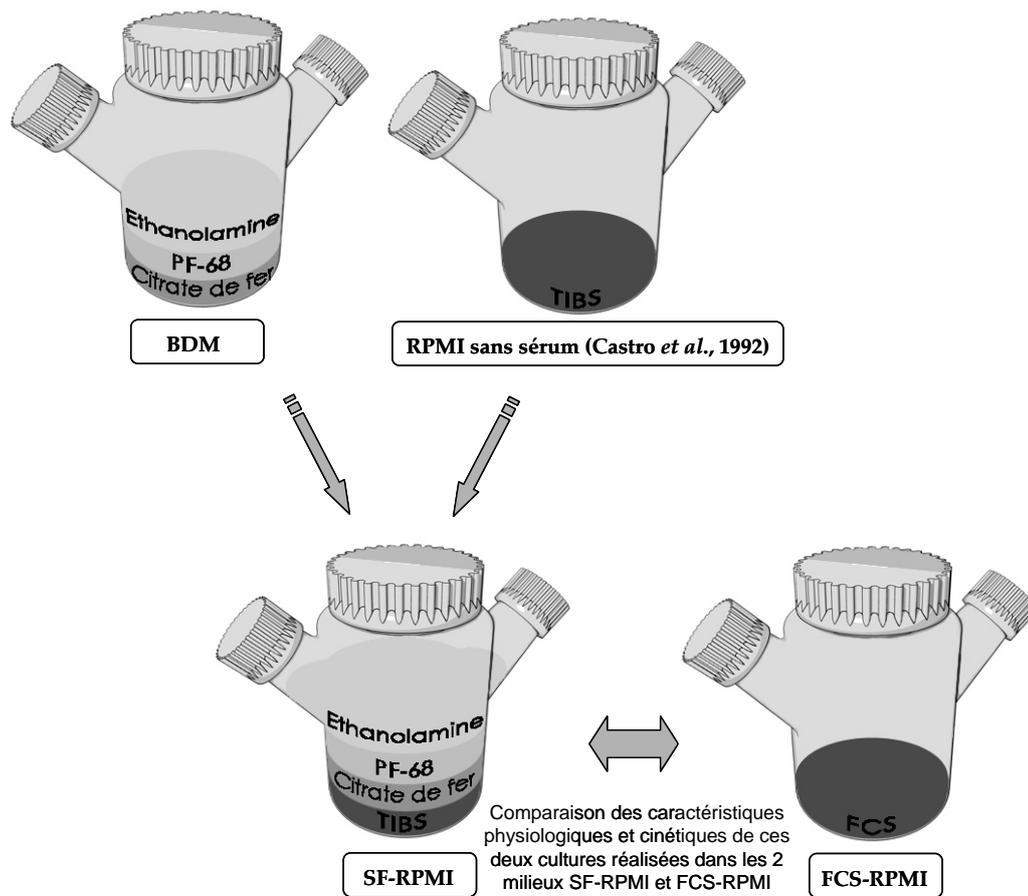


Figure 44 : Représentation schématique de la composition initiale en suppléments du milieu BDM et du milieu RPMI sans sérum (TIBS : Transferrine-Insuline-Albumine-Sélénium) ainsi que de la démarche adoptée pour la caractérisation de l'effet des suppléments (citrate de fer, pluronic F-68 et éthanolamine) lorsque les cellules CHO sont cultivées avec un milieu RPMI sans sérum.

2.2. *Projet de Publication*: Influence de 3 suppléments (citrate de fer, éthanolamine et pluronic F-68) sur les cinétiques de croissance et de décès cellulaires, du métabolisme et de production de l'IFN- γ au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 réalisées avec le milieu RPMI sans sérum

Characterization of the effects of selected supplements on the kinetic performances of a recombinant CHO cell line producing IFN- γ

Marie-Françoise Clincke,^{1,2,3} Emmanuel Guedon,^{1*} Frances T. Yen,² Fabrice Blanchard,¹ Virginie Ogier,³ Jean-Louis Goergen¹

¹ Laboratoire Réactions et Génie des Procédés UPR-CNRS 3349, ² Lipidomix (EA4422), ENSAIA-INPL, Nancy Université, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France,

³ Genclis SAS, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Introduction

Chinese hamster ovary (CHO) cells are commonly used in pharmaceutical processes because they are genetically stable and able to express high levels of recombinant proteins of therapeutic interest (Kellems, 1991; Wurm, 2004; Schmidt, 2004; Hacker *et al.*, 2009).

To cultivate CHO cells on a large scale, a serum-free medium is desirable, not only because serum is expensive and is a potential source of contaminants such as viruses, mycoplasma or prions (Mortellaro and Devine, 2007), but also because it complicates the subsequent purification process (Schröder *et al.*, 2004). However, up to know, no universal chemically-defined medium without serum and applicable to all mammalian cell lines is available. Consequently, a specific serum-free medium for each individual cell line needs to be developed to support both the cell growth and the protein production. However, the removal of serum from media usually results in a decrease in the cell growth, the specific productivity, and sometimes in changes in product quality (LeFloch *et al.*, 2006).

In this regard, protein hydrolysates have been employed as serum substitutes in cell culture medium formulation. Serum-free media supplemented with animal-derived peptones (such as Primatone RL, an enzymatic digest of meat) and low-cost hydrolysates, which contains undefined mixtures including oligopeptides, amino acids, iron, lipids, vitamins and trace elements could be a useful alternative (Schlaeger, 1996). However, such media formulations remain questionable, with a significant risk of introducing adventitious agents. As a result,

the current trend is to avoid animal derivatives during the biopharmaceutical process and has led to the use of plant (from soy, wheat, rice, pea, rapeseed...) or yeast hydrolysates (Keen and Rapson, 1995; Donaldson and Shuler, 1998; Franek *et al.*, 2000; Heidemann *et al.*, 2000; Farges-Haddani *et al.*, 2006). These media, able to promote higher cell growth and/or protein production in culture processes, are now commercially available, but their composition are usually unknown. Indeed, hydrolysates are by nature undefined with a lot-to-lot variation, making them not always suitable in pharmaceutical production processes. However, they are often tolerated in order to keep protein titers high. Currently, a chemically defined medium with performances similar to those containing protein hydrolysates by adding bioactive components found in different hydrolysates was developed (Deeds Z. *Innovative media products for the 21st century biopharmaceutical industry*, 21st meeting of the European Society for Animal Cell Technology, Dublin, 2009).

The use of a chemically defined medium without proteins, peptides or serum and made with 3 media, Iscove's MDM, Ham's F12 and NCTC, was developed 20 years ago (Schneider, 1989). The resulting medium, namely BDM, was shown to sustain an optimal growth of hybridoma cells (Schneider, 1989) and its use provided efficient performances of CHO cell cultures (Mols *et al.*, 2003; Kochanowski *et al.*, 2008). The purpose of our work was to investigate the effect of some components of the BDM medium on the kinetics of CHO cells producing γ -interferon (IFN- γ). To do this, we first compared growth and metabolism kinetics of CHO cells cultivated in BDM medium and RPMI medium supplemented with serum. Since significant differences were observed in both cultures, a comparison of the two media revealed that 3 components, present in the BDM medium, were totally absent in RPMI medium. Based on the hypothesis that these components could partially or totally mimic the serum supplementation in media, cell growth, death and metabolism, as well as the production of IFN- γ by CHO cells were evaluated in RPMI medium supplemented with different combinations of these components.

Materials and methods

Cell line

The CHO 320 producing IFN- γ cell line was derived from the CHO-K1 (dhfr-) cell line and was adapted to grow in suspension, as already reported by Kochanowski *et al.* (2008).

Culture media

Unless indicated otherwise, all chemicals were cell culture tested and were supplied by Sigma (France).

Batch cultures were carried out in three different culture media. The first one was a serum-free and protein-free medium optimized from the Basal Defined Medium (BDM) previously developed by Schneider (1989). BDM is a 5:5:1 (v:v:v) mixture of Iscove's MDM (Eurobio, France), Ham's F12 (Eurobio, France), and NCTC 135 (Eurobio, France) media. To grow CHO cells in suspension, BDM was supplemented with 0.1% pluronic F-68, 750 μ M ethanolamine and 500 μ M iron citrate with a 1/1 Fe:citrate ratio. Initial concentrations of glucose and glutamine were 14 mM and 5 mM respectively.

The second medium was RPMI-1640 (Eurobio, France) supplemented with 5% serum. To avoid lot to lot variability, the same batch of serum (Eurobio, France) was always used. The RPMI-1640 was supplemented with 10 mM glucose and 2 mM glutamine. The third medium was a serum-free medium based on RPMI-1640 supplemented with 10 mM glucose, 2 mM glutamine (Eurobio, France), 5 mg/mL bovine serum albumin, 5 mg/mL human transferrin, 5 mg/mL bovine insulin, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM alanine, 1 mM putrescine, 3 mM FeSO₄, 3 mM ZnSO₄, 10 nM Na₂SeO₃, and 10 nM CuSO₄. This formulation is named SF-RPMI. The CHO cells adapted to SF-RPMI medium were cryopreserved in SF-RPMI supplemented with 1% DMSO (v/v) and 2% Pluronic F-68 (w/v) (Hernandez and Fisher, 2007). A viability close to 80 % was achieved when the cells were thawed. For both RPMI media, initial concentrations of glucose and glutamine were 20 mM and 4 mM respectively.

Culture conditions

After thawing of the Working Cell Bank, CHO cells were initially amplified in 500 mL Erlenmeyer flasks (Corning, The Netherlands) without exceeding 7 passages to avoid cell variability. Suspension cell cultures were agitated at 70 rpm using an orbital shaker with an amplitude of 30 mm in a 37°C incubator and flushed with 5% CO₂. During the passages before seeding, cells were cultivated in Erlenmeyer flasks in the RPMI serum or in SF-RPMI if the this medium was used to for the seeding of the stirred spinner flasks.

Cell cultures were harvested in mid-exponential growth phase to seed the stirred spinner flasks (Techne, United Kingdom). The agitation rate was maintained at 40 rpm by using of a magnetic stirrer (Techne, United Kingdom). A working volume of 250 mL of culture media was inoculated with a seeding density of 2.5×10^8 cells/L and pH was maintained close to 7.2 by addition twice a day of NaOH 0,2 N.

Cell counting

Cell density was estimated using a hemacytometer, and viability was measured by the trypan blue dye exclusion method with 15% CV (six repeated counts per sample) (Nielsen *et al.*, 1991). For cultures with cell aggregates, cell number was confirmed by treating samples with Crystal Violet overnight at 37°C prior to numeration of the released nucleus.

Apoptosis was quantified with a Guava cytometer by using the annexin V marker (Guava technologies, United States) with 10% CV. Annexin V-PE is a complex bounded the phosphatidylserine proteins (PS) translocated at the cell surface at the beginning of the

apoptosis process. Healthy, non-apoptotic cells are negative for Annexin V-PE. Apoptotic cells are positive for Annexin V-PE.

To evaluate the total cellular death, the determination of intracellular LDH content and extracellular LDH released by CHO cells in the culture supernatant were performed using an enzymatic kit (ELITech, France) on a Vitalab Selectra E analyser (Vital Scientific, The Netherlands) with 10% CV. Intracellular LDH content of viable cells were measured after cell lysis in a Tween-20 solution (0.2% v/v in PBS solution). The intracellular values were an average from two samples taken during the exponential growth phase. Lysed cell titers were calculated as the difference between total dead cell concentration obtained from LDH assays and the concentration of trypan blue stained cells.

Metabolite analysis

Samples were harvested once or twice a day from the agitated spinner flasks. Samples were centrifuged (1500 rpm, 5 min) and supernatants were stored at +4°C for LDH analysis or at -20°C for glucose, lactate, glutamine, ammonia, and IFN- γ assays.

Glucose and lactate concentrations were determined using enzymatic kits (ELITech and Biomerieux respectively) on a Vitalab Selectra E analyser with 10% CV. Glutamine was converted into glutamate with asparaginase and glutamate was measured using an enzymatic method (Roche, France) with 10% CV. Glutamine concentration was then calculated with 10% CV on the basis of glutamate concentration after deamination minus glutamate concentration initially present in supernatants.

Ammonia concentration was determined with a selective electrode (Orion) with 10% CV. Extracellular pyruvate, iron citrate and α -Ketoglutarate were quantified by HPLC (Waters) with isocratic elution using 0.04 M H₂SO₄ solution on polypore H column (Brownlee Lab.) at 65 °C with UV detector (210 nm).

IFN- γ titers were determined by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the human IFN- γ DuoSet kit (R&D Systems, France) with 10% CV.

Specific rates calculations

Specific rates of apparent cell growth (μ) and lysis death (k_L) or appearance of trypan blue cells (k_b), IFN- γ , lactate and ammonia production (π) as well as glucose and glutamine consumption (ν) were calculated using the following equations in batch mode:

$$\mu = \left(\frac{1}{X_v} \right) \left(\frac{dX_v}{dt} \right)$$

μ_{\max} is defined as the maximal specific rate of cell growth.

$$k_b = \left(\frac{1}{X_v} \right) \left(\frac{dX_b}{dt} \right)$$

$$k_L = \left(\frac{1}{X_v + X_b} \right) \left(\frac{dX_L}{dt} \right)$$

$$\nu = \left(\frac{1}{X_v} \right) \left(\frac{dS}{dt} \right) \text{ or } \pi = \left(\frac{1}{X_v} \right) \left(\frac{dP}{dt} \right)$$

where X_v , X_b and X_L are the viable, trypan blue dead and lysed cell densities respectively,

and S and P are the concentration of substrates and products, respectively, measured during the cultures.

The yields were calculated using the following equation:

$$Y_{P/S} = \left(\frac{P_i - P_{i-1}}{S_{i-1} - S_i} \right)$$

Results and discussion

CHO cell growth and metabolism in chemically-defined BDM and RPMI serum

Animal cell kinetic performances are directly related to the composition of media. To focus more specifically on the relationship between cell kinetics and medium composition, batch cultures of CHO cells were performed using two specific media, namely BDM and RPMI serum. BDM is a rich, chemically-defined medium without proteins composed of 3 media (Iscove's MDM, Ham's F12 and NCTC 135) and containing more inorganic salts, nucleotide precursors, amino acids and vitamins than RPMI medium alone (Schneider, 1989).

CHO cells were first cultivated in both BDM and RPMI serum media (Figure 1). Despite a similar maximal growth rate (μ_{\max}) of 0.035 h⁻¹ whatever the medium used, kinetics performed in BDM medium resulted in a higher maximal viable cell density of 30 × 10⁸ cells/L after 130 h of culture; almost two times higher than the value obtained with RPMI supplemented with serum (18 × 10⁸ cells/L; Figures 1A and 1B). However, in the latter medium, the maximal viable cell density was reached only after 100 h of culture and was followed by an extended stationary phase during 50 hours. Trypan blue appeared only after 120 h of culture during the serum-supplemented culture and in both cultures, lysed cells were negligible (Figures 1A and 1B).

Whereas the residual glucose concentration remained close to 8 mM, a glutamine depletion was responsible for the growth arrest in RPMI serum medium (Figure 1B). In comparison, glutamine was also completely exhausted after 140 h of culture but residual glucose concentration was close to 4 mM when the CHO cell growth stopped in the BDM. As a consequence, lactate and ammonia accumulated at 15 and 5.5 mM respectively in BDM medium compared to 30 and 3.5 mM in RPMI serum medium; such concentrations are usually not considered as toxic (Hayter *et al.*, 1991; Lao and Toth, 1997). However, accumulation of lactate by CHO cells higher in RPMI serum medium than in BDM medium. In fact, maximal specific rates of glucose consumption (0.04 mmol/10⁸ cells/h) and lactate production (0.06 mmol/10⁸ cells/h) by CHO cells cultivated in RPMI serum were almost 2 times higher than those measured in BDM culture. Furthermore, the lactate yield was found

to be higher in RPMI serum than in BDM medium (1.8 mol/mol *vs.* 1.3 mol/mol), while the maximal specific rate of glutamine consumption by CHO cells cultivated in both media were identical and close to 0.008 mmol/10⁸ cells/h. From these results, it appeared that CHO cell metabolism was more efficient when cells were cultivated in BDM medium than in RPMI serum medium leading to the hypothesis that differences in growth kinetics resulted directly from differences in medium composition.

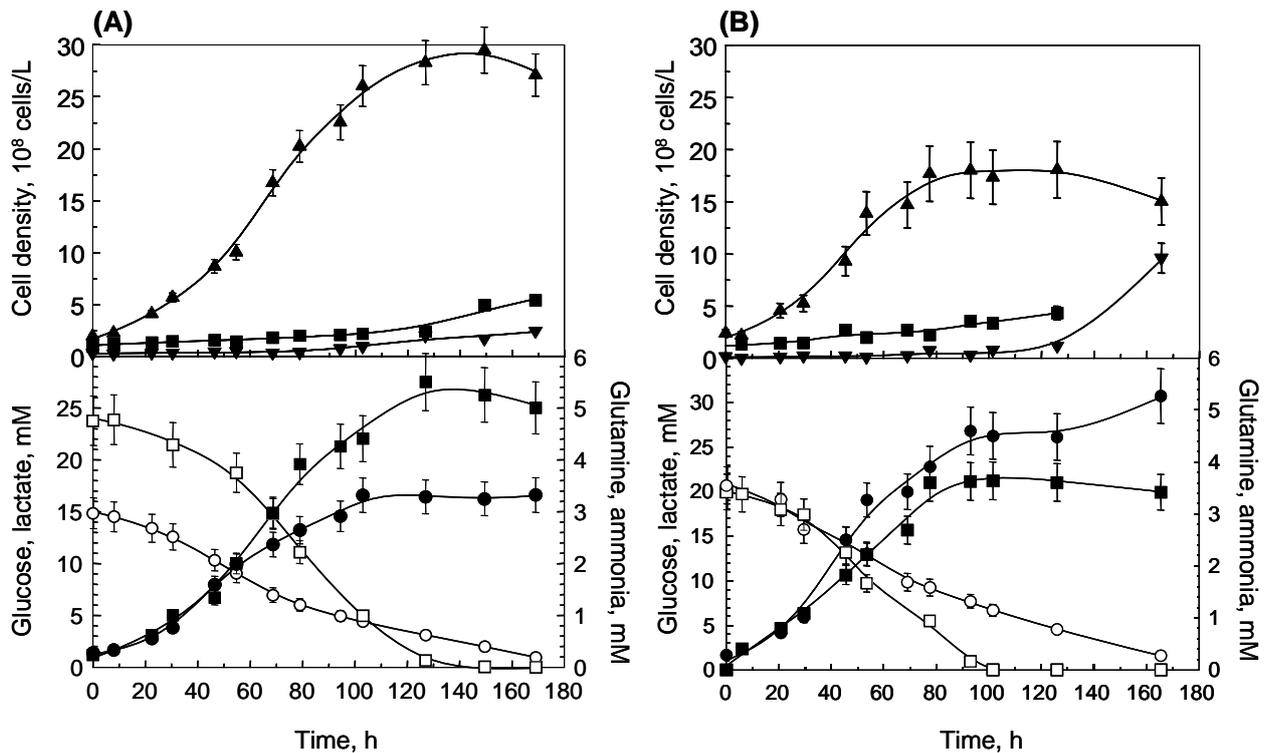


Figure 1: Growth and metabolism kinetics of CHO cells cultivated in spinner flasks in discontinuous mode. CHO cell cultures were performed in BDM medium (A) and in RPMI supplemented with 5% FCS (B). Concentrations of viable cells (▲), dead (trypan blue) cells (▼), lysed cells (■), glucose (○), lactate (●), glutamine (□) and ammonia (■) in both media (n ≥ 3).

Compositions of both BDM and RPMI were compared and 3 components which are present in BDM but completely absent in RPMI were identified. These 3 components are pluronic F-68 (PF-68), iron citrate and ethanolamine and were tested as supplements and as alternatives to serum in CHO culture processes performed in RPMI without serum. This medium is referred to as SF-RPMI.

CHO cell growth and metabolism in RPMI

Growth kinetics of CHO cells cultivated in SF-RPMI and RPMI serum.

CHO cells were first adapted to grow in a SF-RPMI medium. The basal medium used was a commercial RPMI supplemented with the components as indicated in Materials & Methods

(Hayter *et al.*, 1991) and with the 3 additional components of the BDM medium: PF-68, iron citrate and ethanolamine.

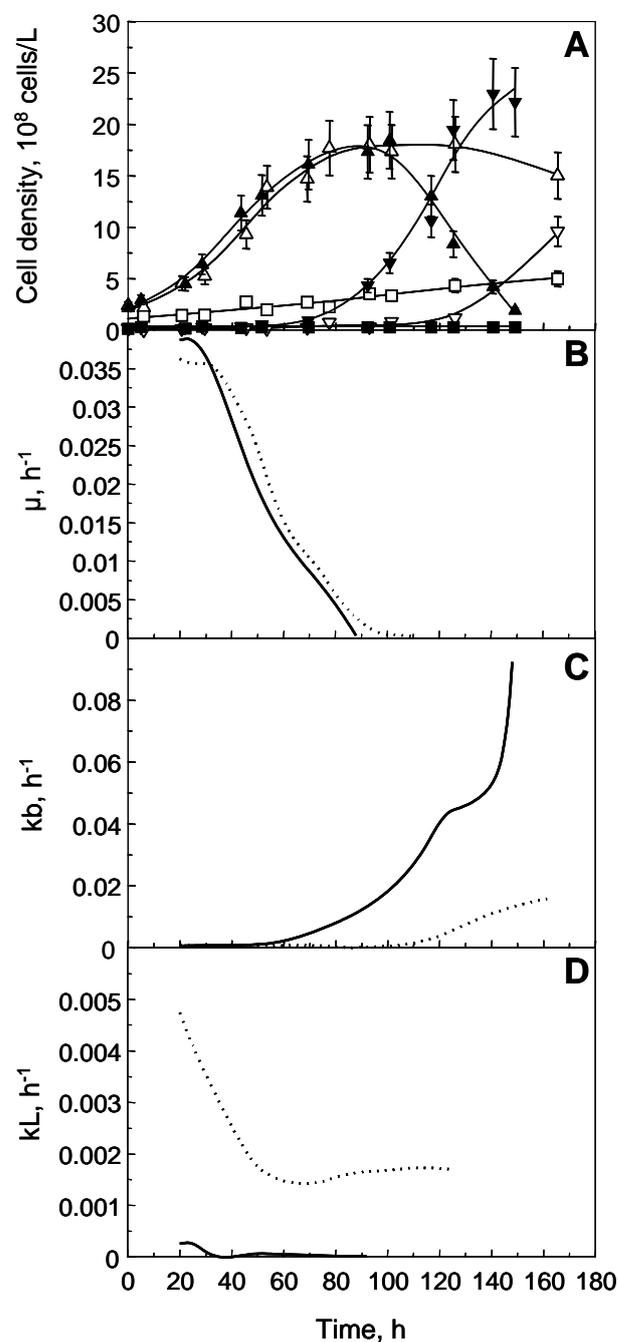


Figure 2: (A) Kinetics of viable (\blacktriangle , \triangle), trypan-blue dead (\blacktriangledown , \triangledown) and lysed (\blacksquare , \square) cells cultivated in spinner flasks and in discontinuous mode. CHO cell cultures were performed in SF-RPMI (closed symbols) and in RPMI supplemented with serum (open symbols). Error bars correspond to the accuracy of the assays and for some values they are smaller than the symbols. Calculation of the specific rates of cell growth (B), death cell (C) and cell lysis (D) in SF-RPMI medium (—) and in RPMI with serum (\cdots) ($n \geq 3$).

Cells were progressively adapted to grow in RPMI medium without serum as already reported by LeFloch *et al.* (2006). After 5 weeks of adaptation, the maximal specific growth

rate, 0.035 h^{-1} , was similar to that obtained when CHO cells were cultivated in RPMI serum or in BDM medium.

In both SF-RPMI and RPMI serum media, no significant differences in growth profile of CHO cells were observed (similar maximal specific growth rates of 0.035 h^{-1}) and cellular concentrations reached maximal viable cell densities of $18 \times 10^8 \text{ cells/L}$ (Figures 2A and 2B). However, cell death occurred earlier in SF-RPMI than in RPMI serum medium. In SF-RPMI, visible dead cell concentration reached $23 \times 10^8 \text{ cells/L}$ in SF-RPMI medium, but only $5 \times 10^8 \text{ cells/L}$ was measured for cultures in RPMI serum after 150 h (Figure 2A). Therefore, in SF-RPMI medium, a depletion of nutrients or the absence of growth factors may lead to abortive proliferation (Chung *et al.*, 1998; Spens and Häggström, 2005).

As a consequence, the maximal specific death rate (k_b) of CHO cells cultivated in this medium was also affected and was found to be four times higher (0.09 h^{-1}) than in RPMI serum (0.02 h^{-1}) (Figure 2C). Cell lysis in both media were also investigated by measuring LDH activity (Racher *et al.*, 1990; Legrand *et al.*, 1992; Goergen *et al.*, 1993). In RPMI serum medium, lysed CHO cells were always observed during the culture with a maximal specific lysis rate of about 0.005 h^{-1} . As a consequence, more than 5×10^8 lysed cells accumulated after 150 h of culture (Figures 2A and 2D). On the contrary, lysed cells appeared to be negligible in the SF-RPMI medium, in agreement with results reported by Schröder *et al.* (2004).

Metabolism of CHO cells cultivated in SF-RPMI and RPMI serum

Substrate consumption and product formation were measured in cultures performed in RPMI with and without serum over 7 days (Figure 3). In both media, initial glucose and glutamine concentrations were 20 and 4 mM respectively. Glucose and glutamine were similarly consumed in RPMI media with or without serum. After 80 h of culture, glutamine was entirely consumed whereas glucose was not depleted (Figure 3A). As a consequence, the depletion of this substrate could be responsible for the stationary phase of CHO cells and their death (Figure 2A). Whereas consumption patterns of the two major carbon and energy sources were similar in both media, the maximal specific consumption rates of glucose and glutamine were two times higher in RPMI serum medium than in SF-RPMI medium (Figure 3B). Similarly, the maximal specific production rates of lactate and ammonia were two times higher in RPMI serum medium than in SF-RPMI medium. However, accumulation of lactate and ammonia appeared to be similar; final concentrations of these products were 30 mM and 3.5 mM, respectively for the culture performed in RPMI serum compared to 25 mM and 3 mM for cultures carried out in SF-RPMI medium. From these results, it appeared that the

composition of SF-RPMI medium was sufficient to obtain similar kinetic performances than those obtained in cultures performed in BDM medium.

Therefore, the supplementation of SF-RPMI with the 3 components seemed to be associated with the maintenance of high levels of CHO cell viability.

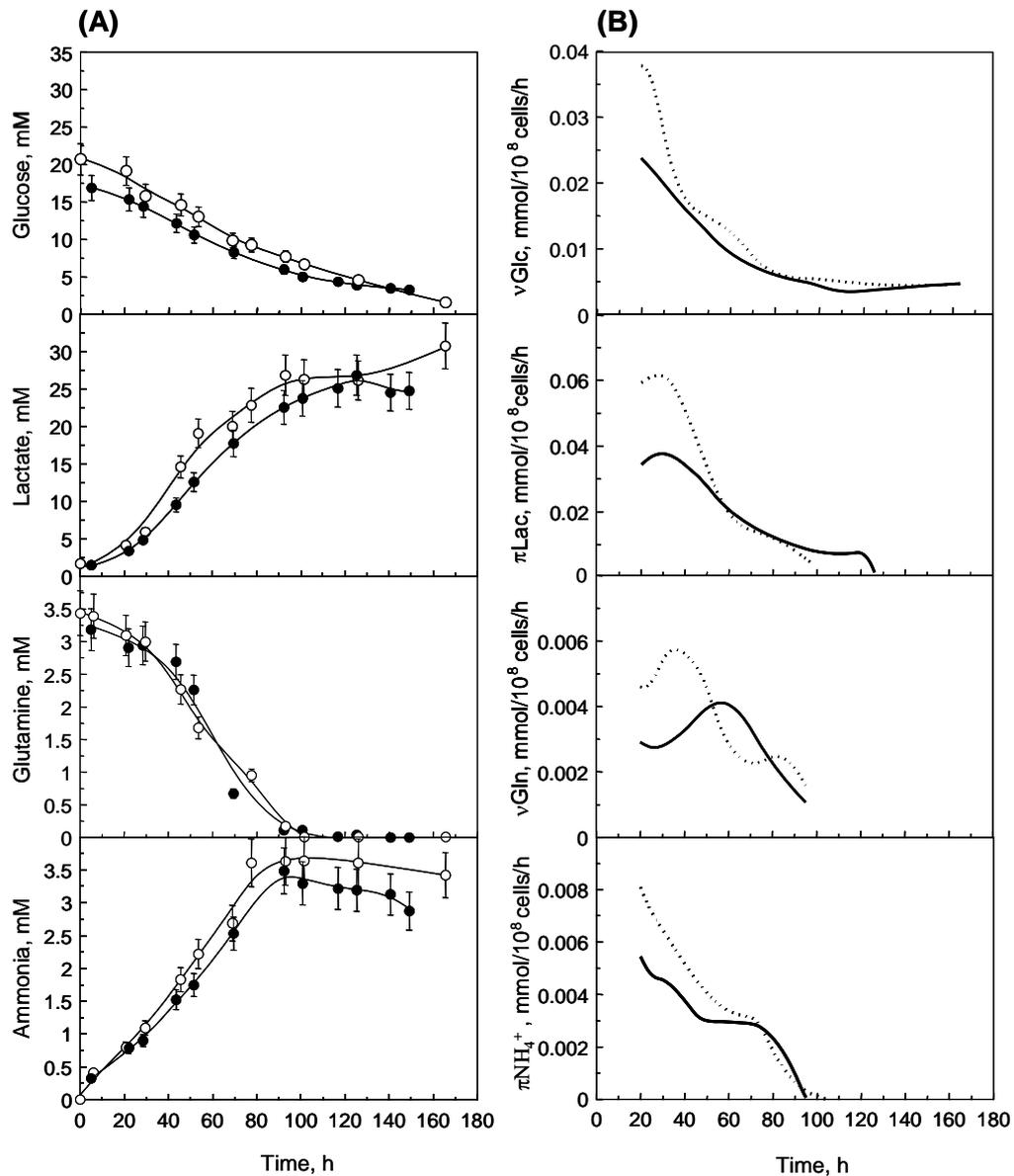


Figure 3: (A) Metabolism kinetics of CHO cells cultivated in spinner flasks and in discontinuous mode in SF-RPMI medium (●) and in RPMI supplemented with 5% FCS (○). (B) Calculation of the specific rates of glucose (a), lactate (b), glutamine (c) and ammonia (d) in SF-RPMI medium (—) and RPMI supplemented with 5% FCS (· · · ·) (n ≥ 3).

Effects of the 3 components on CHO cell growth and death kinetics

In order to characterize the effect of the 3 components on the growth of CHO cells, one by one these components were removed from SF-RPMI, and the resulting media were tested during kinetics studies carried out in 250 ml spinner flasks (Figure 4).

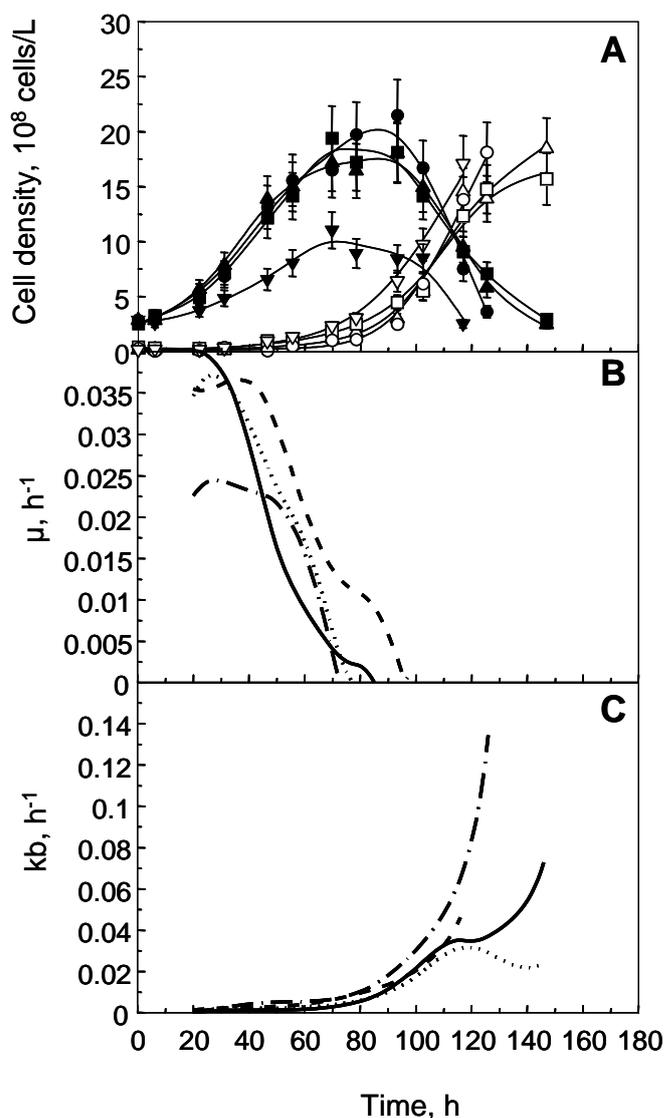


Figure 4: (A) Kinetics of viable (closed symbols) and trypan-blue dead (open symbols) cells cultivated in spinner flasks and in discontinuous mode. CHO cell cultures were performed in SF-RPMI medium (\blacktriangle , \triangle), SF-RPMI medium without PF-68 (\blacksquare , \square), SF-RPMI medium without ethanolamine (\bullet , \circ) and SF-RPMI medium without iron citrate (\blacktriangledown , \triangledown). Error bars correspond to the accuracy of the assays and for some values they are smaller than the symbols. Calculation of the specific rates of cell growth (B) and cell death (C) in SF-RPMI medium (—), in SF-RPMI medium without PF-68 (---), in SF-RPMI medium without ethanolamine (- · -) and in SF-RPMI medium without iron citrate (— • —) (n = 3).

When ethanolamine or PF-68 were removed from the SF-RPMI medium, a maximal cell concentration of 18×10^8 cells/L was achieved after 80 h of culture (Figure 4A). In these conditions, CHO cells were able to grow at a maximal specific growth rate of 0.035 h^{-1} (Figure 4B). The cell death was also investigated during the culture process. For all the previous culture conditions, the trypan blue dead cell concentration reached 20×10^8 cells/L after 150 h of culture (Figure 4A) with a maximal specific blue dead rate (kb) between 0.06 and 0.08 h^{-1} (Figure 4C). As expected, the number of lysed cells were kept generally constant and low as observed in cultures performed in SF-RPMI medium (data not shown). The growth and death kinetics were also very similar to those obtained in the SF-RPMI medium. In our study, no difference was observed between cultures of CHO cells carried out with or without ethanolamine in supplemented SF-RPMI.

In SF-RPMI without PF-68, CHO cell growth kinetics were similar to those performed in fully supplemented SF-RPMI. Pluronic F-68, a synthetic non-ionic surfactant, is widely used to protect mammalian and insect cells from sparging and agitation-related injuries in agitated and aerated bioreactors (Murhammer and Goochee, 1990). One of the possible reasons of this phenomenon could be the presence of other shear protectants in the culture medium. It should be noted that the medium was also supplemented with bovine serum albumin (BSA), which could not only play a role as lipid-carrier (Barnes and Sato, 1980; Iscove *et al.*, 1980) but also was assumed to play a role in the protection of cells against shear stresses, but such BSA property remained to be confirmed (Papoutsakis, 1991). Therefore, in the absence of PF-68, BSA could prevent early cell death resulting from the absence of surfactant in the medium.

In contrast, in the medium without iron citrate, the maximal cell density reached only 50% of the maximal cell concentration obtained in the SF-RPMI medium supplemented with all components; *i.e.* 9×10^8 cells/L after 80 h of culture (Figure 4A). In addition, the maximal specific growth rate of CHO cells was strongly reduced and close to 0.022 h^{-1} . It should be noticed that when iron citrate was not added in SF-RPMI medium, a strong aggregation of the CHO cells occurred. Indeed, aggregates made with 2-3 cells appeared at the beginning of the culture process and increased progressively to reach more than 10-15 cells/aggregate. Cell death kinetics appeared to be slightly different compared to other conditions since dead cells appeared 20-40 h earlier (Figure 4A). Nevertheless, the maximal specific rate of appearance of blue dead cells (kb) was close to 0.08 h^{-1} whatever the culture performed (Figure 4C).

Iron is an important nutrient and is reported to support essential functions in both procaryotic and eukaryotic cells, such as DNA synthesis, respiration, oxygen transport and

energy production (Le and Richardson, 2002). Nevertheless, to determine whether it was citrate (carbon source) rather than iron that influenced aggregate formation and early cell death, iron citrate was replaced by citrate. In this condition, viable cell densities were similar to that of CHO cells cultivated in SF-RPMI without iron citrate. However, the size of aggregates was reduced containing less than 10 cells per aggregate (data not shown). Mechanisms involved in this phenomenon remained unknown but it can be hypothesized that citrate in association with iron or not could act as a chelator of divalent ions involved in aggregation of cells.

To further characterize the effect of the 3 compounds, SF-RPMI was formulated by depleting combinations of 2 components. In all conditions tested, the growth and death kinetics were very similar to those obtained by the deprivation of only one compound at a time, except in conditions where iron citrate was absent (data not shown). Therefore, iron citrate appeared to promote the growth of CHO cells, despite the presence of another iron source in the medium, i.e. transferrin, a plasma glycoprotein of 80 kDa, able to bind two atoms of iron.

Effects of the 3 supplements on CHO cell metabolism

In all conditions tested, glucose and glutamine consumptions and lactate and ammonia productions were measured. With the exception of SF-RPMI without iron citrate, the depletion of glutamine coincided with the end of the cell growth. On the contrary, in cultures without iron citrate, the end of CHO cell growth occurred while glutamine and glucose were not completely exhausted, suggesting that iron was a limiting factor. In all tested conditions, the maximal specific rates of glucose consumption and lactate production were close to 0.03 and 0.04 mmol/10⁸ cell/h (Figures 5A and 5B). The profiles of both specific rates of glucose consumption and lactate production were similar except for the cultures performed without iron citrate in which these rates were maintained higher during the culture. Further metabolic investigations were performed by measuring extracellular pyruvate and α -KG. In all culture conditions, the maximal specific rate of pyruvate accumulation was low and reached 1.4-1.8 μ mol/10⁸ cells/h (data not shown), suggesting that the pyruvate flow was mainly directed to the lactate formation or to the TCA cycle. Interestingly, in cultures performed without iron citrate, extracellular α -KG accumulated in the medium supernatant at a maximal specific production rate of 3 μ mol/10⁸ cells/h and reached a final concentration of 0.7 mM (data not shown), suggesting that a significant part of glutamine was converted in extracellular α -KG rather than being channeled into the TCA cycle. Furthermore, the

maximal specific rates of glutamine consumption and ammonia production were obtained in cultures without iron citrate ($10 \mu\text{mol}/10^8 \text{ cell/h}$ vs. $6 \mu\text{mol}/10^8 \text{ cell/h}$) compared to the other culture conditions studied (Figures 5C and 5D).

From these results, it appeared that the cell energy metabolism through TCA cycle was less efficient in CHO cells cultivated without iron citrate.

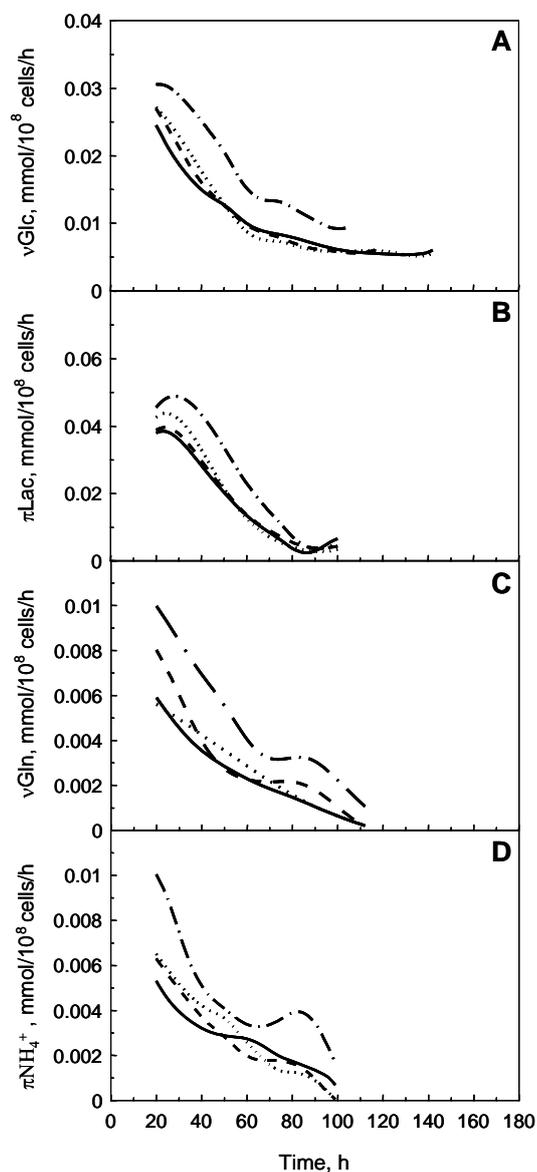


Figure 5: Specific rates of glucose consumption (A) and lactate formation (B) as well as glutamine consumption (C) and ammonia formation (D) during CHO cell cultures performed in SF-RPMI medium (—), in SF-RPMI medium without PF-68 (.....), in SF-RPMI medium without ethanolamine (- - -) and in SF-RPMI medium without iron citrate (— ♦) (n = 3).

Influence of iron citrate on CHO cell death

Since the absence of iron citrate in SF-RPMI was shown to have a dramatic effect on the viable cell concentration, cell mortality was investigated during a culture process of the CHO cells cultivated in SF-RPMI supplemented with or without iron citrate. Apoptotic cell population were then monitored (Figure 6).

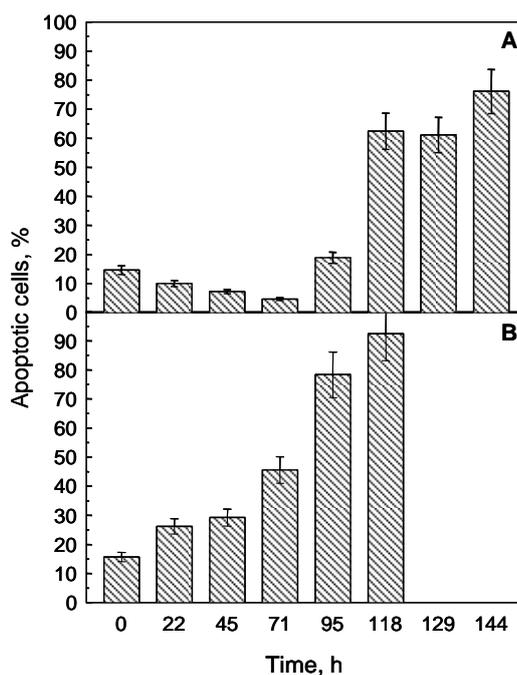


Figure 6: Percentage of apoptotic CHO cells in culture performed in SF-RPMI medium (A) and in SF-RPMI medium without iron citrate (B).

When CHO cells were cultivated in SF-RPMI medium fully supplemented, the apoptotic cell percentage remained constant and at a low level (less than 20% of total cells) until 100 h of culture (Figure 6A). Then, the maximal proportion of apoptotic cells was reached after 100 h, coinciding with the appearance of blue dead cells. On the contrary, in the same medium but without iron citrate, apoptotic cells appeared at low levels above 20% of total cells after 20 h of culture and increased progressively over the culture process (Figure 6B). CHO cell apoptosis occurred at a percentage higher in SF-RPMI without iron citrate than in the fully supplemented SF-RPMI medium to reach more than 80 % after 100 h of culture. From these results, it can be concluded that a slower apparent cell growth rate and a lower maximal viable cell density obtained in culture performed in SF-RPMI without iron citrate were essentially due to an increase in cell apoptosis.

Addition of iron citrate was shown to extend the viability of cells and allowed to delay the apoptosis phenomenon for almost 3 days. These results are in agreement with those reported in the literature, suggesting a dysfunction of the mitochondrial respiratory chain or DNA damages due to iron deprivation and may be responsible for inhibition of hepatoma cell (Rakba *et al.*, 2000), human cervical carcinoma cell (Simonart *et al.*, 2002) and Raji cell (Koc *et al.*, 2006) proliferation or for apoptosis induction. It was also suggested that higher levels of iron could lead to enhanced expression of Hsp 90 (Fukuda *et al.*, 1996). Surprisingly, iron citrate is not the only iron source in the SF-RPMI medium, which was complemented with inorganic salts (FeSO_4), and transferrin (Tf). One difference between transferrin and iron citrate is, in particular, the mechanism of iron uptake. While diferric-transferrin is internalized via receptor-mediated endocytosis (Tf-R), iron citrate involves a Tf-independent iron transporter. In the latter case, a cellular ferric reductase is required to provide iron in a soluble form. Furthermore, citrate constitutes a carbon source to feed the TCA cycle.

Effect of the medium composition on IFN- γ production

Kinetics of IFN- γ production by CHO cells cultivated in SF-RPMI and RPMI with serum

Since SF-RPMI was shown to support the growth of CHO cells, it was also interesting to verify that the medium could promote efficient recombinant protein synthesis. To verify this hypothesis, cultures of CHO cells producing IFN- γ were performed in SF-RPMI and RPMI supplemented with serum (Figure 7).

For both cell culture conditions, the production of IFN- γ occurred exclusively during the growth phase and reached the highest concentrations at the end of this phase (Figure 7A). As a result, concentrations of accumulated IFN- γ reached 0.8 mg/L in RPMI serum medium and more than 1 mg/L when CHO cells were cultivated in SF-RPMI medium, indicating that IFN- γ production appeared to be correlated with cell yield (Figure 2A), as already suggested by Lamotte *et al.* (1999) and Kochanowski *et al.* (2008). Indeed, the specific rates of IFN- γ production (Figure 7B) and cell growth (Figure 2B) varied in the same way in cultures performed in SF-RPMI medium. On the contrary, in CHO cell cultures performed in RPMI serum, a delay in IFN- γ production was observed (Figures 7A and 7B). Indeed, the maximal specific rate of IFN- γ was reached only after 50 h of culture, as compared to a similar value of the maximal specific rate of IFN- γ production obtained from the beginning of CHO cells cultivated in SF-RPMI medium. Furthermore, the IFN- γ /viable cell yield was higher in SF-RPMI medium (0.08 mg/ 10^8 cells) than in RPMI serum medium (0.065 mg/ 10^8 cells).

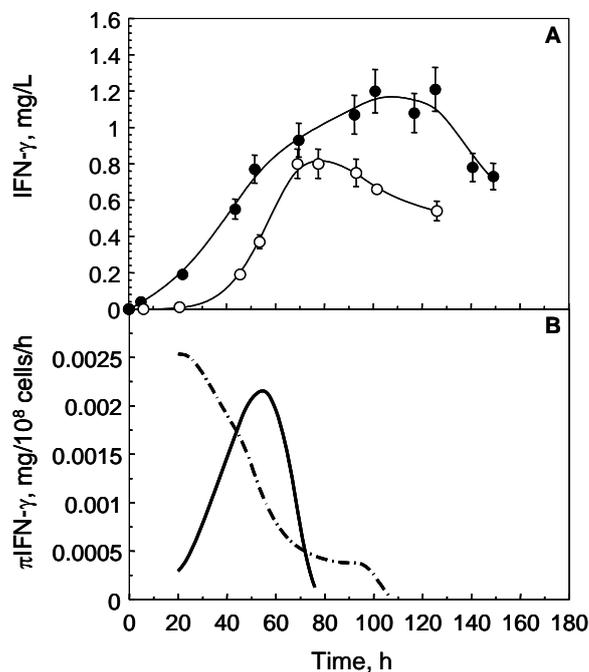


Figure 7: (A) Kinetics of IFN- γ production by CHO cells cultivated in spinner flasks and in discontinuous mode. CHO cell cultures were performed in SF-RPMI medium (●) and in RPMI medium supplemented with 5% FCS (○). Error bars correspond to the accuracy of the assays and for some values they are smaller than the symbols. (B) Calculation of the specific rate of IFN- γ production in SF-RPMI medium (— ♦) and in RPMI medium supplemented with 5% FCS (—) ($n \geq 3$).

It can be concluded that the supplements added in the SF-RPMI medium had a significant effect on the production of recombinant proteins compared to the production obtained using RPMI serum medium. Other feeding supplements, such as sodium butyrate or adenosine have been reported to enhance the IFN- γ production by CHO cells (Lamotte *et al.*, 1999; Chong *et al.*, 2009). However, addition of NH₄Cl above 5 mM were shown to inhibit CHO cell growth yet increase the specific production of EPO (Yang and Butler, 2000).

Effects of the 3 components on CHO cell production of recombinant IFN- γ

To further characterize the effect of each component on the IFN- γ production by CHO cells, cultures were performed in SF-RPMI, without either iron citrate, or PF-68 or ethanolamine. Except for the culture without iron citrate, the production of IFN- γ was associated with cell growth (Figure 8A). As reported previously, both specific rates of IFN- γ production and specific growth rate were associated in a similar trend (Figures 4B and 8B). The lowest titer of

IFN- γ (0.7 mg/L *vs.* ca. 1.2 mg/L) was observed when CHO cells were cultivated without PF-68 compared to other culture conditions. Therefore, the deprivation of PF-68 seems to have a dramatic effect on the maximal IFN- γ titer, as previously reported (Clincke *et al.*, 2010).

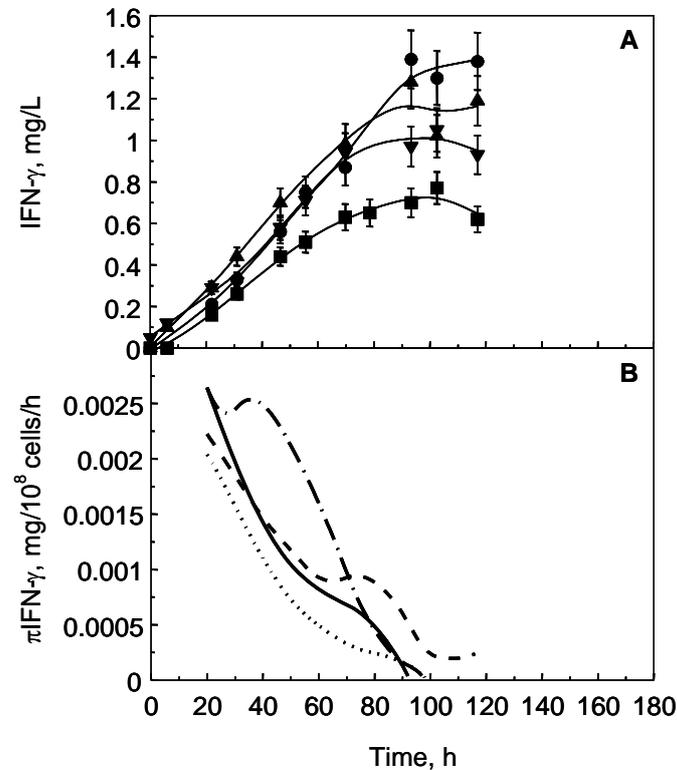


Figure 8: (A) Kinetics of IFN- γ production by CHO cells cultivated in spinner flasks and in discontinuous mode. CHO cell cultures were performed in SF-RPMI medium (▲), in SF-RPMI without PF-68 (■), in SF-RPMI without ethanolamine (●) and in SF-RPMI without iron citrate (▼). Error bars correspond to the accuracy of the assays and for some values they are smaller than the symbols. (B) Calculation of the specific rate of IFN- γ production in SF-RPMI medium (—), in SF-RPMI without PF-68 (· · · ·), in SF-RPMI without ethanolamine (— · —) and in SF-RPMI without iron citrate (— · ♦) (n = 3).

Interestingly, the lowest specific growth rate of CHO cells was obtained in culture using SF-RPMI without iron citrate. With these conditions, IFN- γ production was not correlated to the growth of cells (Figures 4A, 4B, 8A and 8B). These results indicate that the absence of iron citrate in the SF-RPMI medium was responsible for the arrest of CHO cell growth, but was not limiting for the IFN- γ production. Indeed, glucose and glutamine were still present until 100 h of culture (data not shown) and could also have been used for IFN- γ production. However, the increase in specific rate of IFN- γ production was counter-balanced by lower cell densities, resulting in a similar accumulation of IFN- γ as compared to that obtained using RPMI serum.

Conclusions

In this article, we described the effect of 3 components (ethanolamine, iron citrate and Pluronic F-68) present in BDM medium but not in RPMI, on CHO cell growth, death and metabolism, as well as the production of IFN- γ produced in a basal and serum-free medium. Whereas ethanolamine and pluronic F-68 did not promote any apparent effect on CHO cell growth, death and metabolism, the importance of iron citrate was clearly demonstrated. Addition of iron citrate in RPMI medium allowed the cells to adapt rapidly and grow in absence of serum. Growth kinetic performances similar to those observed in RPMI with serum were also obtained in SF-RPMI. Furthermore, the global kinetic study of the metabolism of the two major carbon sources by CHO cells indicated a better efficiency of the central cell metabolism as compared to the culture performed in RPMI supplemented with serum.

Furthermore, iron citrate was shown to reduce CHO cell apoptosis. Indeed, in a medium which still contains an iron source, i.e. transferrin, addition of iron citrate delayed apoptosis for almost 3 days during the process. Based on glucose consumption and lactate formation, we also demonstrated that the cell energy metabolism through TCA cycle was less efficient for the culture without iron citrate than for the other SF-RPMI culture condition tested. Interestingly, without iron citrate in SF-RPMI, an accumulation of extracellular α -KG in the medium supernatant was observed, suggesting that glutamine was converted to α -KG rather than being used in the TCA cycle.

Through kinetics of IFN- γ production, we demonstrated that the 3 components added in the SF-RPMI medium, ethanolamine, pluronic F-68 and iron citrate, led to an SF-RPMI formulation suitable for the production of recombinant proteins with higher IFN- γ /viable cell yields than those measured in a RPMI medium supplemented with serum. The addition of pluronic F-68 in RPMI in particular improved the final IFN- γ titer by 60%.

Nomenclature

BDM	Protein-free basal defined medium
CHO	Chinese Hamster Ovary
CV	Coefficient of variation
Glc	Glucose
Gln	Glutamine
IFN- γ	Recombinant human interferon gamma
α -KG	α -Ketoglutarate
Lac	Lactate

NH ₄ ⁺	Ammonia
PF-68	Pluronic F-68
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium

Aknowledgements

This work was financed by the Agence Nationale pour la Recherche Technique (ANRT) and Genclis SAS (Vandoeuvre-lès-Nancy, France). The authors also aknowledge Iréna Audzeyenka for her technical help.

References

- Barnes D, Sato G.** 1980. Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal Biochem* 102:255-270.
- Chong WPK, Sim LC, Wang KT, Yap MG.** 2009. Enhanced IFN-g production in adenosine-treated CHO cells: a mechanistic study. *Biotechnol Progr* 25:866-873.
- Chung JD, Sinskey AJ, Stephanopoulos G.** 1998. Growth factor and bcl-2 mediated survival during abortive proliferation of hybridoma cell line. *Biotechnol Bioeng* 57:164-171.
- Clincke M-F, Guedon E, Yen FT, Ogier V, Roitel O, Goergen J-L.** 2010. Effect of surfactant pluronic F-68 on CHO cell growth, metabolism, production and glycosylation of human recombinant IFN- γ in mild operating conditions. *Biotechnol Prog* (Accepted for publication).
- Donaldson MS, Shuler ML.** 1998. Low-cost serum-free medium for the BTI-Tn5B1-4 insect cell line. *Biotechnol Prog* 14:573-579.
- Farges-Haddani B, Tessier B, Chenu S, Chevalot I, Harscoat C, Marc I, Goergen JL, Marc A.** 2006. Peptide fractions of rapeseed hydrolysates as an alternative to animal proteins in CHO cell culture media. *Process Biochem* 41:2297-2304.
- Franek F, Hohenwarter O, Katinger H.** 2000. Plant protein hydrolysates: preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures. *Biotechnol Prog* 16:688-692.
- Fukuda A, Osawa T, Oda H, Tanaka T, Toyokuni S, Uchida K.** 1996. Oxydative stress response in iron-induced acute nephrotoxicity: enhanced expression of heat shock protein 90. *Biochem Biophys Res Commun* 219:76-81.
- Goergen JL, Marc A, Engasser JM.** 1993. Determination of cell lysis and death kinetics in continuous hybridoma cultures from the measurement of lactate dehydrogenase release. *Cytotechnology* 11:189-195.
- Hacker DL, De Jesus M, Wurm FM.** 2009. 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells – Where do we go from here? *Biotechnol Adv* 27:1023-1027.
- Hayter PM, Curling EMA, Gould ML, Baines AJ, Jenkins N, Salmon I, Strange PG, Bull AT.** 1991. Chinese hamster ovary cell growth and interferon production kinetics in stirred batch culture. *Appl Microb Biotechnol* 34:559-564.
- Heidemann R, Zhang C, Qi H, Rule JL, Rozales C, Park S, Chuppa S, Ray M, Michaels J, Konstantinov K and others.** 2000. The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells. *Cytotechnology* 32:157-167.
- Hernandez G, Fisher RW.** 2007. Serum-free culturing of mammalian cells adaptation to and cryopreservation in fully defined media. *ALTEX* 24:110-116.
- Iscove NN, Guilbert LJ, Weyman C.** 1980. Complete replacement of serum in primary cultures of erythropoietin-dependent red cell precursors (CFU-E) by albumin, transferrin, iron, unsaturated fatty acid, lecithin and cholesterol. *Exp Cell Res* 126:121-126.
- Keen MJ, Rapson NT.** 1995. Development of a serum-free culture medium for the large scale production of recombinant protein from a Chinese hamster ovary cell line. *Cytotechnology* 17:153-163.

- Kellems RE.** 1991. Gene amplification in mammalian cells: Strategies for protein production. *Curr Opin Biotechnol* 2:723-729.
- Koc M, Nad'ova Z, Kovar J.** 2006. Sensitivity of cells to apoptosis induced by iron deprivation can be reversibly changed by iron availability. *Cell Proliferation* 39:551-561.
- Kochanowski N, Blanchard F, Cacan R, Chirat F, Guedon E, Marc A, Goergen J-L.** 2008. Influence of intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents on recombinant interferon-g glycosylation during batch and fed-batch cultures of CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 100:721-733.
- Lamotte D, Buckberry L, Monaco L, Soria M, Jenkins N, Engasser J-M, Marc A.** 1999. Na-butyrate increases the production and 2,6-sialylation of recombinant interferon-g expressed by 2,6-sialyltransferase engineered CHO cells. *Cytotechnology* 29:55-64.
- Lao M-S, Toth D.** 1997. Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant CHO cell culture. *Biotechnol Prog* 13:688-69.
- Le NT, Richardson DR.** 2002. The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1603:31-46.
- LeFloch F, Tessier B, Chenuet S, Guillaume JM, Cans P, Goergen JL, Marc A.** 2006. Related effects of cell adaptation to serum-free conditions on murine EPO production and glycosylation by CHO cells. *Cytotechnology* 52:39-53.
- Legrand C, Bour JM, Jacob C, Capiamont J, Martial A, Marc A, Wudtke M, Kretzmer G, Demangel C, Duval D and others.** 1992. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker. *J Biotechnol* 25:231-243.
- Mols J, Burteau CC, Verhoeve FR, Ballez JS, Agathos SN, Schneider YJ.** 2003. Fortification of a protein-free cell culture medium with plant peptones improves cultivation and productivity of an interferon- γ producing CHO cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 39:291-296.
- Mortellaro S, Devine M.** 2007. Advances in Animal-Free Manufacturing of Biopharmaceuticals. *BioPharm Int* 20:30-37.
- Murhammer DW, Goochee CF.** 1990. Structural features of nonionic polyglycol polymer molecules responsible for the protective effect in sparged animal cell bioreactors. *Biotechnol Progr* 6:142-148.
- Nielsen LK, Smythl GK, Greenfield PF.** 1991. Hemacytometer cell count distributions: implications of non-poisson behavior. *Biotechnol Prog* 7:560-563.
- Papoutsakis ET.** 1991. Media additives for protecting freely suspended animal cells against agitation and aeration damage. *Trends Biotechnol* 9:316-324.
- Racher AJ, Looby D, Griffiths JB.** 1990. Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability. *Cytotechnology* 3:301-307.
- Rakba N, Loyer P, Gilot D, Delcros JG, Glaise D, Baret P, Pierre JL, Brissot P, Lescoat G.** 2000. Antiproliferative and apoptotic effects of O-Trensox, a new synthetic iron chelator, on differentiated human hepatoma cell lines. *Carcinogenesis* 21:943-951.
- Schlaeger EJ.** 1996. The protein hydrolysate, Primatone RL, is a cost-effective multiple growth promoter of mammalian cell culture in serum-containing and serum-free media and displays anti-apoptosis properties. *J Immunol Methods* 194:191-199.
- Schmidt FR.** 2004. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:363-372.
- Schneider Y-J.** 1989. Optimization of hybridoma cell growth and monoclonal antibody secretion in chemically defined serum- and protein-free medium. *J Immunol Methods* 116:67-77.
- Schröder M, Matischak K, Fried P.** 2004. Serum- and protein-free media formulations for the Chinese hamster ovary cell line DUKXB11. *J Biotechnol* 108:279-292.
- Simonart T, Boelaert JR, Mosselmans R.** 2002. Antiproliferative and apoptotic effect of iron chelators on human cervical carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 85:95-102.
- Spens E, Häggström L.** 2005. Defined protein-free NS0 myeloma cell cultures: stimulation of proliferation by conditioned medium factors. *Biotechnol Prog* 21:87-95.
- Wurm FM.** 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotech* 22:1393-1398.

Yang M, Butler M. 2000. Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation. *Biotechnol Bioeng* 68:370-380.

2.3. Principales contributions de l'article

Les travaux présentés dans cet article ont permis de mettre en évidence l'influence de l'ajout dans le milieu RPMI sans sérum (SF-RPMI) des suppléments du milieu BDM (citrate de fer, éthanolamine et pluronic F-68) sur les paramètres de croissance et de décès cellulaires ainsi que sur le métabolisme des cellules CHO et la production de l'IFN- γ . Les résultats obtenus ont montré l'importance de l'ajout de citrate de fer (500 μ M) dans le milieu RPMI sans sérum bien que ce dernier contienne déjà de la transferrine à hauteur de 5 mg/L ainsi que 0,834 mg/L de sulfate de fer. En effet, l'ajout de citrate de fer dans le milieu SF-RPMI a permis d'obtenir une croissance cellulaire (vitesses spécifiques de croissance, densité cellulaire maximale) similaire à celle obtenue lors de cultures effectuées avec du milieu RPMI contenant 5% de sérum (FCS-RPMI). En outre, les vitesses spécifiques de consommation du glucose et de glutamine et de production de lactate et d'ions ammonium par les cellules CHO cultivées avec le milieu SF-RPMI sont inférieures à celles obtenues lorsque les mêmes cellules sont cultivées avec le milieu FCS-RPMI. Par ailleurs, une étude plus approfondie concernant le décès cellulaire a été mise en œuvre pour caractériser l'impact du citrate de fer sur ce paramètre au cours de la culture cellulaire. Ainsi, le suivi de l'apoptose cellulaire a été effectué pour les différentes conditions de culture réalisées avec le milieu RPMI sans sérum. Nous avons démontré que lorsque le citrate de fer est présent dans le milieu de culture, l'apparition de cellules apoptotiques est retardée pendant au moins 72 heures. Enfin, la supplémentation du milieu RPMI sans sérum par les 3 composés, éthanolamine, citrate de fer et pluronic F-68, a permis d'obtenir des rendements de production d'IFN- γ plus élevés lors de cultures de cellules CHO réalisées avec le milieu SF-RPMI (0,08 mg/10⁸ cellules) comparés à ceux obtenus pour les cultures réalisées en présence de sérum (0,065 mg/10⁸ cellules). En particulier, la présence de pluronic F-68 a permis d'augmenter le titre final d'IFN- γ de 60%.

2.4. Influence de l'apport en fer sur les cinétiques de croissance et de décès cellulaires, du métabolisme et de production de l'IFN- γ lors de cultures discontinues de cellules CHO 320 réalisées avec le milieu FCS-RPMI

2.4.1. Effet de l'ajout du citrate de fer dans le milieu RPMI avec sérum

2.4.1.1. Cinétiques de croissance et de décès cellulaires

L'étude cinétique et physiologique des cellules CHO cultivées avec le milieu RPMI sans sérum dans lequel ont été ajoutés 3 suppléments du milieu BDM (citrate de fer, éthanolamine, et pluronic F-68) a révélé l'importance de la présence du citrate de fer. Aussi, afin de mieux comprendre l'origine de cet effet positif, la réalisation de cultures de cellules CHO avec le milieu FCS-RPMI supplémenté par 500 μM de citrate de fer a été entreprise (Figure 45).

L'ajout de citrate de fer dans le milieu RPMI supplémenté par 5% de sérum permet-il d'améliorer les performances cinétiques de croissance et de décès des cellules CHO, leur métabolisme ainsi que la production de la protéine d'intérêt?

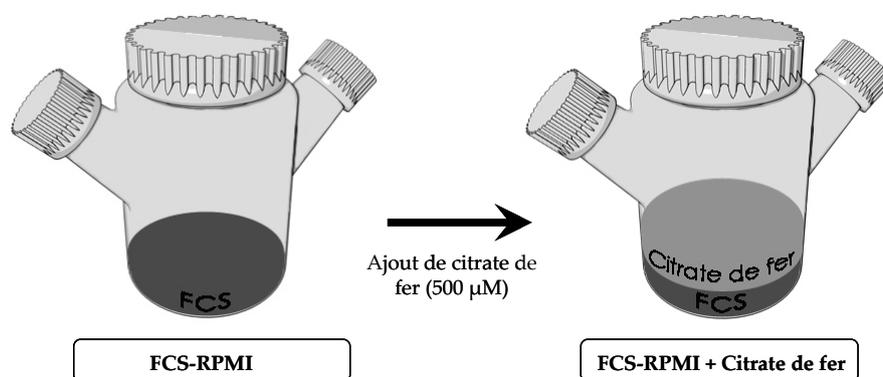


Figure 45 : Représentation schématique de la composition des milieux FCS-RPMI et FCS-RPMI supplémenté par 500 μM de citrate de fer.

L'évolution des concentrations en cellules viables et en cellules mortes au cours des cultures discontinues réalisées en flacons agités avec les milieux FCS-RPMI et FCS-RPMI contenant du citrate de fer est présentée sur la Figure 46. La densité d'ensemencement de chacune des deux cultures est de $2,5 \times 10^8$ cellules/L. Avec le milieu FCS-RPMI, comme nous l'avons vu précédemment dans le chapitre III, la densité cellulaire maximale (18×10^8 cellules/L) est atteinte après 80 heures de culture (18×10^8 cellules/L) et une phase stationnaire est

observable pendant près de 70 h (jusqu'à 150 h de culture). Ce résultat rejoint celui obtenu par Lamotte (1997) pour des cellules CHO 320 cultivées avec le milieu FCS-RPMI. Dans ce même milieu auquel 500 μM de citrate de fer ont été ajoutés dès le début de la culture, la densité cellulaire maximale atteinte est plus élevée et proche de 22×10^8 cellules/L. En effet, la phase de croissance est prolongée d'environ 10 à 20 h (Figure 46A). Toutefois, les vitesses spécifiques maximales de croissance sont similaires pour les deux conditions de culture ($0,035 \text{ h}^{-1}$) (Figure 46B).

La mort cellulaire a été évaluée de façon classique par la méthode au bleu trypan. La population de cellules mortes visibles (bleues) reste faible pendant la phase de croissance des cultures effectuées en présence ou non de citrate de fer et également pendant la phase plateau pour la culture effectuée en absence de citrate de fer. Après 160 h de culture, les cellules mortes visibles sont de l'ordre de 8×10^8 cellules/L pour la culture effectuée avec le milieu FCS-RPMI. Une concentration en cellules mortes visibles plus importante est obtenue pour la culture effectuée dans le milieu auquel ont été ajoutés 500 μM de citrate de fer (14×10^8 cellules/L). En effet, l'ajout de citrate de fer a permis d'obtenir une concentration maximale en cellules viables supérieure à la culture réalisée avec le milieu FCS-RPMI. Toutefois, après 110 h de culture, les cellules sont en phase de déclin alors qu'avec le milieu non supplémenté, la phase de déclin commence après 150 h de culture en raison d'une phase stationnaire prolongée.

Il faut néanmoins souligner que la méthode au bleu trypan ne prend pas en compte les cellules mortes lysées. L'utilisation seule de cette technique peut donc conduire à une sous-estimation, dans une proportion non négligeable, du décès cellulaire réel (Goergen *et al.*, 1993). Ainsi, la quantité de cellules lysées a été déterminée à partir de la mesure de la lactate deshydrogénase (LDH) relarguée dans le milieu de culture. D'une culture cellulaire à une autre, la cinétique de relargage de la LDH peut varier en fonction de différents paramètres tels que le type cellulaire, le pH, le taux d'oxygénation ou encore la composition du milieu de culture (Geaugey *et al.*, 1990 ; Goergen *et al.*, 1992). Puisque les cellules relarguent la totalité de cette enzyme cytoplasmique dans le milieu de culture, il est donc possible d'établir une corrélation entre l'activité LDH retrouvée dans les surnageants de culture et la concentration en cellules lysées. Pour cela, la détermination au préalable de la valeur de l'activité LDH intracellulaire des cellules CHO pour les différentes conditions de culture a été effectuée. Pour des cultures réalisées en flacons agités, une valeur moyenne de l'activité LDH intracellulaire identique pour les deux conditions de milieux a été trouvée ($770 \text{ UI} \cdot 10^{-9}$ cellules). Ces valeurs d'activité sont du même ordre de grandeur que celle déterminée pour la même lignée cellulaire CHO 320 cultivée avec le milieu BDM (Barbouche, 2008) et avec le

milieu RPMI supplémenté par du sérum (Lamotte, 1997) ; leurs valeurs étant proches de $650 \text{ UI} \cdot 10^{-9}$ cellules. Ainsi, la lyse cellulaire calculée est similaire dans les deux conditions de culture, celle-ci est négligeable en début de culture et pendant la phase de croissance cellulaire alors qu'elle est voisine de 5×10^8 cellules/L en fin de culture. Les vitesses spécifiques de lyse sont également similaires pour les deux cultures et de l'ordre de $0,008 \text{ h}^{-1}$.

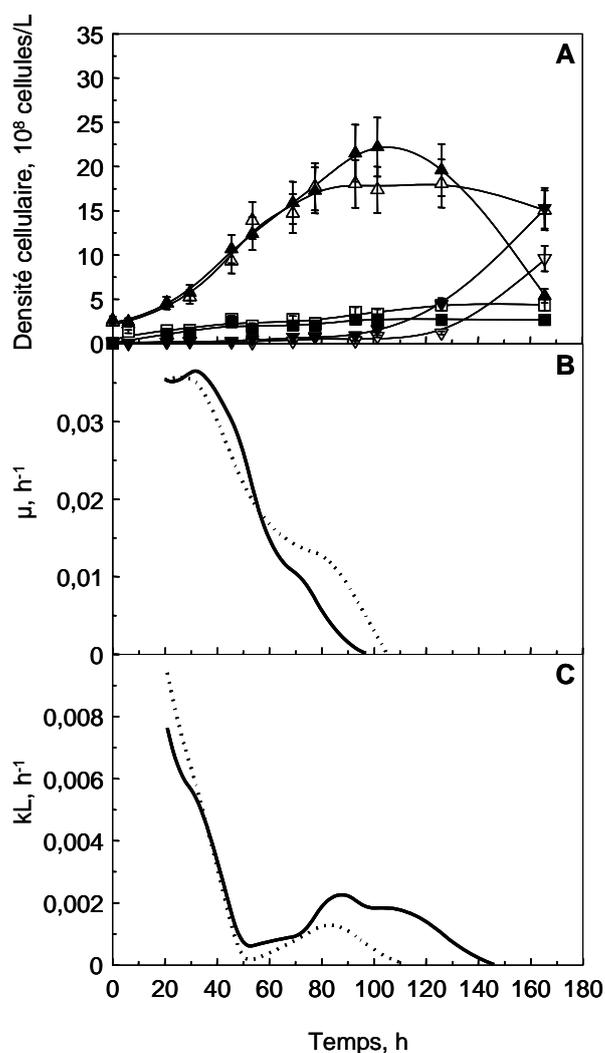


Figure 46 : (A) Cinétiques de croissance (\blacktriangle , \triangle), et de décès cellulaires (cellules mortes visibles : \blacktriangledown , \triangledown , cellules mortes lysées : \blacksquare , \square) réalisées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu FCS-RPMI en présence (symboles pleins) ou en absence (symboles vides) de citrate de fer. Vitesses spécifiques de croissance (B) et de lyse (C) des cellules CHO 320 en présence (· · · ·) ou en absence (—) de citrate de fer.

2.4.1.2. Cinétiques de production de l'IFN- γ

La Figure 47 présente les résultats concernant la production de l'IFN- γ au cours des cultures discontinues réalisées avec les milieux de culture FCS-RPMI et FCS-RPMI supplémenté par 500 μ M de citrate de fer. La production de l'IFN- γ est associée à la croissance cellulaire. Après 80 h de culture, les concentrations maximales en IFN- γ sont respectivement voisines de 0,8 et 1,1 mg/L pour les cultures effectuées avec le milieu FCS-RPMI sans citrate de fer et pour celles réalisées avec le même milieu mais contenant du citrate de fer. Au début de la culture, la vitesse spécifique maximale de production de l'IFN- γ obtenue avec le milieu supplémenté avec du citrate de fer est plus élevée que celle obtenue dans le milieu non supplémenté (0,0035 mg/10⁸ cellules/h *vs.* 0,0025 mg/10⁸ cellules/h). Ainsi, le titre final d'IFN- γ plus élevé obtenu dans le milieu FCS-RPMI supplémenté par du citrate de fer est non seulement lié à une concentration en cellules viables plus importante mais également à une production spécifique plus importante en début de culture.

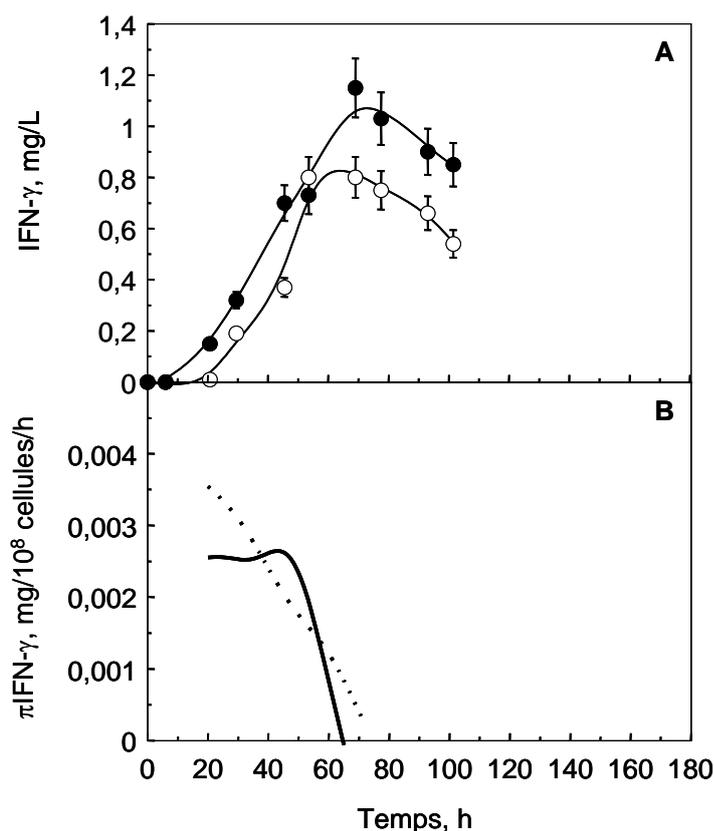


Figure 47 : (A) : Cinétiques de production de l'IFN- γ réalisées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu FCS-RPMI en absence (O) et en présence (●) de citrate de fer. (B) : Vitesses spécifiques de production de l'IFN- γ par les cellules CHO 320 cultivées avec le milieu FCS-RPMI en absence (—) et en présence (· · ·) de citrate de fer.

2.4.1.3. Cinétiques de consommation de substrats et de formation de produits

La concentration initiale en glucose est de 20 mM pour les 2 cultures discontinues réalisées avec le milieu FCS-RPMI et le milieu FCS-RPMI contenant du citrate de fer. Le glucose constituant la principale source de carbone, sa concentration décroît parallèlement à la croissance cellulaire (Figure 46A & Figure 48A). Pour les deux conditions de culture, le glucose n'est pas limitant étant donné qu'il n'est pas entièrement consommé lors de l'arrêt de la croissance cellulaire. En effet, après 80 h de culture, lors de l'arrêt de la croissance cellulaire dans le milieu FCS-RPMI, la concentration de glucose encore présente dans le milieu de culture est de 8 mM.

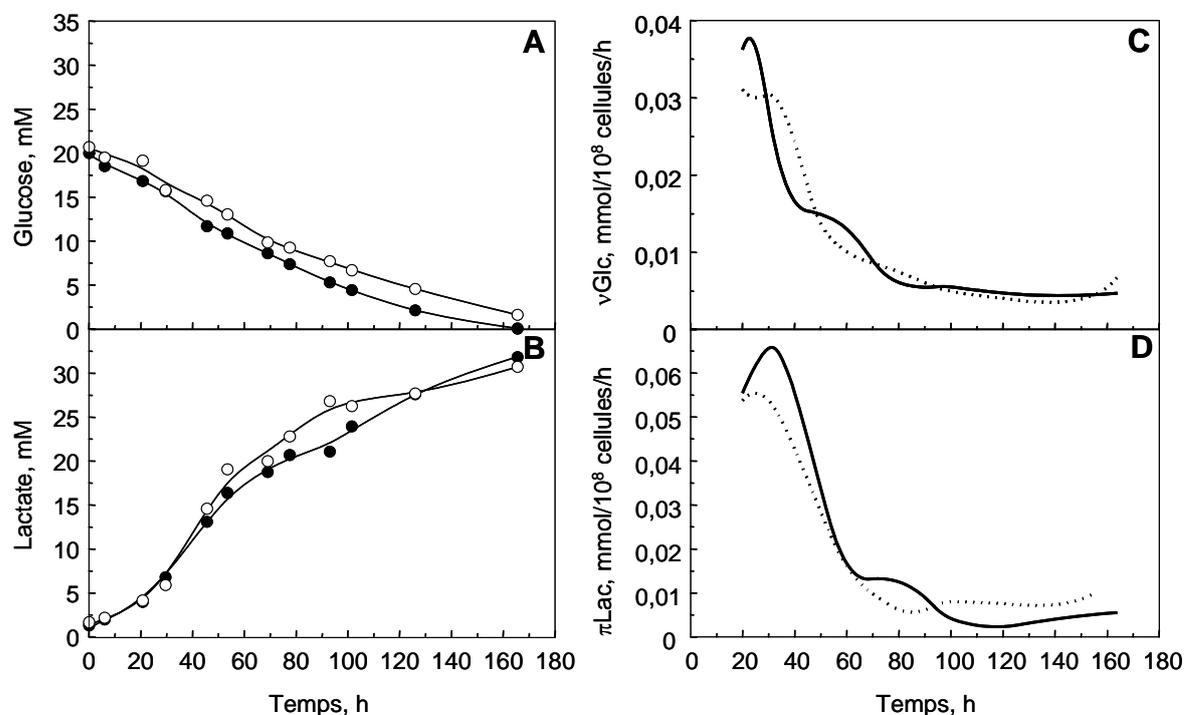


Figure 48 : (A) Cinétiques de consommation du glucose (A) et de production de lactate (B) réalisées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu FCS-RPMI en absence (○) et en présence (●) de citrate de fer. Vitesses spécifiques de consommation du glucose (C) et de production de lactate (D) par les cellules CHO 320 cultivées avec le milieu FCS-RPMI en absence (—) et en présence (⋯) de citrate de fer.

Concernant la culture supplémentée par le citrate de fer, l'arrêt de la croissance cellulaire a lieu après 100 h de culture, comme montré précédemment sur la Figure 46 ; la concentration de glucose résiduel étant de 5 mM. La concentration maximale de lactate produit en fin de

culture est similaire pour les 2 conditions de culture et voisine de 30 mM, avec des profils de vitesses spécifiques de consommation du glucose et de production de lactate identiques (Figure 48C&D). Le lactate est produit soit lors d'une saturation du cycle des acides carboxyliques, soit lors d'un dysfonctionnement de celui-ci suite à une limitation en oxygène par exemple, soit en fort excès de glucose initial. Les cellules animales transformées convertissent une grande partie du glucose consommé en lactate, ce qui apparaît comme une utilisation peu efficace de la source d'énergie disponible (Petch and Butler, 1994). Certains auteurs ont montré que la croissance des cellules CHO pouvait être inhibée par le lactate, à des concentrations supérieures à 17-18 mM (Hayter *et al.*, 1991 ; Kurano *et al.*, 1990b). Toutefois, une accumulation en lactate jusqu'à 50 mM n'a pas produit d'effet toxique visible sur la croissance d'hybridomes (Goergen *et al.*, 1992). En outre, il a été observé qu'une concentration en lactate de 30 mM n'a pas d'effet sur la vitesse spécifique de croissance des cellules CHO (Lao and Toth, 1997).

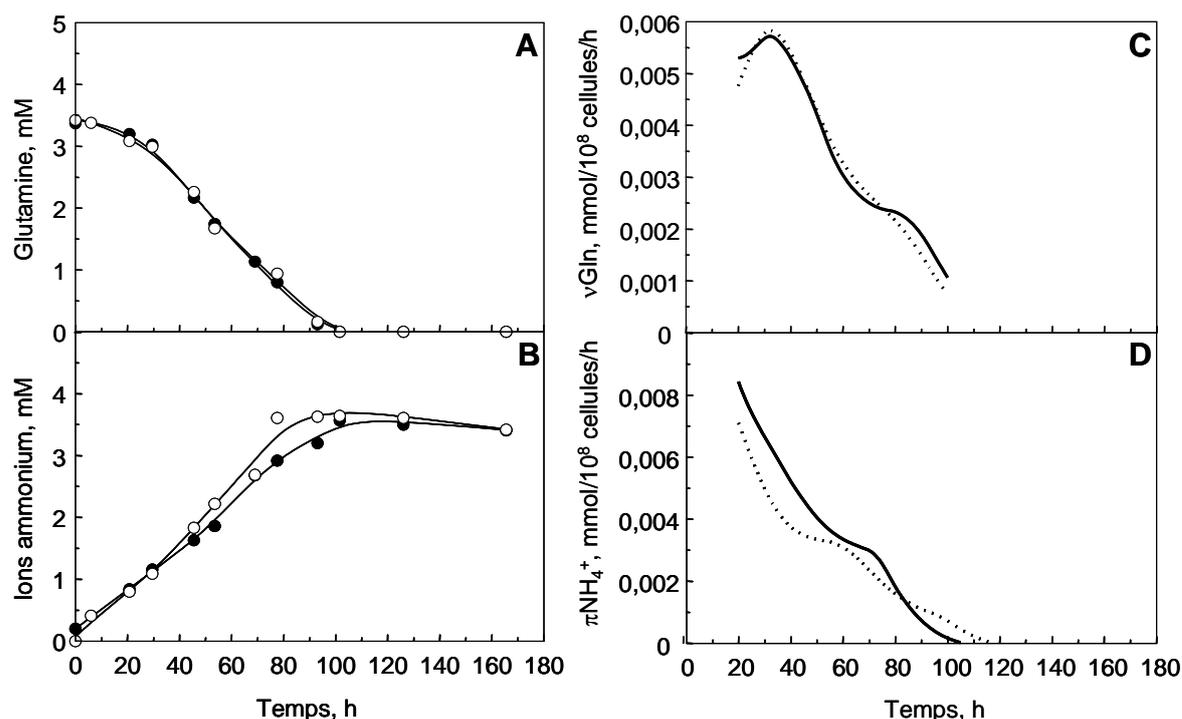


Figure 49 : Cinétiques de consommation de la glutamine (A) et de production d'ions ammonium (B) réalisées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu FCS-RPMI en absence (O) et en présence (●) de citrate de fer. Vitesses spécifiques de consommation de la glutamine (C) et de production d'ions ammonium (D) par les cellules CHO 320 cultivées avec le milieu FCS-RPMI en absence (—) et en présence (· · ·) de citrate de fer.

De la même façon que pour le glucose, la concentration en glutamine décroît à mesure que la croissance cellulaire augmente (Figure 49A). Elle atteint une valeur nulle vers 80-90 h de

culture pour les deux conditions, ce qui coïncide avec l'arrêt de la croissance cellulaire. Elle semble donc, dans les deux cas, être responsable de la phase de déclin. De même, les vitesses spécifiques de consommation de glutamine sont également similaires (Figure 49C).

La production des ions ammonium ainsi que leur vitesse spécifique de production dans le milieu supplémenté par du citrate de fer sont relativement similaires à celles obtenues dans le milieu FCS-RPMI (Figure 49B&D). Les concentrations en fin de culture sont comparables, quel que soit le milieu de culture considéré, puisqu'elles sont proches de 3,5 mM. Les ions ammonium dérivent du métabolisme de la glutamine et de sa décomposition chimique dans le milieu de culture. Ils peuvent également être produits à partir d'acides aminés autres que la glutamine mais aussi à partir du sérum de veau fœtal lorsqu'il est ajouté dans le milieu (McLimans *et al.*, 1991).

Une accumulation trop importante d'ions ammonium peut avoir un impact négatif sur les performances cinétiques des cellules, notamment car ils peuvent contribuer à l'augmentation du pH intracellulaire (Martinelle and Haggstrom, 1993 ; Schneider *et al.*, 1996). Cependant, l'effet inhibiteur des ions ammonium sur la croissance cellulaire et la production de la protéine d'intérêt varie entre les lignées cellulaires et pour une même lignée cellulaire, différentes valeurs inhibitrices ont été obtenues, probablement en raison de conditions de culture différentes et de l'historique de la lignée cellulaire (Schneider *et al.*, 1996). En ce qui concerne les cellules CHO, une réduction de 50% de la croissance cellulaire a été observée pour des valeurs de concentration en ions ammonium de l'ordre de 8 mM (Hansen and Emborg, 1994 ; Kurano *et al.*, 1990b). Hayter *et al.* (1991) ont montré que les ions ammonium étaient susceptibles d'inhiber la croissance des cellules CHO 320 pour des concentrations supérieures à 4,5 mM. Les valeurs de concentration obtenues dans notre étude (3,5 mM) ne sont donc probablement pas toxiques pour la croissance des cellules CHO. Toutefois, de telles concentrations peuvent entraîner une altération de la glycosylation de la protéine recombinante d'intérêt puisqu'il a été montré que des concentrations supérieures à 2 mM déclenchent une altération de la sialylation de l'EPO (Yang and Butler, 2000a; Yang and Butler, 2002).

2.4.2. Effet de différentes formes d'apport en fer au milieu FCS-RPMI

2.4.2.1. Cinétiques de croissance et de décès cellulaires

Au cours de l'étude précédente, nous avons montré que l'ajout de 500 μM de citrate de fer dans le milieu pauvre RPMI supplémenté par 5% de sérum permettait d'améliorer les performances cinétiques de croissance cellulaire et aussi les vitesses spécifiques de production de l'IFN- γ et donc d'augmenter le titre final d'IFN- γ produit.

Sur la base de ces résultats, nous nous sommes proposés de caractériser l'impact de différentes formes d'apport en fer dans le milieu FCS-RPMI. L'intérêt de cette démarche est de valider notre conclusion selon laquelle l'apport supplémentaire de fer dans le milieu de culture permettrait d'améliorer les performances cinétiques de croissance des cellules CHO et la production de l'IFN- γ . Par ailleurs, l'utilisation de différentes formes biodisponibles en fer permettra d'identifier celles permettant d'obtenir les meilleures cinétiques.

Bien qu'essentiel pour l'organisme, le fer peut également être toxique à des concentrations élevées en raison de son rôle dans la formation de radicaux libres au cours de la réaction de Fenton (cf. paragraphe 2.2.3.3 de la synthèse bibliographique). Chez l'homme, l'acide citrique est présent dans le sang à une concentration de 100 μM et peut servir de transporteur du fer non-hémique (Rahway, 1983). Le fer entre dans la circulation sanguine sous forme ferreux soluble, mais il est rapidement oxydé sous la forme ferrique, peu soluble qui est alors pris en charge par la transferrine ou par le système NTBI (non-transferrin bound iron – cf. paragraphe 2.2.3.3 de la synthèse bibliographique) (McKie *et al.*, 2000). Il a été montré qu'en dehors de la transferrine, les cellules animales, notamment les cellules HeLa, les fibroblastes de peau humaine, les cellules CHO ou encore les hybridomes étaient capables de transporter le fer issu de sels de fer stables par un autre système que le récepteur de la transferrine (Kovar, 1988 ; Sturrock *et al.*, 1990). En effet, par marquage radioactif du fer, certains auteurs ont montré que les cellules HeLa étaient capables d'incorporer le fer issu de sels de citrate (Sturrock *et al.*, 1990).

En termes de procédés de culture cellulaire, le citrate de fer est parfois utilisé en élément de substitution à la transferrine pour contourner la présence de protéines dans le milieu de culture. Il a notamment été utilisé pour les cultures d'hybridomes (Franek and Dolnikova, 1991 ; Kovar, 1988). En effet, il est bien connu que le fer sous forme Fe^{3+} est peu soluble et que sa solubilité est augmentée lorsqu'il est complexé avec le citrate (Gautier-Luneau *et al.*, 2007). Par ailleurs, il intervient également en tant que transporteur potentiel du fer.

La structure chimique de la complexation de l'acide citrique avec le fer est la suivante :

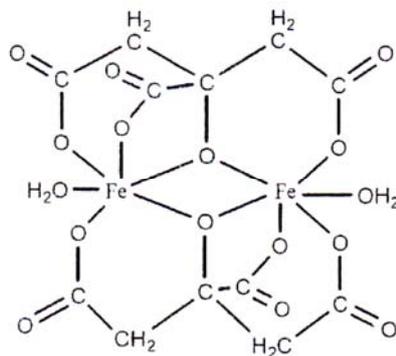


Figure 50 : Représentation de la structure chimique du citrate de fer

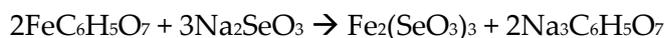
Trois formes d'apport en fer autres que le citrate de fer ont donc été utilisées au cours de cette étude:

- ✓ citrate de fer ammoniacal
- ✓ complexe citrate de fer - sélénite de sodium
- ✓ EDTA-fer

Nous avons voulu tester l'influence du citrate de fer ammoniacal sur les performances cinétiques des cellules CHO. En effet, nous avons choisi cette forme de fer puisqu'elle est, en particulier, largement utilisée dans les procédés de cultures bactériennes (Dykes and Dworaczek, 2002 ; Premaratne *et al.*, 1991). La composition chimique de ce composé est $C_6H_8O_7Fe^{3+}(NH_3)_y$, le fer représentant entre 16,5 – 18,5% de la composition finale.

En outre, il a été démontré que le citrate de fer ammoniacal, apporté en complément de la tropolone, permet de supporter dans un milieu entièrement dépourvu de protéines, une croissance des cellules NS0 comparable à celle obtenue en milieu contenant de l'albumine et de la transferrine (Dempsey *et al.*, 2003; Zhang and Robinson, 2005). La tropolone (2-hydroxy-2,4,6-cycloheptatrien-1) est également un chélateur synthétique du fer largement utilisé dans les procédés de culture cellulaire effectués avec un milieu sans sérum et sans protéine (Field, 2003 ; Metcalfe *et al.*, 1994). Enfin, certains auteurs ont montré que le citrate de fer ammoniacal permettait de supporter la croissance des cellules d'hybridomes ; toutefois avec une densité cellulaire maximale inférieure à celle retrouvée en présence de transferrine (Eto *et al.*, 1991).

Nous avons également choisi de complexer le citrate de fer avec le sélénite de sodium. En effet, il a été montré que le sélénium peut se complexer avec le fer ferrique, ce qui permettrait de former un « sélénite de fer » $\text{Fe}_2(\text{SeO}_3)_3$ selon la réaction suivante (Zhang *et al.*, 2006) :



Ainsi, le complexe formé serait transporté au travers de la membrane des cellules CHO. Le sélénium est un élément trace connu pour protéger les cellules de dommages causés suite à des stress oxydants (Patrick, 2004). En effet, le sélénium agit en tant que cofacteur pour la détoxification du peroxyde d'hydrogène en activant la glutathione peroxydase (Baker *et al.*, 1998; Helmy *et al.*, 2000; Yoshiro *et al.*, 2003). Ainsi, le sélénium est généralement ajouté dans les milieux de culture de cellules de mammifère pour ses propriétés anti-oxydantes (Guilbert and Iscove, 1976; Hewlett, 1991; Kisiday *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 1982).

La formation de ce complexe requiert des concentrations élevées de citrate de fer et de sélénite de sodium ainsi qu'une période d'incubation pendant au moins une semaine à température ambiante. Nous avons donc incubé le citrate de fer et le sélénite de sodium pendant 1 semaine à une concentration 50 fois supérieure à celle du milieu de culture (122,4 mg/L de citrate de fer et 0,008 mg/L).

Enfin, l'utilisation d'EDTA-fer comme source de fer a également été testée. La composition chimique de l'EDTA-fer est $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{NaFeO}_8$. La complexation d'une molécule d'EDTA avec un atome de fer est représentée ci-après :

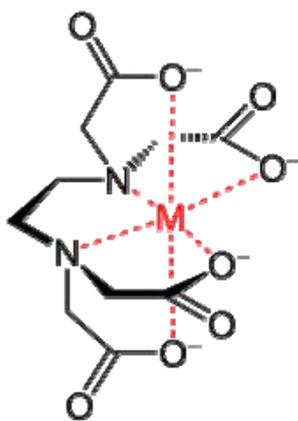


Figure 51 : Représentation de la structure chimique de l'EDTA.

L'EDTA forme avec le fer un composé très stable. L'EDTA est un agent chélatant généralement ajouté dans les procédés de culture de cellules animales pour éviter l'agrégation des cellules grâce à la chélation des ions calcium (Kim *et al.*, 2006).

Afin de comparer les 3 différentes formes de fer avec la culture réalisée avec le milieu FCS-RPMI supplémenté avec du citrate de fer, cette dernière condition de culture a été ajoutée dans l'ensemble des expériences. Des cultures discontinues de cellules CHO productrices d'IFN- γ ont donc été mises en œuvre avec quatre milieux de culture différents :

- ✓ milieu FCS-RPMI + 500 μ M de citrate de fer
- ✓ milieu FCS-RPMI + 500 μ M de citrate de fer ammoniacal
- ✓ milieu FCS-RPMI + 500 μ M du complexe citrate de fer - sélénite de sodium
- ✓ milieu FCS-RPMI + 500 μ M d'EDTA-fer

Les cinétiques de croissance cellulaire (cellules viables et mortes) au cours des cultures discontinues sont présentées sur la Figure 52. La densité d'ensemencement de chacune des quatre cultures est de $2,5 \times 10^8$ cellules/L. Les densités maximales de croissance cellulaire obtenues sont similaires pour l'ensemble des conditions de culture testées et de l'ordre de 22×10^8 cellules/L après environ 100 heures de culture, exceptée pour celle supplémentée avec du citrate de fer ammoniacal. La densité cellulaire maximale de celle-ci est de l'ordre de 18×10^8 cellules/L. Lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu FCS-RPMI supplémenté avec de l'EDTA-fer, une phase de croissance stationnaire est obtenue à partir de 110 h de culture et maintenue pendant au moins 50 h de culture. Comme déjà indiqué dans la partie précédente, cette densité cellulaire est similaire à celle obtenue pour la culture effectuée avec le milieu FCS-RPMI. Les vitesses spécifiques de croissance associées ont une allure similaire ; les vitesses spécifiques maximales avoisinant des valeurs comprises entre $0,035-0,04 \text{ h}^{-1}$ (Figure 53). La mort cellulaire, quelles que soient les conditions de culture semble identique, à l'exception de la culture réalisée en présence de l'EDTA-fer. Pour cette dernière condition, la concentration en cellules mortes visibles est négligeable tout au long du procédé. Quant aux cultures effectuées en présence de citrate de fer, et de citrate de fer associé au sélénite de sodium, la concentration en cellules mortes visibles augmente progressivement après 100h de culture, pour atteindre des valeurs proches de 20×10^8 cellules/L vers 160 heures. Les concentrations en cellules mortes visibles sont plus faibles et proches de 15×10^8 cellules/L pour les cultures contenant du citrate de fer ammoniacal. Les vitesses spécifiques maximales de décès cellulaire (kb) sont de l'ordre de $0,03 \text{ h}^{-1}$ après 130 h de culture alors qu'elles sont sensiblement plus élevées ($0,1 \text{ h}^{-1}$) lorsque le milieu de culture est supplémenté avec le complexe citrate de fer - sélénite de sodium ou avec le citrate de fer seul.

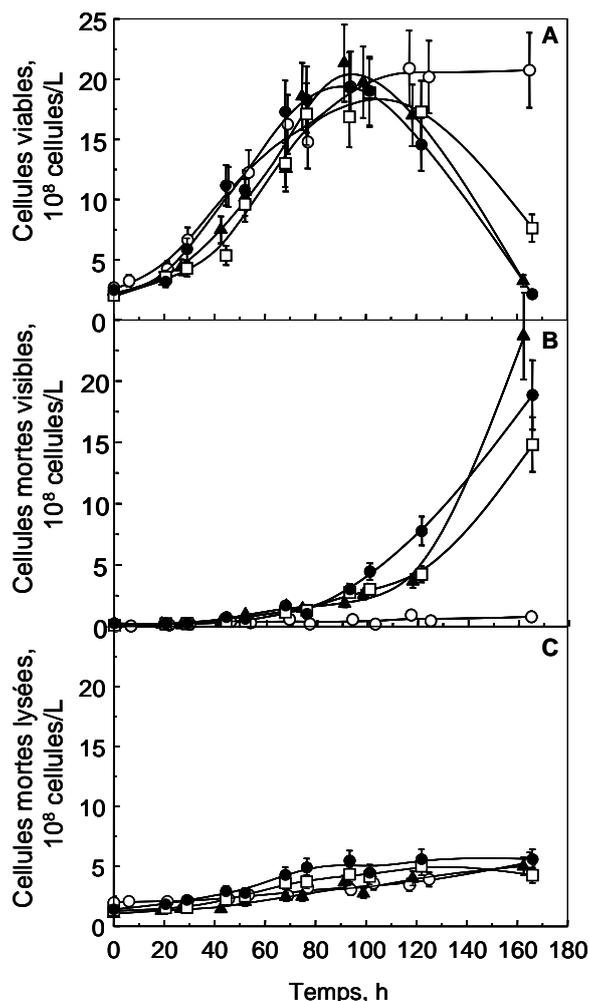


Figure 52 : Cinétiques de croissance (A) et de décès cellulaires (cellules mortes visibles (B) et cellules lysées (C)) réalisées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu FCS-RPMI en présence de citrate de fer (●), de citrate de fer ammoniacal (□), du complexe citrate de fer - sélénite de sodium (▲) et de l'EDTA-fer (○).

Dans toutes les conditions testées, la concentration en cellules lysées est similaire et inférieure à 5×10^8 cellules/L. La lyse cellulaire peut donc être considérée comme négligeable dans ces différentes conditions de culture supplémentées en fer ; les valeurs des vitesses spécifiques maximales de décès étant pour toutes les conditions inférieures à $0,006 \text{ h}^{-1}$.

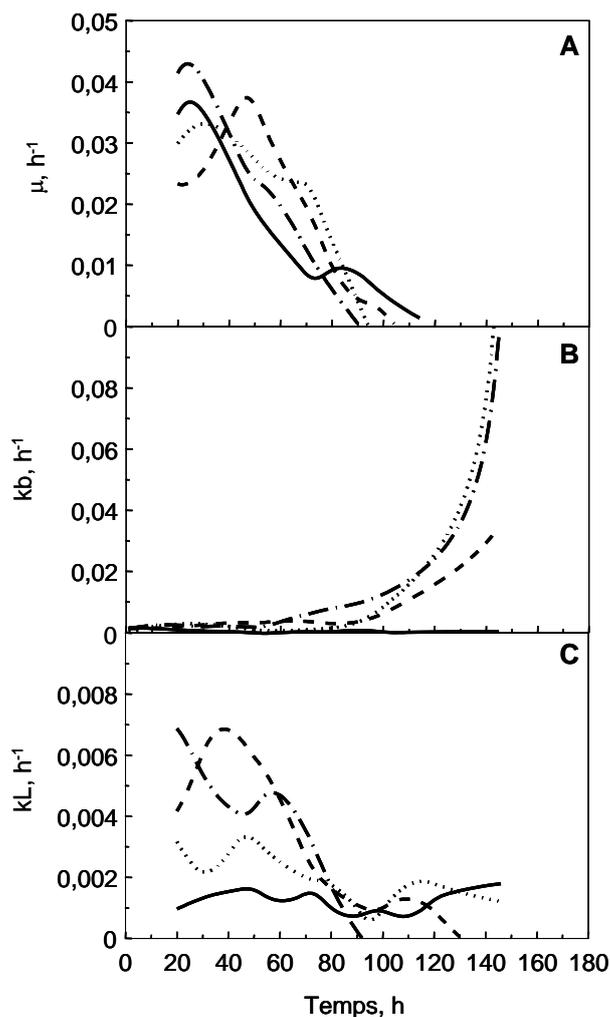


Figure 53 : Vitesses spécifiques de croissance (A) et de mort cellulaires (cellules mortes visibles (B) ; cellules mortes lysées (C)) mesurées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu FCS-RPMI en présence de citrate de fer (— ♦), de citrate de fer ammoniacal (— ■), du complexe citrate de fer - sélénite de sodium (· · · ·) et de l'EDTA-fer (—).

2.4.2.2. Cinétiques de production de l'IFN- γ

La Figure 54 présente les cinétiques de la production de l'IFN- γ réalisées au cours des cultures discontinues effectuées avec le milieu FCS-RPMI supplémenté par les différentes formes de fer. La production de l'IFN- γ est toujours associée à la croissance. Les concentrations maximales en IFN- γ sont comparables dans les milieux supplémentés avec du citrate de fer et avec le complexe citrate de fer - sélénite de sodium, de l'ordre de 1,2 mg/L. Les vitesses spécifiques maximales de production de l'IFN- γ sont également similaires, soit 0,004 mg/10⁸ cellules/h au début de la culture.

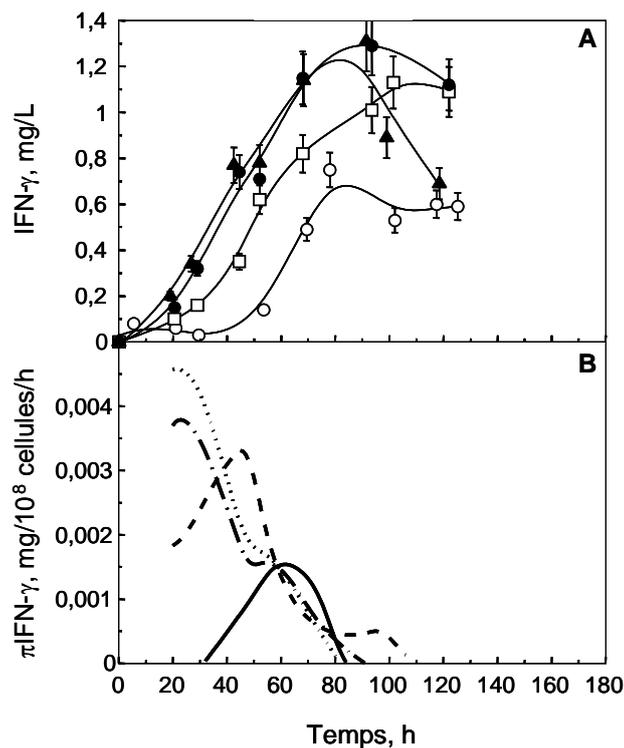


Figure 54 : (A) Cinétiques de production de l'IFN- γ réalisées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu FCS-RPMI en présence de citrate de fer (●), de citrate de fer ammoniacal (□), de complexe citrate de fer - sélénite de sodium (▲) et de l'EDTA-fer (○). (B) Vitesses spécifiques de production de l'IFN- γ par les cellules CHO 320 en présence de citrate de fer (◆), de citrate de fer ammoniacal (▤), du complexe citrate de fer - sélénite de sodium (⋯) et d'EDTA-fer (—).

Lorsque le milieu FCS-RPMI est supplémenté avec du citrate de fer ammoniacal, la vitesse spécifique maximale de production de l'IFN- γ est atteinte après 50 h de culture et est légèrement inférieure (0,003 mg/10⁸ cellules/h) à celles obtenues lorsque les cellules sont cultivées avec le milieu FCS-RPMI contenant du citrate de fer et du citrate de fer associé au sélénium. La concentration finale en IFN- γ obtenue est de l'ordre de 1,1 mg/L.

Enfin, lorsque le milieu FCS-RPMI est supplémenté avec de l'EDTA-fer, bien que la concentration maximale en cellules soit similaire à celle obtenue avec le milieu de culture supplémenté avec du citrate de fer, la production de l'IFN- γ est réduite d'un facteur 2 pour atteindre des concentrations maximales de l'ordre de 0,6-0,7 mg/L. Par ailleurs, la vitesse spécifique maximale de production de l'IFN- γ est atteinte après 60 h de culture, avec une valeur environ 3 fois inférieure (0,0015 mg/10⁸ cellules/h) à celles obtenues avec les milieux supplémentés en citrate de fer et en complexe citrate de fer - sélénite de sodium (0,004 mg/10⁸ cellules/h).

Ainsi, l'ajout d'EDTA-fer dans le milieu FCS-RPMI est défavorable à la production de l'IFN- γ . Le titre final d'IFN- γ (0,6-0,7 mg/L) est légèrement inférieur à celui obtenu lorsque la culture est réalisée avec le milieu FCS-RPMI (0,8 mg/L). En outre, une phase de latence de production de 60 h est observée lorsque le milieu de culture contient de l'EDTA-fer alors que dans la culture sans supplémentation, une phase de latence plus courte est observée (20-30 h). Il faut souligner que ce phénomène de latence de production semble être lié à l'apport d'EDTA. En effet, des cultures réalisées avec le milieu FCS-RPMI supplémenté avec 500 μ M d'EDTA ou 500 μ M d'EDTA-Zinc ont également induit une phase de latence de production de 60 h (données non montrées).

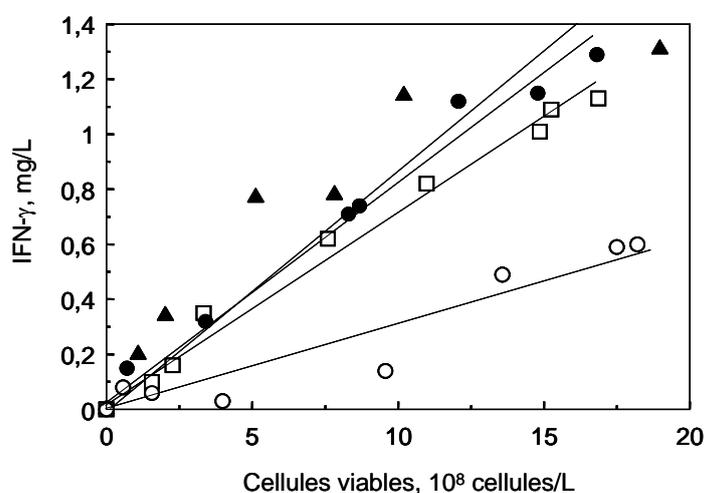


Figure 55 : Relation entre les cellules viables et la concentration de l'IFN- γ établie au cours des cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu FCS-RPMI en présence de citrate de fer (●), de citrate de fer ammoniacal (□), de complexe citrate de fer - sélénite de sodium (▲) et de l'EDTA-fer (○).

La relation entre la quantité d'IFN- γ produit et la quantité de cellules, durant les quatre cultures discontinues, est présentée sur la Figure 55. Les rendements de production d'IFN- γ des cultures supplémentées avec du citrate de fer ou avec le complexe citrate de fer - sélénite de sodium sont de l'ordre de 0,08 mg/ 10^8 cellules. Ils sont donc plus élevés que ceux obtenus avec le milieu FCS-RPMI sans supplémentation (0,065 mg/ 10^8 cellules ; cf. paragraphe 1.2.2 du chapitre III). En outre, ces deux conditions de milieu de culture permettent d'obtenir des rendements de production similaires à ceux obtenus au cours de cultures réalisées avec le milieu BDM (cf. paragraphe 1.2.2 du chapitre III). La supplémentation avec du citrate de fer ammoniacal conduit à un rendement de production légèrement moins élevé et de l'ordre de 0,07 mg/ 10^8 cellules. Enfin, le calcul du rendement de production d'IFN- γ pour la culture

réalisée avec le milieu supplémenté par de l'EDTA-fer permet de confirmer l'effet négatif de l'ajout de ce composé sur la production de l'IFN- γ . En effet, le rendement de production est diminué d'un facteur 2 par rapport à celui dans le milieu FCS-RPMI et avoisine la valeur de 0,03 mg/10⁸ cellules.

2.4.2.3. Cinétiques de consommation de substrats et de formation de produits

Toutes les cultures ont été réalisées avec une concentration initiale en glucose de 20 mM.

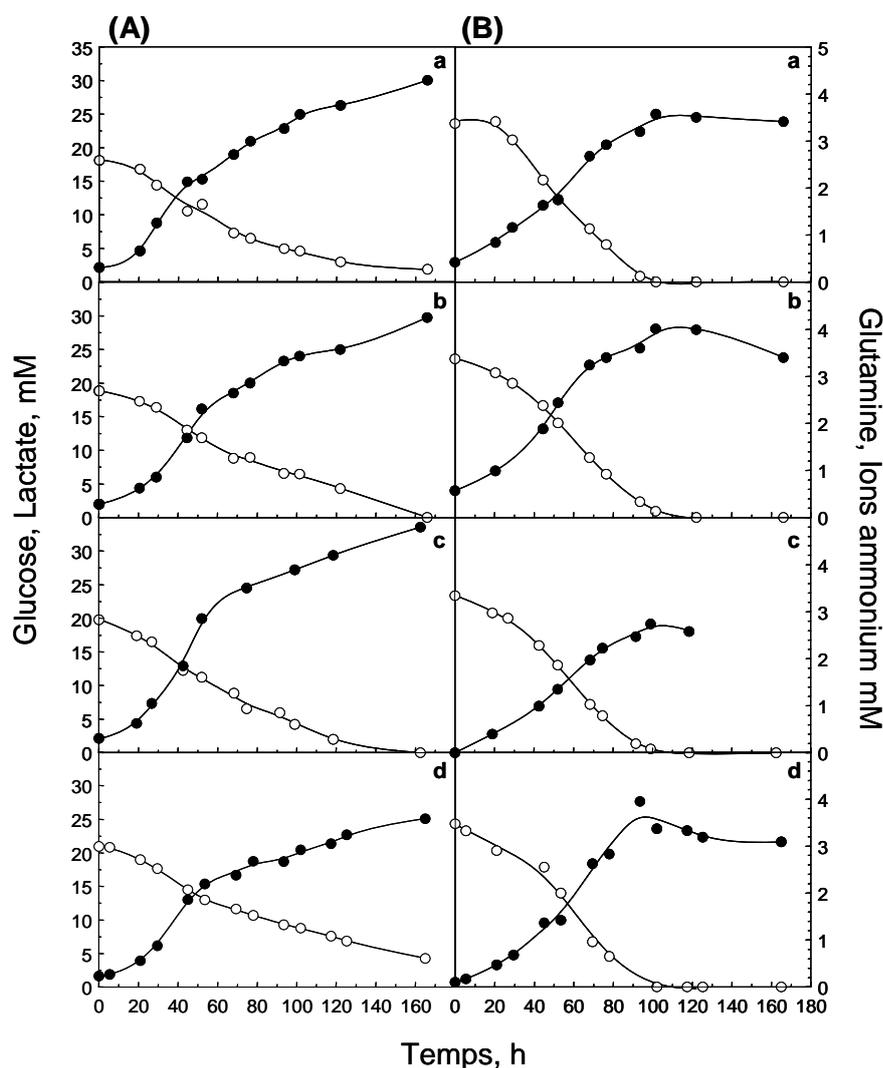


Figure 56 : (A) Cinétiques de consommation du glucose (○) et de production de lactate (●), (B) cinétiques de consommation de la glutamine (○) et de production d'ions ammonium (●) réalisées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu FCS-RPMI en présence de citrate de fer (a), de citrate de fer ammoniacal (b), de complexe citrate de fer - sélénite de sodium (c) et de l'EDTA-fer (d).

Quel que soit le milieu de culture utilisé, les cellules entrent en phase de déclin après 100 h de culture alors qu'une concentration résiduelle en glucose est encore présente dans le milieu (> 5 mM) (Figure 52 & Figure 56). L'épuisement du glucose n'est donc pas responsable de l'arrêt de la croissance des cellules.

Les concentrations finales en lactate sont du même ordre de grandeur, environ 30 mM pour l'ensemble des conditions de culture testées. Les vitesses spécifiques maximales de consommation du glucose et de production de lactate sont plus faibles en présence d'EDTA-fer par rapport aux autres conditions de culture (glucose : 0,03 mmoles/ 10^8 cellules/h *vs.* 0,04 mmoles/ 10^8 cellules/h ; lactate : 0,05 mmoles/ 10^8 cellules/h *vs.* 0,08 mmoles/ 10^8 cellules/h) (Figure 57).

Les concentrations initiales en glutamine sont de l'ordre de 3,5 mM (Figure 56). Pour toutes les cultures, la glutamine est entièrement consommée après 100 h de culture, ce qui coïncide avec l'arrêt de la croissance et le début de la mort cellulaire (Figure 52).

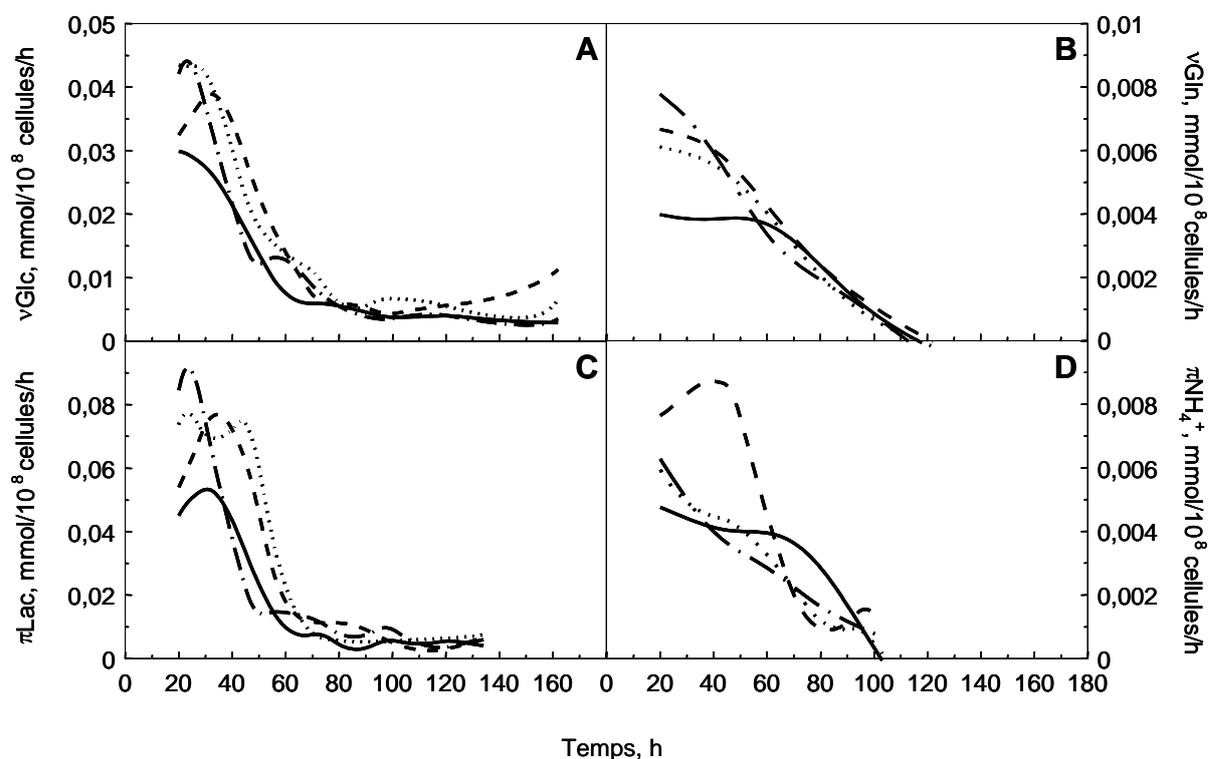


Figure 57 : Vitesses spécifiques de consommation du glucose (A), de glutamine (B) et de production de lactate (C), d'ions ammonium (D) mesurées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu FCS-RPMI en présence de citrate de fer (— ♦), de citrate de fer ammoniacal (— ■), du complexe citrate de fer – sélénite de sodium (· · · ·) et de l'EDTA-fer (—).

La glutamine semble donc être l'élément limitant qui entraîne la mort cellulaire. Pour l'ensemble des conditions testées, les concentrations maximales en ions ammonium produit sont de l'ordre de 3 à 4 mM (Figure 56).

Les vitesses spécifiques maximales de consommation de glutamine sont similaires pour l'ensemble des conditions de culture (Figure 57). En effet, les vitesses spécifiques maximales de consommation de glutamine sont proches de 0,004-0,006 mmol/10⁸ cellules/h. En ce qui concerne les vitesses spécifiques de production d'ions ammonium, les valeurs maximales sont proches de 0,004-0,006 mmol/10⁸ cellules/h pour les cultures supplémentées avec du citrate de fer et le complexe citrate de fer – sélénite de sodium.

Il faut noter que la vitesse spécifique maximale de production d'ions ammonium est proche de 0,008 mmol/10⁸ cellules/h pendant les 40 premières heures pour la culture supplémentée avec le citrate de fer ammoniacal, probablement en raison de l'apport d'ammoniac présent initialement dans le milieu de culture. Toutefois, après cette phase, les vitesses spécifiques de production d'ions ammonium pour cette culture sont comparables à celles obtenues au cours des autres conditions de culture utilisées.

2.5. Conclusions du chapitre IV

L'objectif de ce chapitre était, dans un premier temps, d'évaluer l'influence de 3 composés (citrate de fer, éthanolamine et pluronic F-68), présents initialement dans le milieu riche BDM mais absents dans le milieu pauvre RPMI, sur les cinétiques de croissance de cellules CHO 320 productrices d'IFN- γ , leur métabolisme et la production de l'IFN- γ dans le milieu de culture RPMI sans sérum développé par Hayter *et al.* (1991). Il est nécessaire de souligner que les performances cinétiques et physiologiques d'une culture discontinue de cellules CHO réalisée avec le milieu RPMI sans sérum sont réduites par rapport à une culture effectuée avec le milieu RPMI contenant du sérum (Kochanowski, 2005). Les trois suppléments ont donc été ajoutés au milieu RPMI sans sérum ; le milieu ainsi constitué étant appelé SF-RPMI. Les principaux résultats obtenus sont résumés dans la Figure 58.

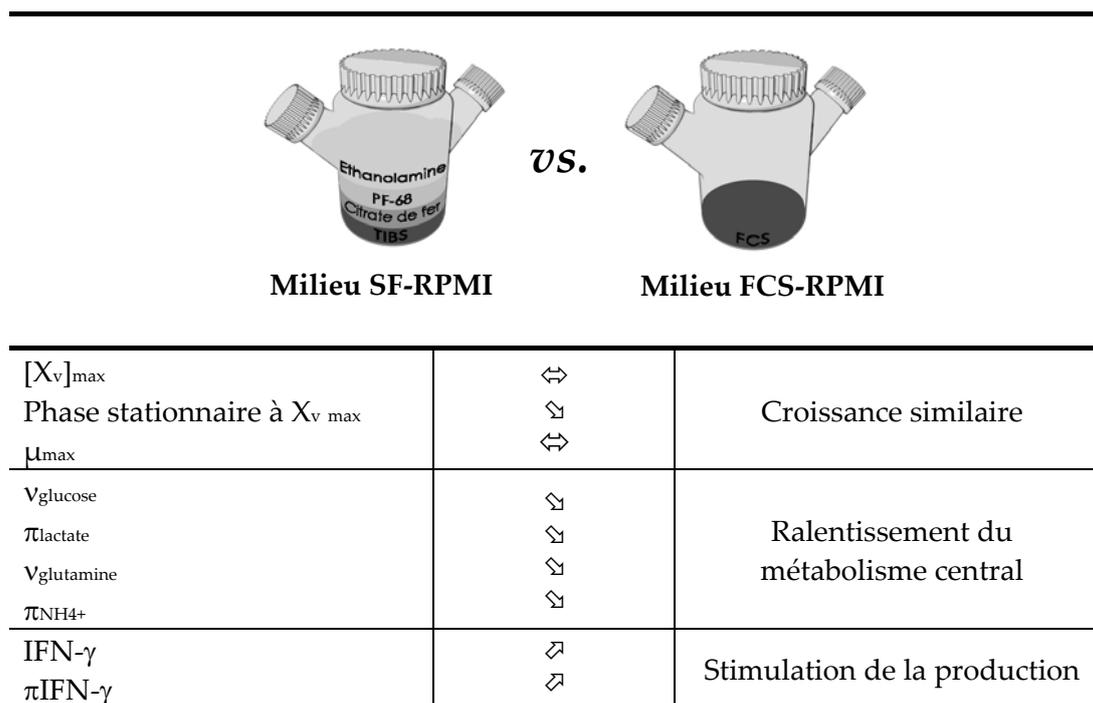


Figure 58 : Comparaison des principaux paramètres cinétiques des cellules CHO 320 cultivées avec le milieu RPMI sans sérum supplémenté avec 500 μM de citrate de fer, 750 μM d'éthanolamine et 0,1% de pluronic F-68 (SF-RPMI) par rapport à des cultures avec le milieu FCS-RPMI.

De ces résultats, il ressort que l'addition dans le milieu RPMI sans sérum de ces 3 suppléments (citrate de fer, éthanolamine et pluronic F-68) permet d'obtenir une croissance des cellules CHO similaire à celle obtenue lorsque les cellules sont cultivées en présence de sérum. De plus, les performances cinétiques du métabolisme cellulaire et de production de l'IFN- γ sont augmentées par rapport aux cultures réalisées en présence de sérum.

Ensuite, de façon à identifier plus précisément l'effet de chaque supplément, la constitution de milieux de culture contenant des combinaisons de deux suppléments ou d'un seul des suppléments à la fois a été entreprise. Les résultats de ces travaux montrent que la présence ou non de l'éthanolamine dans le milieu de culture n'a aucun impact sur les performances cinétiques des cellules CHO. En effet, l'obtention d'une croissance cellulaire comparable à celle retrouvée pour le milieu FCS-RPMI est due à l'ajout de 500 μM de citrate de fer. Pourtant, Eto *et al.* (1991) ont montré que l'ajout de 10 μM d'éthanolamine à 1,2 mM de citrate de fer permettait d'obtenir une croissance des cellules d'hybridomes comparable à celle obtenue en présence de transferrine, alors que le citrate de fer seul permettait uniquement de maintenir une viabilité cellulaire équivalente à celle en présence de transferrine. Pour les cellules CHO, la supplémentation combinée de citrate de fer et d'éthanolamine ne semble donc pas nécessaire.

Par ailleurs, une étude plus approfondie concernant le décès cellulaire a été mise en œuvre pour caractériser l'impact du citrate de fer sur ce paramètre au cours de la culture cellulaire. Nous avons démontré qu'en présence de citrate de fer dans le milieu de culture, l'apparition de cellules apoptotiques est retardée pendant au moins 72 heures par rapport à des cultures réalisées avec le milieu SF-RPMI sans citrate de fer. Ainsi, en dépit de la présence de 5 mg/L de transferrine et de 0,834 mg/L de sulfate de fer dans le milieu de culture, le citrate de fer permet d'améliorer la croissance des cellules CHO. Enfin, le surfactant PF-68 ajouté à 0,1% dans la culture permet d'augmenter de 60% le titre final d'IFN- γ .

Dans un second temps, puisque le citrate de fer a permis d'améliorer les performances cinétiques des cellules CHO cultivées avec un milieu RPMI sans sérum, nous avons étudié l'influence de l'ajout de ce dernier lorsque les cellules sont cultivées avec un milieu RPMI contenant 5% de sérum. Les principaux résultats découlant de ces travaux sont résumés dans Figure 59.

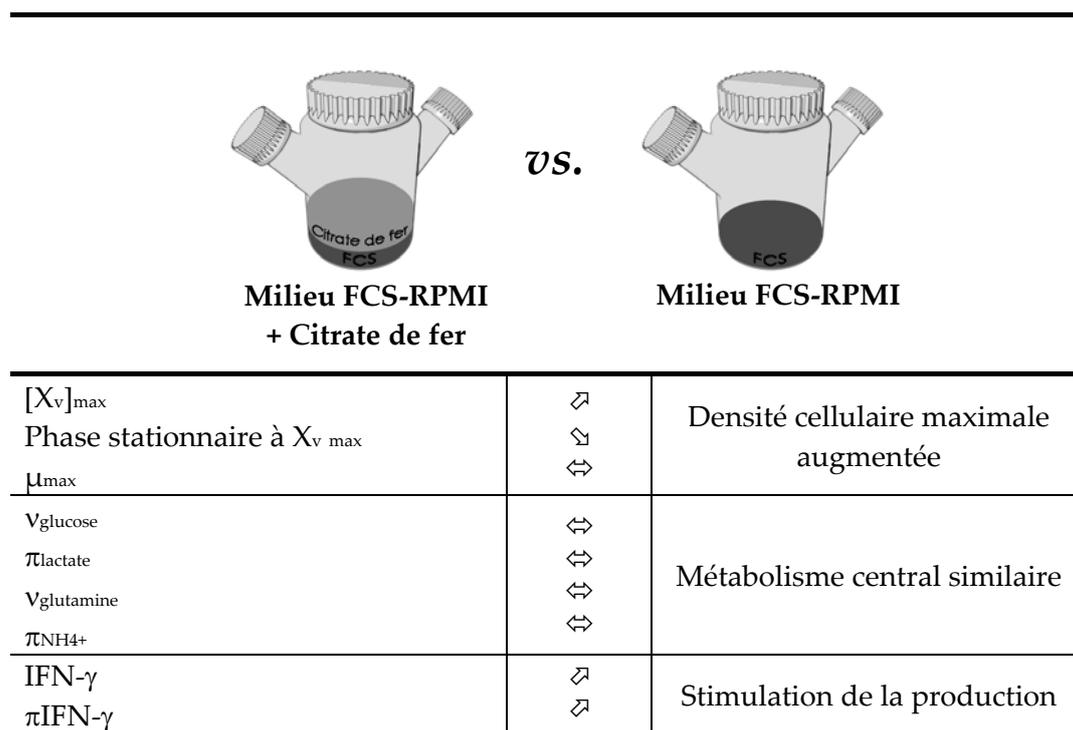


Figure 59 : Comparaison des principaux paramètres cinétiques des cellules CHO 320 cultivées avec le milieu FCS-RPMI supplémenté par 500 μM de citrate de fer par rapport aux cultures effectuées avec le milieu FCS-RPMI.

Il apparaît donc que l'ajout de citrate de fer permet d'augmenter la concentration maximale en cellules viables et le titre final d'IFN- γ . L'ajout de citrate de fer dans le milieu FCS-RPMI a

permis d'améliorer les vitesses spécifiques de production maximales d'IFN- γ ainsi que les rendements de production pour atteindre des valeurs similaires à celles obtenues dans le milieu BDM.

Enfin, dans un troisième temps, nous avons complété le milieu FCS-RPMI par différentes sources de fer : le citrate de fer ammoniacal, le complexe citrate de fer – sélénite de sodium et l'EDTA-fer. Les résultats de ces travaux montrent que le complexe citrate de fer – sélénite de sodium permet d'obtenir des performances cinétiques et physiologiques des cellules CHO comparables à celles obtenues avec le citrate de fer. L'ajout de citrate de fer ammoniacal n'a pas permis d'améliorer la croissance des cellules CHO cultivées en milieu FCS-RPMI. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Eto *et al.* (1991) qui ont montré que le citrate de fer permettait d'améliorer la croissance de cellules d'hybridomes d'une manière significative par rapport au citrate de fer ammoniacal. En revanche, le titre final d'IFN- γ obtenu est plus élevé que celui obtenu en milieu FCS-RPMI. Ceci s'explique par l'obtention de vitesses spécifiques de production plus élevées. Ainsi, de la même façon que pour le citrate de fer, le citrate de fer ammoniacal semble améliorer la productivité de l'IFN- γ . Quant à l'apport d'EDTA-fer dans le milieu FCS-RPMI, celui-ci permet d'améliorer au même titre que le citrate de fer la concentration maximale en cellules viables. En revanche, l'addition d'EDTA-fer dans le milieu de culture FCS-RPMI semble avoir un effet négatif sur la production de l'IFN- γ . En effet, une production d'IFN- γ n'était décelable qu'à partir de 60 h de culture et le titre final était près de deux fois inférieur à celui obtenu lors de cultures effectuées avec le milieu FCS-RPMI contenant du citrate de fer.

Ainsi, au regard de l'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre, le citrate de fer apparaît comme étant une forme de fer particulièrement biodisponible, permettant d'obtenir les meilleures performances cinétiques et physiologiques des cellules CHO productrices d'IFN- γ par rapport aux autres sources de fer testées. Le citrate de fer a été principalement utilisé pour la formulation de milieux sans sérum pour la culture de cellules d'hybridomes (Eto *et al.*, 1991 ; Franek and Dolnikova, 1991; Kovar and Franek, 1987 ; Kovar, 1988; Nagira *et al.*, 1995 ; Schneider, 1989). Les milieux de base tels que le BME, le GMEM, le DMEM et le RPMI ne contiennent pas de citrate de fer (Burgener and Butler, 2006). Ils sont généralement complétés par du sérum ou des protéines contenant du fer telles que la transferrine. En raison des réglementations concernant l'élimination de produits d'origine animale dans les procédés de culture cellulaire, la tendance consiste à remplacer la transferrine naturelle par de la transferrine recombinante ou par des sels de fer ; le sulfate de fer et le sulfate de fer

ammoniacal étant généralement utilisés (Burgener and Butler, 2006 ; Mortellaro and Devine, 2007) alors que très peu de compositions de milieux contiennent du citrate de fer. De plus, Mortellaro and Devine (2007) rapportent que les croissances de cellules Vero-PP, MDCK et BHK-21-PP1-C16 sont fortement réduites en présence de sulfate de fer et de sulfate de fer ammoniacal par rapport à celles retrouvées en présence de transferrine naturelle et de transferrine recombinante. Ainsi, l'utilisation de citrate de fer dans les compositions de milieux de culture supplémentés ou non par du sérum gagnerait à être davantage développée. D'après Burgener and Butler (2006), les compositions de milieux complexes pour les cultures sans sérum tels que le CMRL, le DMEM/F12, l'IMDM, le MCDB, n'incluent pas non plus de citrate de fer. Toutefois, en raison de la forte concurrence industrielle en matière de production de protéines thérapeutiques, il reste difficile de connaître précisément la présence ou non de citrate de fer dans la composition des milieux industriels faits à façon, ces derniers étant confidentiels.

Enfin, soulignons que l'influence des formes différentes de fer ajoutées au milieu FCS-RPMI sur la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ produit au cours de cultures discontinues de cellules CHO sera traité dans le chapitre VI.

Chapitre V

*Influence de la modification de la composition du milieu BDM
(suppressions/supplémentations de composés) sur la croissance, le décès
cellulaire, le métabolisme et la production de l'IFN- γ au cours de
cultures de cellules CHO 320*

CHAPITRE V

3.1. Introduction

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre III, il apparaît que la composition du milieu de culture influence la variation d'occupation des sites de glycosylation de l'IFN- γ . Contrairement aux cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu FCS-RPMI, les cultures discontinues de cellules CHO réalisées avec le milieu BDM maintiennent une glycosylation constante de l'IFN- γ tout au long du procédé. Le milieu BDM, bien qu'il soit sans sérum et sans protéine, contient une variété de molécules tout à fait intéressante (cf. Tableau 19 de la partie « Annexes »). Les acides aminés et les éléments minéraux sont présents en quantité supérieure, en comparaison avec le milieu RPMI. Cela est particulièrement vrai concernant les acides aminés tels que l'acide glutamique, l'histidine, la lysine, la phénylalanine, la proline, la thréonine, la tyrosine et la valine. D'autres acides aminés, comme l'alanine et la cystéine, sont même totalement absents dans le milieu RPMI. Des molécules comme les vitamines, les cofacteurs ou les précurseurs nucléotidiques n'entrent pas du tout dans la composition du milieu RPMI, alors qu'ils sont retrouvés en quantité non négligeable dans le milieu BDM. La plupart de ces molécules ont des concentrations supérieures à celles présentes dans le milieu de base RPMI mais également à celles présentes dans le sérum. D'autre part, le milieu BDM contient également de nombreux minéraux, tels que le magnésium, le calcium, le zinc, le cuivre ou encore le fer.

Outre ces différences de composition, le milieu BDM contient 3 composés supplémentaires, le pluronic F-68, le citrate de fer et l'éthanolamine, complètement absents dans le milieu RPMI. Parmi ces 3 composés, deux d'entre eux ont permis de formuler un milieu RPMI sans sérum dont la croissance cellulaire est comparable à celle obtenue avec le milieu FCS-RPMI et dont la production de l'IFN- γ est améliorée (cf. chapitre IV).

L'objectif du présent chapitre est donc d'étudier l'effet de ces deux composés (pluronic F-68 et citrate de fer) sur le comportement cinétique des cellules CHO cultivées avec le milieu riche BDM. De plus, nous avons également étudié l'influence de l'ajout de 5% de sérum lors de cultures cellulaires effectuées avec ce même milieu.

L'ensemble des études physiologiques et cinétiques des cellules CHO 320 a été réalisé à travers le suivi de plusieurs paramètres, à savoir la croissance et le décès cellulaires, la consommation des principaux substrats carbonés et énergétiques (glucose et glutamine), la production de catabolites (lactate et ions ammonium) et enfin la production de l'IFN- γ .

3.2. Influence de la suppression de citrate de fer sur les cinétiques de croissance et de décès cellulaires, du métabolisme et de production de l'IFN- γ au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 réalisées avec le milieu BDM

3.2.1. Cinétiques de croissance et de décès cellulaires

Trois cultures de cellules CHO ont été réalisées avec : (i) le milieu BDM (contenant 500 μM de citrate de fer), (ii) le milieu BDM sans citrate de fer et (iii) le milieu BDM sans citrate de fer, suivi d'une supplémentation en citrate de fer après 30h de culture. Les cultures de cellules CHO ont été effectuées en mode discontinu et en flacon agité. Les cellules ont étéensemencées à $2,5 \times 10^8$ cellules/L.

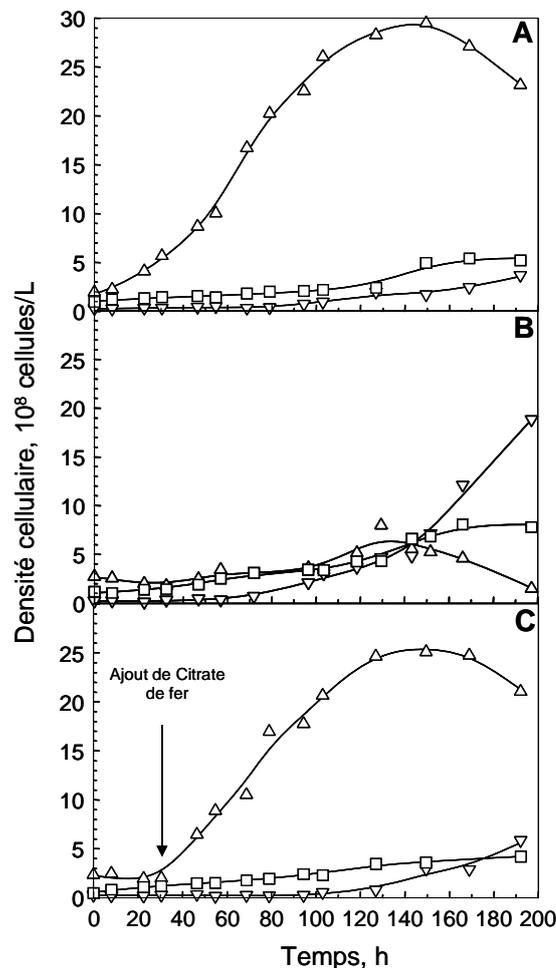


Figure 60 : Cinétiques de croissance (Δ) et de décès cellulaires (cellules mortes visibles : ∇ , cellules mortes lysées : \square) réalisées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM (A), avec le milieu BDM sans citrate de fer (B) et avec le milieu BDM sans citrate de fer durant les 30 premières heures de culture.

Avec le milieu BDM, la densité cellulaire maximale obtenue est de 30×10^8 cellules/L avec une vitesse spécifique de croissance maximale de l'ordre de $0,035 \text{ h}^{-1}$ (Figure 60 & Figure 61). Sans citrate de fer dans ce même milieu de culture, aucune croissance des cellules CHO n'a été obtenue.

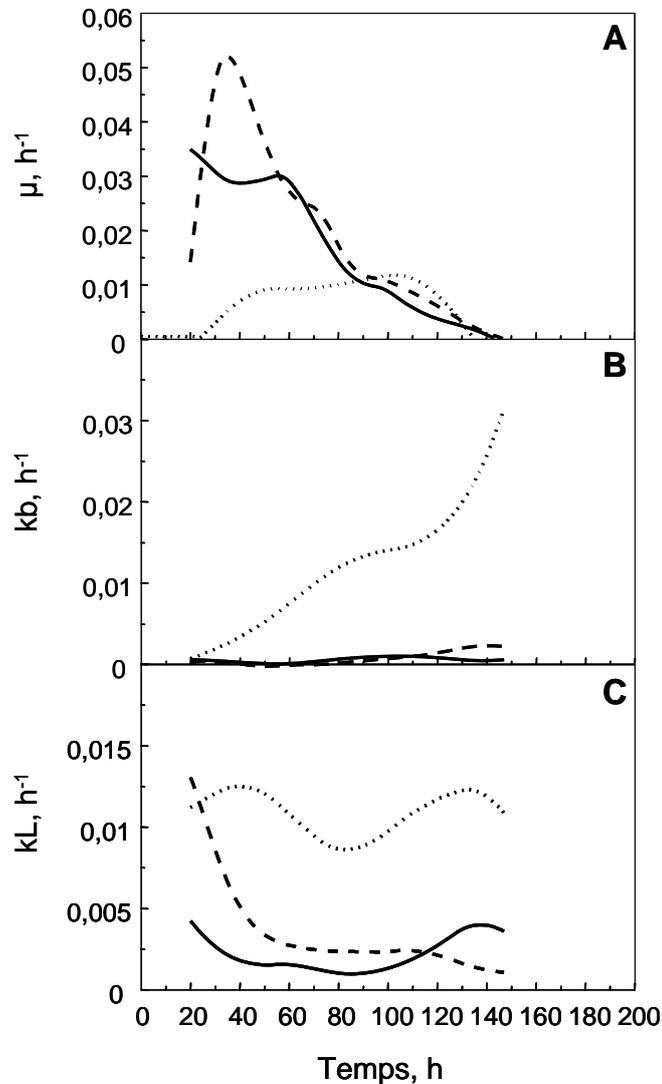


Figure 61 : Vitesses spécifiques de croissance (A) et de décès cellulaires (cellules mortes visibles (B) ; cellules mortes lysées (C)) mesurées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM (—), avec le milieu BDM sans citrate de fer (⋯) et avec le milieu BDM sans citrate de fer durant les 30 premières heures de culture (— · —).

En revanche, lorsque le citrate de fer ($500 \mu\text{M}$) est ajouté après 30 h de culture, la vitesse spécifique de croissance des cellules CHO atteint $0,05 \text{ h}^{-1}$. Cet ajout a permis de retrouver une croissance cellulaire similaire à celle obtenue avec le milieu de culture BDM. Cependant, la densité cellulaire maximale est inférieure à celle obtenue avec le milieu BDM (25×10^8 cellules/L vs. 30×10^8 cellules/L).

Lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu BDM, après 180 h de culture, les concentrations de cellules mortes visibles et de cellules lysées sont faibles et inférieures à 5×10^8 cellules/L. En absence de citrate de fer dans le milieu de culture, les concentrations en cellules mortes visibles et en cellules lysées augmentent au cours de la culture pour atteindre des valeurs respectivement proches de 10×10^8 cellules/L et 8×10^8 cellules/L après 180 h de culture. L'ajout de $500 \mu\text{M}$ de citrate de fer après 30 h d'une culture de cellules CHO effectuée avec le milieu BDM sans citrate de fer, limite l'apparition de cellules mortes puisque des valeurs faibles et similaires à celles obtenues au cours de la culture cellulaire avec le milieu BDM sont observées. Ainsi, les vitesses spécifiques des cellules mortes (k_b) et de lyse cellulaire (k_L) sont négligeables pour les cultures de cellules CHO supplémentées par $500 \mu\text{M}$ de citrate de fer, initialement présents dans le milieu BDM ou ajoutés après 30 h de culture. Il faut toutefois souligner qu'avant l'ajout de citrate de fer, la vitesse spécifique maximale de lyse cellulaire est élevée, de l'ordre de $0,012 \text{ h}^{-1}$ pour la culture de cellules CHO effectuée avec le milieu BDM ne contenant pas de citrate de fer pendant les 30 premières heures de la culture. En revanche, l'absence de citrate de fer dans le milieu de culture BDM tout au long de la culture des cellules CHO conduit au maintien de la vitesse spécifique de lyse cellulaire à hauteur de $0,012 \text{ h}^{-1}$. Pour cette même condition de culture, k_b augmente au cours de la culture pour atteindre une valeur élevée de $0,03 \text{ h}^{-1}$.

Ainsi, en absence de citrate de fer dans le milieu de culture BDM, la croissance des cellules CHO n'est plus assurée. Dans le milieu BDM, hormis le citrate de fer, une autre source de fer est présente sous forme de sulfate de fer. La biodisponibilité de cette source de fer doit donc être réduite puisqu'aucune croissance des cellules CHO n'est observée.

3.2.2. Cinétiques de production de l'IFN- γ

La Figure 62 présente les cinétiques de production de l'IFN- γ au cours de cultures discontinues de cellules CHO effectuées avec le milieu BDM et avec le milieu BDM ne contenant pas de citrate de fer pendant les 30 premières heures de culture. Quelle que soit la culture, la production de l'IFN- γ apparaît associée à la croissance des cellules CHO. Avec le milieu BDM, la concentration maximale d'IFN- γ obtenue est de l'ordre de 2 mg/L . Cette concentration maximale d'IFN- γ n'est plus atteinte lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu ne contenant pas de citrate de fer au cours des premières heures de culture. Pour cette dernière condition de culture, les vitesses spécifiques maximales de production de l'IFN- γ sont un peu plus faibles que celles obtenues au cours des cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu BDM ($0,0022 \text{ mg}/10^8 \text{ cellules/h}$ vs. $0,003 \text{ mg}/10^8 \text{ cellules/h}$). Ainsi,

l'absence de citrate de fer durant les premières heures de culture a un effet légèrement négatif sur la production de l'IFN- γ .

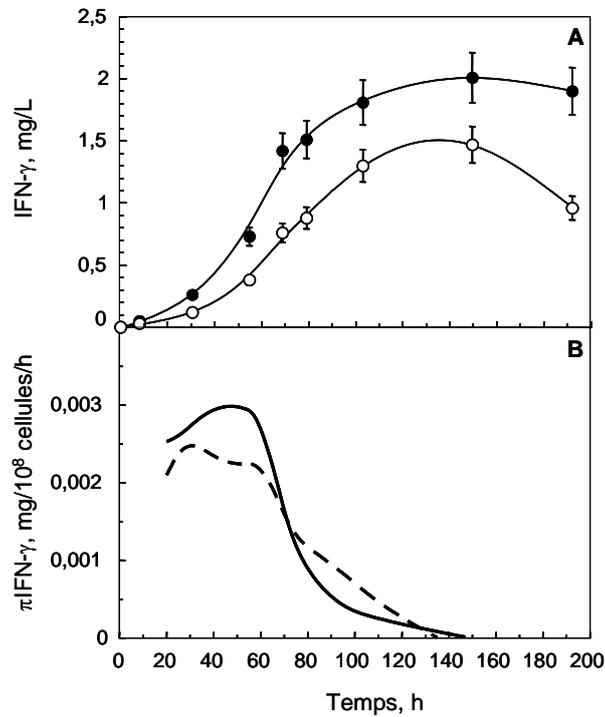


Figure 62 : (A) Cinétiques de production de l'IFN- γ réalisées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM (●) et avec le milieu BDM sans citrate de fer durant les 30 premières heures de culture (○). (B) : Vitesses spécifiques de production de l'IFN- γ par les cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM (—) et avec le milieu BDM sans citrate de fer durant les 30 premières heures de culture (- - -).

Par ailleurs, la relation entre la quantité d'IFN- γ produit et la quantité de cellules établie au cours des deux cultures discontinues, est présentée sur la Figure 63. Le rendement de production d'IFN- γ ($Y_{\text{IFN}/\text{cellule}}$), exprimé en mg/10⁸ cellules, est plus important avec le milieu BDM (0,08 mg/10⁸ cellules) qu'avec le milieu BDM ne contenant pas de citrate de fer jusqu'à 30 h de culture (0,065 mg/10⁸ cellules), ce qui montre que l'absence de citrate de fer a un effet négatif sur la quantité d'IFN- γ produit, par l'intermédiaire de la croissance mais aussi de la vitesse spécifique de production de la protéine recombinante.

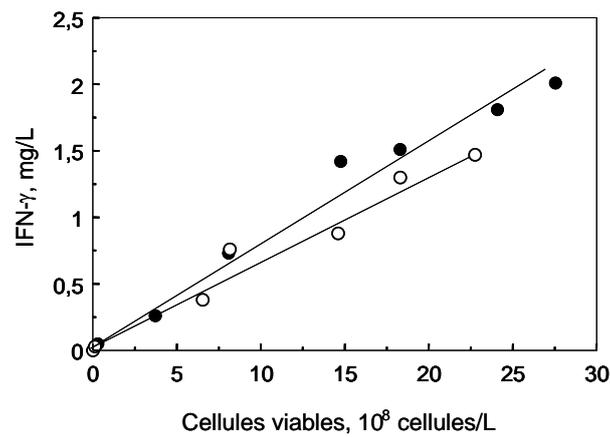


Figure 63 : Relation entre la croissance cellulaire et la concentration de l'IFN- γ établie au cours des cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM (●) et avec le milieu BDM sans citrate de fer durant les 30 premières heures de culture (○).

3.2.3. Cinétiques de consommation de substrats et de formation de produits

Toutes les cultures cellulaires ont été réalisées avec une concentration initiale en glucose de 15 mM. Quelle que soit la culture, les cellules entrent en phase de déclin après 150 h alors qu'une concentration résiduelle en glucose est encore présente dans le milieu (> 3 mM). L'épuisement du glucose n'est donc pas responsable de l'arrêt de la croissance cellulaire (Figure 64).

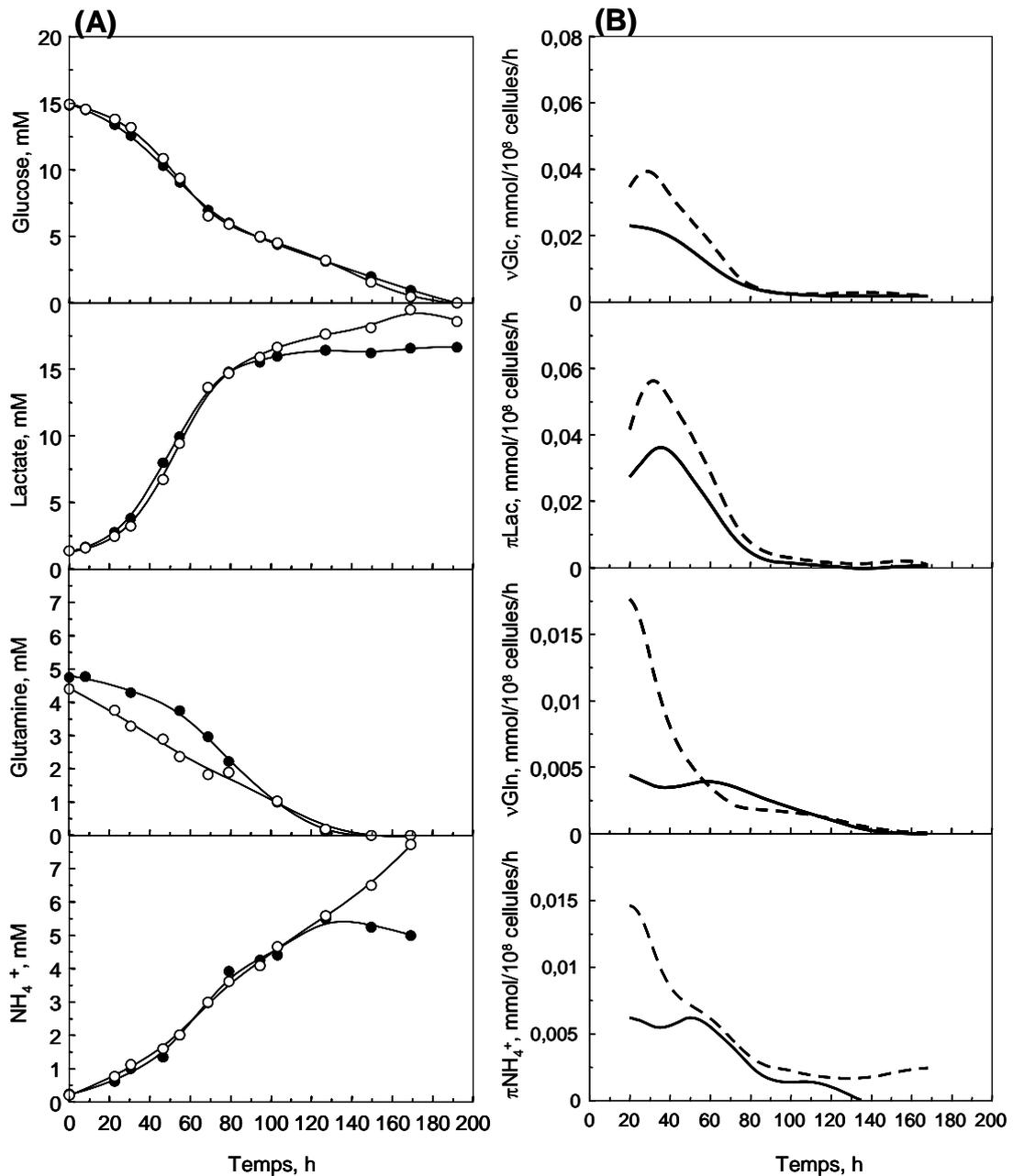


Figure 64 : (A) Cinétiques de consommation du glucose et de glutamine et de production de lactate et d'ions ammonium réalisées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM (●) et avec le milieu BDM sans citrate de fer durant les 30 premières heures de culture (○). (B) Vitesses spécifiques de consommation du glucose et de glutamine et de production de lactate et d'ions ammonium mesurées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM (—) et avec le milieu BDM sans citrate de fer durant les 30 premières heures de culture (---).

Les concentrations finales en lactate sont plus importantes pour les cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu BDM ne contenant pas de citrate de fer pendant les 30 premières

heures de culture par rapport à celles effectuées avec le milieu BDM (18 mM *vs.* 16 mM) alors même que la densité cellulaire est plus faible. Ceci se traduit par le fait que les vitesses spécifiques maximales de consommation du glucose et de production de lactate sont deux fois plus élevées lorsque les cellules sont cultivées avec le milieu BDM qui ne contient pas de citrate de fer jusqu'à 30 h que lorsque le milieu BDM est utilisé. Ces résultats sont confirmés par une concentration en lactate supérieure (24 mM) et une vitesse spécifique maximale de production trois fois plus élevée (0,14 *vs.* 0,04 mmol/10⁸ cellules/h) lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu BDM sans citrate de fer (Figure 66).

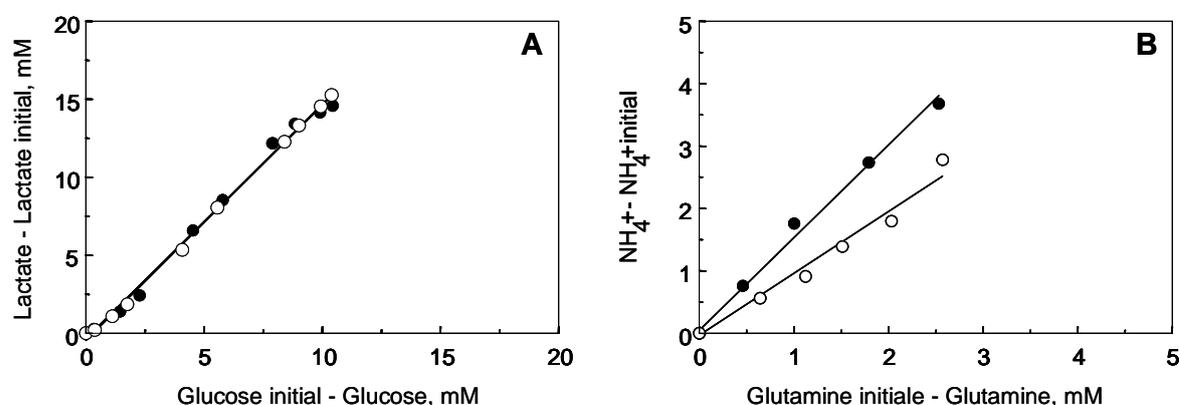


Figure 65 : Rendements de production de lactate ($Y_{Lac/Glc}$) (A) et de production d'ions ammonium ($Y_{NH_4^+/Gln}$) (B) établis au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM (●) et avec le milieu BDM sans citrate de fer durant les 30 premières heures de culture (○).

En revanche, les rendements de production de lactate sont comparables ; leur valeur étant proche de 1,45 pour les deux conditions de culture (Figure 65). Ainsi, au vue de l'ensemble de ces résultats, nous pouvons raisonnablement conclure que sans citrate de fer durant les premières heures de culture, l'utilisation du glucose demeure inchangée mais le besoin en glucose par les cellules CHO est plus important.

Les concentrations initiales en glutamine sont de l'ordre de 5 mM (Figure 64). Pour les deux cultures cellulaires, la glutamine est entièrement consommée après 140 h de culture, ce qui coïncide avec l'arrêt de la croissance des cellules CHO. La glutamine semble donc être l'élément limitant la croissance et responsable de la mort cellulaire. Les concentrations maximales en ions ammonium produits sont supérieures (8 mM *vs.* < 5 mM) et les vitesses

spécifiques maximales de consommation de glutamine et de production d'ions ammonium sont quatre fois plus élevées lorsque les cellules CHO sont cultivées en absence de citrate de fer durant les premières heures de culture. Enfin, le rendement de production d'ions ammonium $Y_{NH_4^+/Gln}$ proche de 1 lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu BDM, devient supérieur à 1 en l'absence de citrate de fer durant les 30 premières heures de la culture.

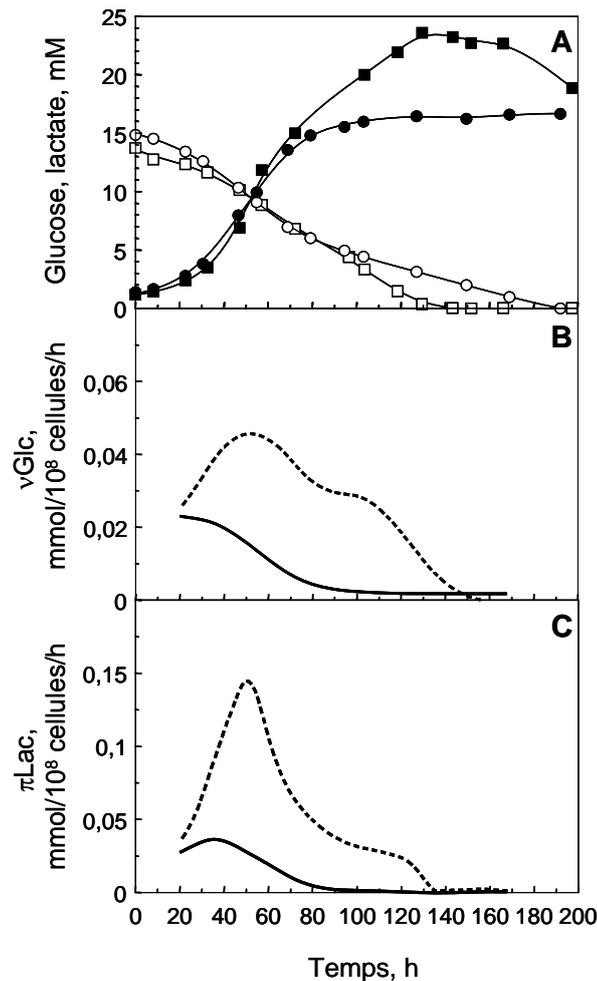


Figure 66 : (A) Cinétiques de consommation du glucose et de production de lactate réalisées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM (●) et avec le milieu BDM sans citrate de fer (■). Vitesses spécifiques de consommation du glucose (B) et de production de lactate (C) mesurées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM (—) et avec le milieu BDM sans citrate de fer (- -).

Ainsi, bien que le milieu BDM contienne du sulfate de fer, en absence de citrate de fer, aucune croissance cellulaire n'est possible. Après 30 h de culture, lorsque du citrate de fer est ajouté aux cultures de cellules CHO effectuées en absence de citrate de fer, une croissance

similaire à celle obtenue avec le milieu BDM est obtenue. Le citrate de fer constitue donc un élément indispensable dans la composition du milieu BDM ; la présence d'une diversité de molécules en vitamines, acides aminés, cofacteurs, éléments minéraux ne suffit pas à assurer la croissance cellulaire. De la même façon que pour les cultures effectuées avec le milieu FCS-RPMI (cf. chapitre IV), le citrate de fer permet de stimuler la production de la protéine recombinante (IFN- γ) en raison d'une concentration cellulaire plus élevée mais également en permettant d'augmenter les vitesses spécifiques de production de l'IFN- γ .

3.3. Etude cinétique et physiologique des cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM : influence du pluronic F-68

3.3.1. Introduction de l'article

Dans le chapitre IV, nous avons montré que la présence de pluronic F-68 (PF-68) a permis d'augmenter le titre final de l'IFN- γ de 60% lorsque les cellules CHO étaient réalisées avec le milieu pauvre SF-RPMI. Une telle influence du PF-68 se retrouve t-elle lorsque les cellules CHO sont cultivées avec un milieu de composition riche (milieu BDM), mais dépourvu de protéines ?

Ainsi, dans cet article, nous nous proposons d'étudier l'influence du tensio-actif PF-68 sur la croissance et le décès cellulaires, le métabolisme ainsi que sur la production et la qualité de l'IFN- γ produit au cours de cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu riche BDM. L'ensemble des cultures cellulaires a été effectué en fioles d'Erlenmeyer et en flacons de Roux. Contrairement aux réacteurs agités et aérés, ces deux systèmes de culture ne génèrent pas de bulles d'air dans le milieu de culture. Ainsi, l'influence de la présence du PF-68 sur les conditions physiologiques et cinétiques des cellules CHO 320 a été étudiée en absence de bulles d'air et sous faible agitation ou sans agitation.

Dans un premier temps, nous avons effectué des suivis cinétiques de la croissance et de la mort cellulaire des cellules CHO ainsi que de la production de l'IFN- γ en absence ou en présence de 0,1% de PF-68 dans des fioles d'Erlenmeyer agitées à 70 rpm. L'influence de la concentration en PF-68 (0–0,1%) a également été étudiée pour ces conditions de cultures de cellules CHO. Afin de s'affranchir des effets liés à l'agitation, des cultures agitées à 40 rpm et des cultures en flacons de Roux ont été mises en œuvre. L'étude physiologique et cinétique des cellules CHO au travers de la croissance et de la mort cellulaire mais également de la consommation des deux sources carbonées majeures (glucose et glutamine) a été réalisée. Pour ces conditions de culture, la production de l'IFN- γ a également été quantifiée et la glycosylation de l'IFN- γ a été caractérisée.

Ces résultats sont présentés en détails sous la forme d'une publication, acceptée dans le journal *Biotechnology Progress* (2010). Cette étude est complétée succinctement par la présentation des mesures en oxygène dissous obtenues au cours de cultures de cellules CHO effectuées dans les fioles d'Erlemeyer agitées à 40 et à 70 rpm en absence ou en présence de pluronic F-68.

3.3.2. Article : Influence du PF-68 sur la croissance cellulaire et le métabolisme et sur la production et la glycosylation de l'IFN- γ produit au cours de cultures de cellules CHO 320 réalisées avec le milieu BDM

Effect of surfactant pluronic F-68 on CHO cell growth, metabolism, production and glycosylation of human recombinant IFN- γ in mild operating conditions

Marie-Françoise Clincke,^{1, 2, 3} Emmanuel Guedon,¹ Frances T Yen,² Virginie Ogier,³ Olivier Roitel,³ Jean-Louis Goergen^{1*}

¹ Laboratoire Réactions et Génie des Procédés UPR-CNRS 3349, ² Lipidomix (EA4422), ENSAIA-INPL, Nancy Université, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France,

³ Genclis SAS, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Abstract

The control of glycosylation to satisfy regulatory requirements and quality consistency of recombinant proteins produced by different processes has become an important issue. With two *N*-glycosylation sites, γ -interferon (IFN- γ) can be seen as a prototype of a recombinant therapeutic glycoprotein for this purpose. In this study, the effect of the non-ionic surfactant Pluronic F-68 (PF-68) on cell growth and death was investigated, as well as production and glycosylation of recombinant IFN- γ produced by a CHO cell line that was maintained in a rich protein-free medium in the absence or presence of low agitation.

Under these conditions, a dose-dependent effect of PF-68 (0-0.1%) was shown not only to significantly enhance growth, but also to reduce cell lysis. Interestingly, supplementing the culture medium with PF-68 led to increased IFN- γ production as a result of both higher cell densities and a higher specific production rate of IFN- γ . If cells were grown with agitation, lack of PF-68 in the culture medium decreased the fraction of the fully glycosylated IFN- γ glycoform (2N) from 80% to 65-70% during the initial period. This effect appeared to be due to a lag phase in cell growth observed during this period. Finally, a global kinetic study of CHO cell metabolism indicated higher efficiency in the utilization of the two major carbon substrates when cultures were supplemented with PF-68. These results therefore highlight the importance of understanding how media surfactant can affect cell growth as well as cell death and the product quality of a recombinant glycoprotein expressed in CHO cell cultures.

Key words: Pluronic F-68 (PF-68), CHO, IFN- γ , glycosylation, kinetics.

Introduction

Development and production of biotherapeutics and particularly recombinant proteins for human use has dramatically increased over the last two decades. Currently, an estimated 120 recombinant proteins are available on the market ⁽¹⁾ and in 2008, 633 biotechnology drugs were submitted to clinical trials ⁽²⁾. Together their annual global market is now evaluated to be more than \$50 billion with sales increasing annually by about 20% ⁽³⁾. Many of those products are glycoproteins expressed in mammalian cell lines, due primarily to their ability to perform efficient post-translational modifications on proteins such as *N*-glycosylation on proteins ^(4, 5). Indeed, oligosaccharide moieties can affect the activity of the protein ⁽⁶⁾, its immunogenicity ⁽⁷⁾ and clearance ⁽⁸⁾, as well as its stability ⁽⁹⁾.

Currently, many pharmaceutical companies use CHO cells for the production of recombinant proteins because of their established track record, their performances regarding titer and quality of the recombinant protein, and their ability to grow in suspension, in large bioreactors and in complex or defined media ^(4, 10). Given the variety of potential effects of glycosylation on protein properties, a better understanding of factors that influence protein glycosylation heterogeneity is essential during the production processes. From a biopharmaceutical point of view, it appears essential to produce high quality, consistent, and efficient recombinant therapeutics throughout the processes. Parameters affecting the protein glycosylation have been widely studied during the last two decades ⁽¹¹⁻¹⁷⁾.

The variations of glycosylation may be found in the site occupancy (macroheterogeneity of glycosylation) or in the structure of attached glycans (microheterogeneity of glycosylation).

With this perspective, IFN- γ represents a useful model of recombinant therapeutic glycoprotein. IFN- γ consists of a single polypeptide with two *N*-linked glycosylation sites located at asparagine residues 25 and 97. Therefore, three possible glycoforms can be obtained: (i) doubly-glycosylated (2N); (ii) mono-glycosylated (1N); (iii) non-glycosylated (0N). Both natural and recombinant IFN- γ produced by CHO cells show heterogeneity in the degree of glycosylation ^(18, 19).

The use of serum in animal cell processes is gradually disappearing. Currently, serum-free culture with minimal protein content is state of the art in industrial processes. In addition, when using larger volumes, up to 20,000 litres ⁽²⁰⁾, hydrodynamic conditions can damage the cells and thus seriously affect production. In such media and bioreactors, and in view of the low protein content or higher shear stresses by sparging and stirring in the culture vessel, surfactants such as Pluronic F-68 (PF-68) are added to reduce the risk of cell damage ⁽²¹⁾.

Pluronic are triblock copolymers made up of hydrophilic polyethyleneoxyde (PEO) and hydrophobic polypropylene oxide (PPO) (22). PF-68, also known as Lutrol[®] F68 or Poloxamer 188, is a synthetic non-ionic surfactant with an average molecular weight of 8.4 kDa. It is widely used to protect mammalian and insect cells from sparging and agitation-related injuries in agitated and aerated bioreactors (23, 24). The pluronic block copolymer exists either in the form of unimer or micelle, depending on the concentration (25).

Two mechanisms have been proposed to explain the cell protective effect of PF-68 : (i) PF-68 can enhance the stability of foam layer on the top of the culture medium in sparged cultures, thereby reducing the cell-to-bubble attachment (26-29) and hydrodynamic forces accompanying bubble break-up (30); (ii) PF-68 could also increase the resistance of the cells to shear stresses at high agitation rates by its physical incorporation into the plasma membrane (23) and thus decreasing the plasma membrane fluidity of cells (31-33).

Interestingly, PF-68 was also shown to display biological effects in absence of hydrodynamic stresses. Cell growth was stimulated (34, 35) and fibroblast attachment to plastic surfaces increased (36) in presence of PF-68. In addition, Gigout *et al* showed that PF-68 is able to enter CHO and chondrocytes and that it accumulates in the endocytic pathway (37). However, very few data regarding the effect of Pluronic F-68 on cell metabolism and recombinant protein expression and glycosylation produced by animal cells are available in the literature.

Although complex, metabolic pathways by which a protein becomes *N*-glycosylated have been now well established (38). Initial steps occur in the endoplasmic reticulum (ER) where a 14-sugar precursor linked to a lipid carrier dolichol phosphate is transferred to an asparagine residue that is part of a consensus sequence (Asn-X-Ser/Thr, where X is not a proline) on the nascent polypeptide chain of the target protein. The maturation steps are initiated in the ER and then continue in the Golgi apparatus. The entire process of glycosylation is complex and regulated by a number of cellular factors such as expression and subcellular localization of glycosidases and glycosyltransferases (39), variable steric accessibility of glycosylation sites due to competition with protein folding (40-42), and influence of intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents (43, 44).

Therefore, the objectives of this work were to elucidate the effect of a surfactant, Pluronic F-68, independently to its shear protective properties, on IFN- γ production by CHO cells cultivated in batch mode in mild operating conditions, *i.e.*, at low agitation or in static non-agitation mode. The kinetics of CHO cell growth, death, and metabolism, as well as production and glycosylation of recombinant IFN- γ in the absence or the presence of PF-68

were studied using culture conditions of a rich protein free medium, in either non-agitated or mild agitated batch cultures.

Materials & Methods

Cell line

The CHO 320 IFN- γ producing cell line was prepared from the CHO-K1 (dhfr⁻) cell line by co-transfection with the cDNA coding for human IFN- γ and dihydrofolate reductase. The CHO cell line was previously humanized by transfection with the cDNA coding for the rat α 2,6-sialyltransferase using an *in vitro* amplification expression method⁽⁴⁵⁾. A resultant clone was selected for its ability to perform IFN- γ α 2,6-sialylation⁽⁴⁶⁾. The CHO 320 cell line is able to grow either in suspension or as monolayer attached to a surface, depending on culture conditions.

Cell culture

Prior to seeding Erlenmeyer flasks containing BDM medium with or without PF-68, the cells were grown (for at least 4 passages) in RPMI-1640 supplemented with 5% FCS in absence of PF-68. For all experiments, CHO cells were inoculated with a seeding density of 2.5×10^8 cells/L. Cells were cultivated in a rich protein free medium (BDM)⁽⁴⁷⁾, consisting in a 5:5:1 (v:v:v) mixture of Iscove's MDM (Eurobio, France), Ham's F12 (Eurobio, France) and NCTC 135 (Eurobio, France) media. BDM was supplemented with 750 μ M ethanolamine (Sigma, France), 500 μ M ferric citrate (Sigma, France) with a 1/1 Fe:citrate ratio and 0.1% PF-68 (Sigma, France). The critical micelle concentration (CMC) of PF-68 was determined at 0.1% in the culture medium at 37°C according to the Wilhelmy plate method⁽⁴⁸⁾. Initial concentrations of the major carbon and energy sources, *i.e.* glucose and glutamine were around 14 mM and 6 mM, respectively.

Non-agitated cultures were grown in 25 cm² T-flasks (Corning, The Netherlands) containing 6 ml medium. For each sample, two T-flasks were used. The cells were incubated at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. To recover cells for counting, 0.05% trypsin containing EDTA (Invitrogen, France) was used (10 min at 37°C); a solution of PBS containing 10.5% PF-68 (w/v) was added to dissociate the cell aggregates. Suspension cell cultures were performed in 500 ml Erlenmeyer flasks (Corning, The Netherlands) with an initial working volume of 100 ml. The headspace of the flasks was purged with a mixture of air-CO₂ (5%). The flasks were incubated at 37°C in an orbital shaking incubator using an amplitude of 30 mm and two low agitation rates, 40 rpm and 70 rpm (standard).

Cell counting and metabolite analysis

Samples were harvested either once or twice a day from the Erlenmeyer flasks or T-flasks. Samples were used either for immediate cell concentration determination or centrifuged (1500 rpm, 5 min) for subsequent analyses. Cell density was estimated using a

hemacytometer, and viability was measured by the trypan blue dye exclusion method with 15% CV (six repeated counts per sample) ⁽⁴⁹⁾. To evaluate total cellular death, the determination of intracellular LDH content and extracellular LDH released in the culture supernatant were performed using an enzymatic kit (ELITech, France) on a Vitalab Selectra E analyser (Vital Scientific, The Netherlands) with 10% CV. Intracellular LDH content of CHO viable cells were measured as described previously ⁽⁵⁰⁾. The intracellular values were an average from two samples taken during the exponential growth phase. Lysed cell titers were calculated as the difference between total dead cell concentration obtained from LDH assays and the concentration of trypan blue stained cells.

After centrifugation, supernatants were stored either at +4°C for LDH activity determination or at -20°C for glucose, lactate, glutamine, ammonia, and IFN- γ off-line measurements.

Glucose and lactate concentrations were determined using enzymatic kits (ELITech and Biomerieux respectively) on a Vitalab Selectra E analyser with 10% CV. Glutamine was converted into glutamate with asparaginase (Sigma, France) and glutamate was measured using an enzymatic method (Roche, France). Glutamine concentration was then calculated with 10% CV on the basis of glutamate concentration after deamination minus glutamate concentration initially present in supernatants.

Ammonia concentration was determined with a selective electrode (Orion) with 10% CV. IFN- γ titers were determined by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the human IFN- γ DuoSet kit (R&D Systems, France) with 10% CV.

Specific rates calculation

Specific rates of apparent cell growth (μ) and lysis death (k_L) or appearance of trypan blue cells (k_b), IFN- γ , lactate and ammonia production (π) as well as glucose and glutamine consumption (ν) were calculated using the following equations in batch mode:

$$\mu = \left(\frac{1}{X_v} \right) \left(\frac{dX_v}{dt} \right)$$

μ_{\max} is defined as the maximal specific rate of cell growth.

$$k_b = \left(\frac{1}{X_v} \right) \left(\frac{dX_b}{dt} \right)$$

$$k_L = \left(\frac{1}{X_v + X_b} \right) \left(\frac{dX_L}{dt} \right)$$

$$\nu = \left(\frac{1}{X_v} \right) \left(\frac{dS}{dt} \right) \text{ or } \pi = \left(\frac{1}{X_v} \right) \left(\frac{dP}{dt} \right)$$

where X_v , X_b and X_L are the viable, trypan blue dead and lysed cell densities respectively, and S and P are the concentration of substrates and products, respectively, measured during the cultures.

The yields were calculated using the following equation:

$$Y_{P/S} = \left(\frac{P_i - P_{i-1}}{S_{i-1} - S_i} \right)$$

IFN- γ site occupancy determination (macroheterogeneity)

The macroheterogeneity of IFN- γ was determined by Western-blot analysis as described previously (51). Briefly, proteins were separated by SDS-PAGE and then electrophoretically transferred to a PVDF membrane (GE Healthcare, France). After treatment with blocking solution (10 mM Tris and 150 mM NaCl, pH 8.0 containing 0.05% (v/v) Tween 20 and 5% delipidated dry milk), the membrane was then incubated for 90 min with anti-human IFN- γ (Perbio Science, France). The membrane was then washed 3 times during 10 min in 10 mM Tris and 150 mM NaCl, pH 8.0 containing 0.05% (v/v) Tween 20 and 0.5% delipidated dry milk, and further incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulins, Dako, Denmark). After washing with PBS containing 0.05% Tween 20, immunoreactions were detected using Amersham ECL™ plus Western Blotting Detection kit (GE Healthcare, France) and relative quantification of the three different glycoforms was performed by densitometry analysis using the Bio-Profil Software (Vilbert-Lourmat, France).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 5 software. Significant effects ($P < 0.05$) on the percentage of macroglycoforms were determined using the general linear model routine with univariate test of significance and a Tukey test.

Results

Effect of PF-68 on CHO cell growth, death and IFN- γ production under mild operating conditions

Effect of PF-68 in cultures of CHO cells in Erlenmeyer flasks at 70 rpm

To assess the impact of an initial PF-68 concentration of 0.1% (w/v) on CHO cells grown in standard mild operating conditions, kinetic studies were performed using Erlenmeyer flasks under standard agitation rate, *i.e.* 70 rpm, in the absence or the presence of PF-68.

Cells in PF-68 containing BDM medium grew at a maximal specific growth rate (μ_{\max}) around 0.034 h^{-1} and reached a maximal cell density of 34×10^8 cells/L after 130 h of culture (Figures 1A and 2A), while those cultivated in PF-68-free medium showed poor growth with a maximal cell density of 15×10^8 cells/L after 7 days of culture, the specific growth rate remaining lower than 0.020 h^{-1} over the entire period (Figure 2A).

In order to evaluate total cell death of these two batch processes, both intracellular LDH content and extracellular LDH released in the culture supernatant were performed. The intracellular LDH content was significantly higher for CHO cells cultivated in PF-68-free medium than in PF-68 containing medium ($780 \text{ IU} \cdot 10^{-9}$ cells *vs.* $670 \text{ IU} \cdot 10^{-9}$ cells). In both

media, the maximal concentration of trypan blue dead cells was close to 5×10^8 cells/L, whereas cell lysis in the PF-68-free medium was four times higher (18×10^8 lysed cells/L *vs.* 4.6×10^8 lysed cells/L in the absence or presence of PF-68, respectively) (Figure 1A). Indeed, the specific lysis rate of CHO cells in PF-68 containing medium remained below 0.005 h^{-1} throughout the process whereas in PF-68-free medium, this parameter reached a maximal value of 0.030 h^{-1} and was higher than 0.010 h^{-1} during the majority of the culture (Figure 2B).

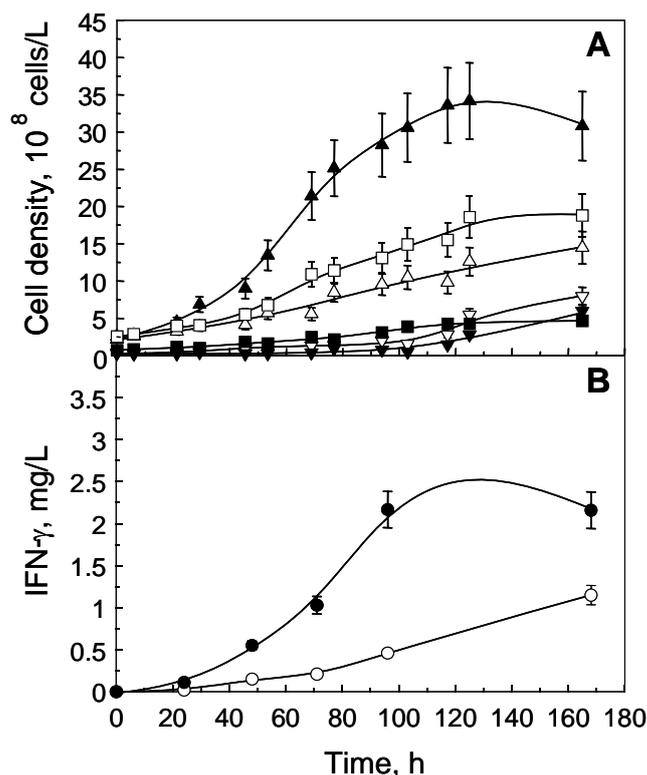


Figure 1: (A): Kinetics of viable (\blacktriangle , \triangle), trypan-blue dead (\blacktriangledown , \triangledown) and lysed (\blacksquare , \square) cells cultivated in Erlenmeyer flasks in presence (closed symbols) or in absence (open symbols) of 0.1% PF-68 surfactant at 70 rpm. (B): Kinetics of IFN- γ producing CHO cells grown in batch cultures in presence (\bullet) or in absence (\circ) of 0.1 % PF-68 surfactant at 70 rpm. Error bars correspond to the accuracy of the assays and for some values they are smaller than the symbols. The reproducibility of the cell density values was confirmed with repeated experiments ($n \geq 3$).

In both batch processes, glucose and glutamine consumption profiles were accompanied by a corresponding accumulation of lactate and ammonia in the culture medium. Interestingly, the specific rates of glucose and glutamine consumption as well as lactate and ammonia production by CHO cells were between 1.5 to 2 times lower in the PF-68-supplemented medium (data not shown).

As can be seen in Figure 1B, the final concentration of IFN- γ was significantly higher (2.2 mg/L) in PF-68 containing medium than in PF-68-free medium (1.2 mg/L), this being largely due to a higher specific production rate of IFN- γ ($\pi\text{IFN-}\gamma$) during most of the culture duration

(maximum values of $0.002 \text{ mg}/10^8 \text{ cells/h}$ *vs.* $0.001 \text{ mg}/10^8 \text{ cells/h}$ in the presence or absence of PF-68, respectively) (Figure 2C). Therefore, with a two-fold increase in IFN- γ concentration, supplementation with PF-68 not only improved the growth of CHO cells but also the IFN- γ production in cultures performed at 70 rpm.

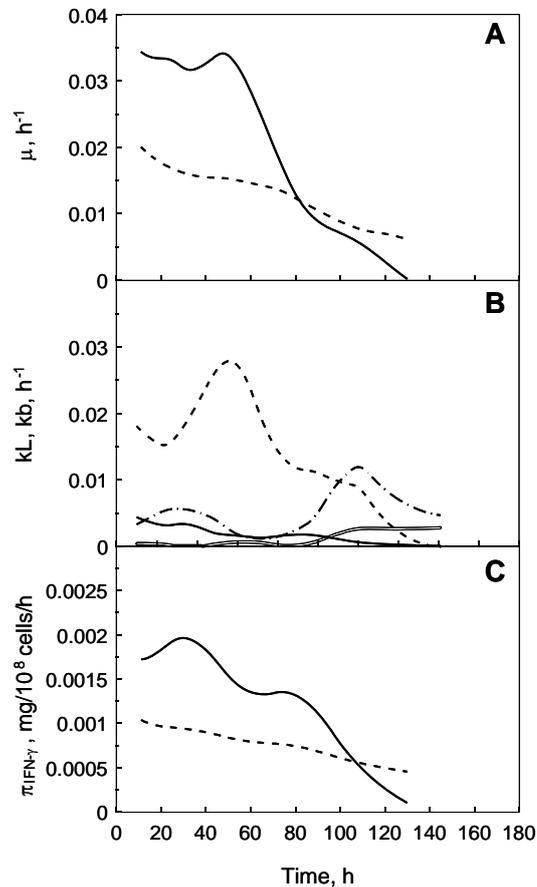


Figure 2: Calculation of the specific rates of the different batch cultures presented in Figure 1. (A) specific growth rate (μ) in presence (—) or absence (---) of 0.1% PF-68; (B) specific lysis rate (kL) in presence (—) or in absence (---) of 0.1% PF-68 and specific rate of appearance of blue dead cells (kb) in presence (—) or in absence (---) of 0.1% PF-68; (C) specific production rate of IFN- γ ($\pi_{\text{IFN-}\gamma}$) in presence (—) or in absence (---) of 0.1% PF-68.

Dose-dependent effect of PF-68

In animal cell culture media, although the usual PF-68 concentration is 0.1% (⁵²), concentrations varying from 0.05% to 0.2% can be found (⁵³, ⁵⁴). In particular, the last PF-68 concentration is strongly recommended for minimizing deleterious effects due to hydrodynamic stresses or for protecting cells from lysis as a consequence of gas sparging (⁵⁵). In an attempt to identify whether the concentration of PF-68 has an effect on the cell growth

and lysis as well as on the production of IFN- γ , CHO cells were grown in the presence of increasing concentrations of PF-68 (0%, 0.001%, 0.01% and 0.1%) with a mild agitation of 70 rpm, of which three were below the CMC of PF-68 (0.1%). It was therefore assumed that the block copolymer was mainly present as unimers for these culture conditions.

In this study, a concentration dependent effect of PF-68 on CHO cell densities was observed. As shown in Figure 3A, maximal viable cell concentrations of 22×10^8 cells/L and 30×10^8 cells/L were obtained for 0.001% and 0.01% respectively of surfactant in the medium. Those values are in-between those obtained for the cultures performed at either 0 or 0.1% PF-68. Therefore, a decrease in the maximal viable cell titer was observed when the surfactant concentration was lower in the medium. Apart from the culture performed without PF-68 (0.020 h^{-1}), all cultures displayed maximal specific growth rates (μ_{max}) approaching 0.030 h^{-1} (data not shown).

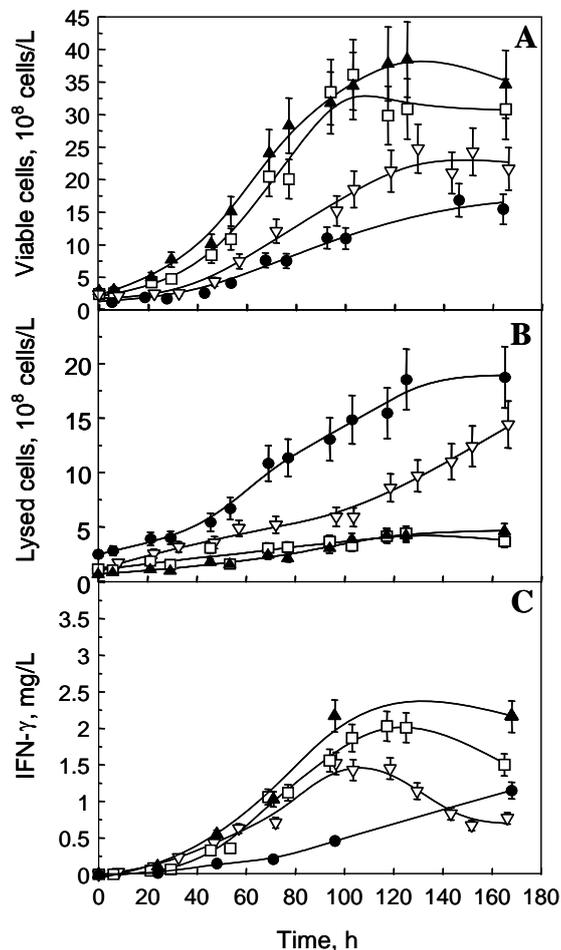


Figure 3: Kinetics of cell growth (A), cell lysis (B) and IFN- γ production (C) during CHO cell cultures performed in Erlenmeyer flasks at 70 rpm in the presence of 0.1% (▲), 0.01% (□), 0.001% (▽) and 0% (●) of PF-68. Error bars correspond to the accuracy of the assays and for some values they are smaller than the symbols ($n \geq 3$ at 0.1% and 0% of PF-68 and $n=2$ at 0.01% and 0.001% of PF-68).

For all culture conditions, the concentration of blue dead cells was negligible during the processes (data not shown). On the contrary, cell lysis was dependent on the PF-68 concentration in the culture medium (Figure 3B). Indeed, the maximal lysed cell titer was observed in absence of PF-68 (20×10^8 cells/L) and the addition of surfactant at 0.001% or between 0.01-0.1% strongly reduced the maximal cell lysis titer down to 15×10^8 and 5×10^8 cells/L respectively.

IFN- γ production profiles (Figure 3C) were closely associated with the growth of CHO cells. Indeed, when PF-68 was added in the medium, and with all PF-68 concentrations tested, maximal specific IFN- γ production rates remained almost unchanged around $0.002 \text{ mg}/10^8$ cells/h. Therefore, whatever the PF-68 concentration used, an identical increase in IFN- γ specific production rate was measured compared to the PF-68 free medium.

Effect of PF-68 in cultures of CHO cells with reduced or no agitation

In order to study the impact of the surfactant on CHO cell kinetics in culture conditions with low (40 rpm) or no agitation, additional cultures were performed in the presence or absence of 0.1% PF-68 in the culture medium, and either in Erlenmeyer flasks agitated at only 40 rpm or in non-agitated T-flasks.

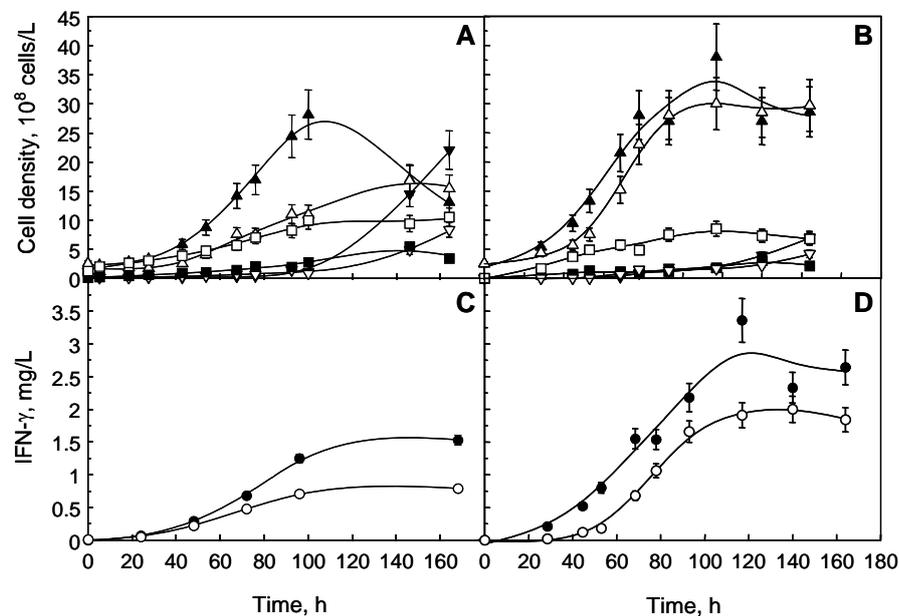


Figure 4: Kinetics of viable (▲, △), trypan-blue dead (▼, ▽) and lysed (■, □) cells cultivated in Erlenmeyer flasks in presence (closed symbols) or in absence (open symbols) of 0.1% PF-68 surfactant at 40 rpm (A) and in T-flasks (B). IFN- γ production during cultures of CHO cells grown in presence (●) or in absence (○) of 0.1 % PF-68 surfactant at 40 rpm (C) and in T-flasks (D). Error bars correspond to the accuracy of the assays and for most values they are smaller than the symbols ($n \geq 2$).

At the agitation rate of 40 rpm, and in all media tested, the maximal concentration of viable cells was reduced compared to results obtained at 70 rpm (Figure 4A). Nevertheless, as previously observed at 70 rpm, the maximal viable cell density measured during the culture performed with PF-68 was increased by almost 2-fold (+ PF-68, 28×10^8 cells/L; - PF-68 15×10^8 cells/L). Furthermore, cell lysis was higher in absence of PF-68 (+ PF-68, 3×10^8 cells/L; - PF-68, 10×10^8 cells/L after 160 h of culture) as observed at 70 rpm (Figure 4A); this was mainly due to an increase in lysis rate and to a maximal specific lysis rate 4 times higher in the absence of PF-68 (0.03 h^{-1}) than in the presence of PF-68 (0.007 h^{-1} ; data not shown).

When cells were grown in T-flask cultures, the maximal viable cell density was not affected by the presence of PF-68 (Figure 4B). However, in the absence of PF-68, a higher percentage of adherent cells was observed (around 30 % compared to less than 5%; data not shown). As for agitated cultures, cell lysis appeared to be dramatically reduced when PF-68 was used, since both the final titer of lysed cells (+ PF-68, 2.5×10^8 cells/L, - PF-68, 7×10^8 cells/L) and the maximal specific lysis rate were strongly reduced (+ PF-68, 0.007 h^{-1} ; - PF-68 0.025 h^{-1}). Therefore, in absence of agitation, CHO cell lysis was reduced in the presence of 0.1% PF-68.

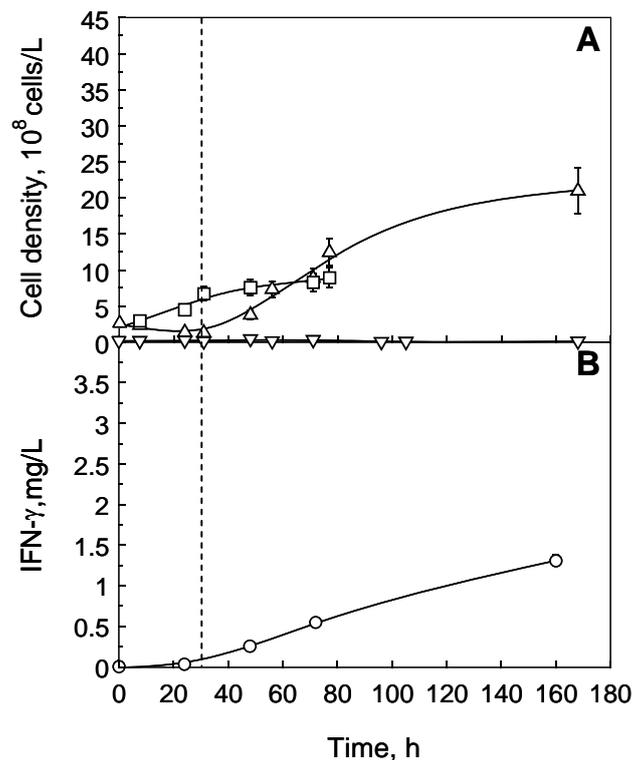


Figure 5 : (A): Kinetics of viable (Δ), trypan-blue dead (∇) and lysed (\square) cells cultivated in Erlenmeyer flasks at 40 rpm which PF-68 was added at 0.1% after 30h of culture. (B): IFN- γ production during a CHO cell batch culture at 40 rpm which PF-68 was added at 0.1% after 30 h of culture. The vertical dashed line indicates when PF-68 was added to the culture medium. Error bars correspond to the accuracy of the assays and for most values they are smaller than the symbols.

No effect of PF-68 addition on the appearance of visible trypan blue dead cells was observed in T-flasks; the concentrations of visible dead cells at the end of the cultures with or without PF-68 approached 3×10^8 cells/L. As reported for 70 rpm, specific consumption (glucose, glutamine) and production (lactate, ammonia) rates were significantly lower in presence of PF-68 (data not shown).

For all culture conditions, IFN- γ production occurred exclusively during the growth phase, but the final concentration of IFN- γ was significantly higher in cultures supplemented with PF-68 as compared to that in cultures grown without PF-68 (2-fold higher at 40 rpm and 1.5-fold higher in non-agitated cultures) (Figures 4C and 4D).

In order to test whether the addition of 0.1% PF-68 during the course of CHO cell cultures could restore both growth and IFN- γ production similar to those measured in presence of 0.1% PF-68 from the beginning of the culture at 40 rpm, PF-68 was added after 30 h during CHO cell cultures performed at 40 rpm. As can be seen in Figure 5A, a clear effect of PF-68 was observed on cell growth as the viable cell density greatly increased upon surfactant addition. Nevertheless, growth and production performances (Figure 5B) were only partially recovered as intermediate concentrations were obtained (20×10^8 cells/L and 1.2 mg/L). With regards to cell death, the addition of PF-68 after 30 h of culture maintained cell lysis at a low level. As expected, there was no effect of PF-68 on blue dead cell titer, which remained at low levels.

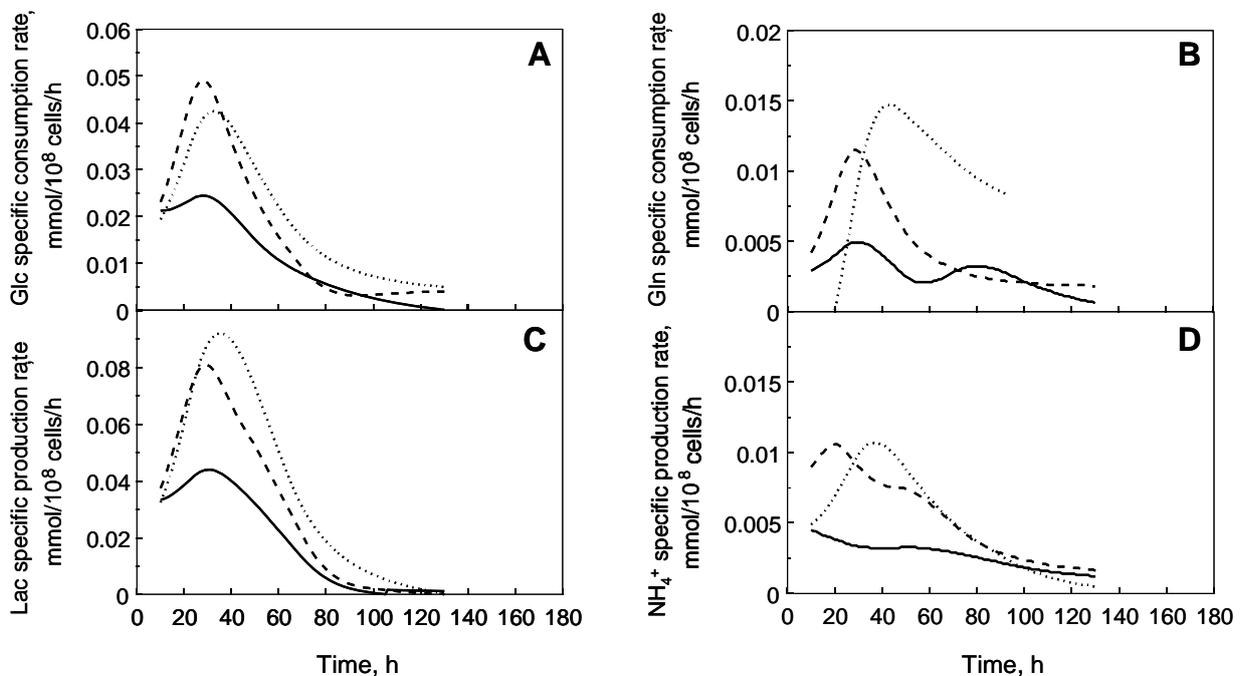


Figure 6: Specific rates of glucose (A) and glutamine (B) consumption as well as lactate (C) and ammonia (D) production during CHO cell cultures performed at 40 rpm in presence (—) of 0.1% PF-68, in absence (.....) of 0.1% PF-68 and in presence of 0.1% PF-68 added at 30h of culture (- -).

The specific rates of glucose and glutamine consumption as well as lactate and ammonia production in CHO cultures performed at 40 rpm were strongly reduced when the culture medium was supplemented with PF-68 (Figure 6). Indeed, as previously determined at 70 rpm, the maximal specific rates of substrates consumption (glucose and glutamine) and catabolites production (lactate and ammonia) were reduced by approximately 2- or 3- fold when the surfactant was added in the culture medium. Therefore, our results suggest that the addition of PF-68 promoted a change in specific rates of consumption of the main energy and carbon sources by CHO cells.

Effect of PF-68 on glycosylation site occupancy of IFN- γ

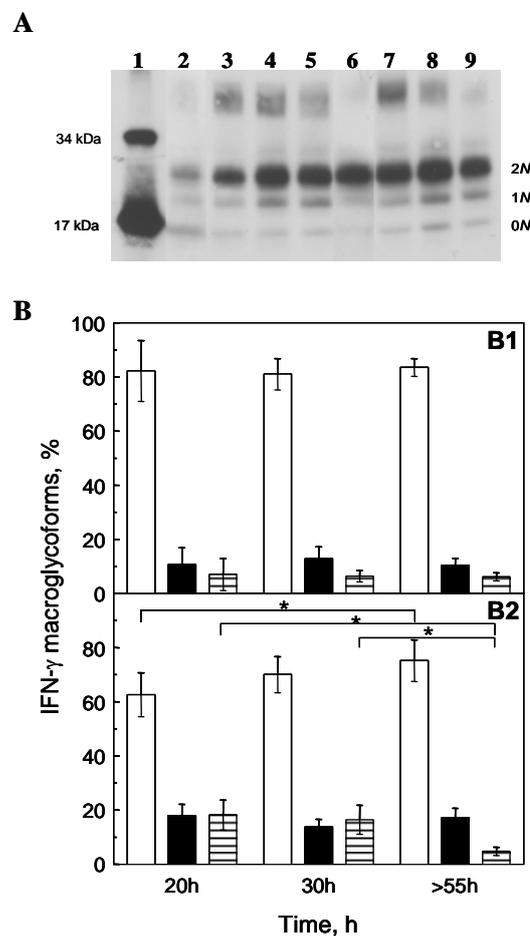


Figure 7: (A): Western-blot analysis of excreted IFN- γ . Lane 1: Non-glycosylated recombinant IFN- γ produced in *E.coli* as standard (monomer and dimer). Lanes 2 to 5: IFN- γ harvested from CHO cell cultures performed in Erlenmeyer flasks at 70 rpm in absence of PF-68 at respectively 20 h, 55 h, 70 h and 95 h. Lanes 6 to 9: from culture in presence of PF-68 at 0.1%. (B): Proportion of doubly- (□), mono- (■), and non-glycosylated (▨) recombinant IFN- γ during CHO cell cultures performed in Erlenmeyer flasks at 70 rpm in presence (B1) or in absence (B2) of 0.1% PF-68. The data shown are means from independent Western-blot (n \geq 5). The vertical lines indicate 95% confidence limits and the symbol * indicates significantly different values by Tukey statistical analysis (P < 0.05).

The macroheterogeneity of IFN- γ glycosylation produced by CHO cells cultivated in Erlenmeyer flasks at 70 rpm and in T-flasks, with or without PF-68 was monitored by Western-blot analysis. As expected ⁽⁴³⁾, three major molecular weight macroglycoforms, *i.e.* doubly-(2N), mono-(1N), and non-glycosylated (0N) IFN- γ were detected in cell culture media (Figure 7A).

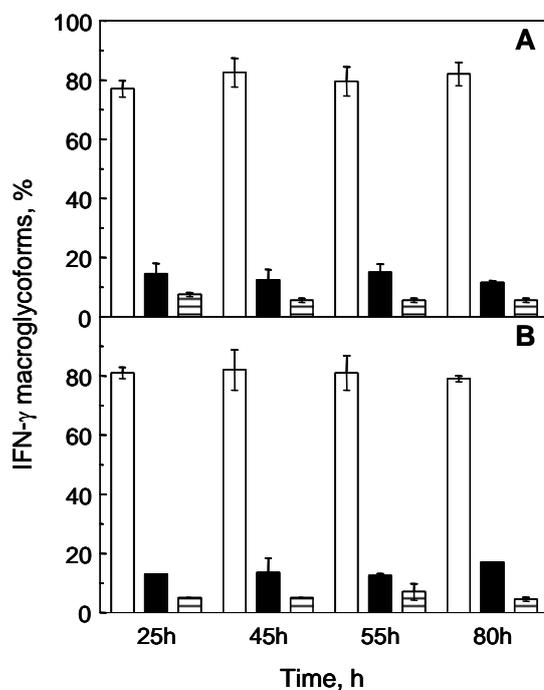


Figure 8: Proportion of doubly- (□), mono- (■), and non-glycosylated (▨) recombinant IFN- γ during CHO cell cultures performed in T-flasks in presence (A) or in absence (B) of 0.1% PF-68. The data shown are means from independent Western-blot (n = 2). The vertical lines indicate 95% confidence limits. Statistical analysis was done by using Tukey test.

During Erlenmeyer batch cultures performed at 70 rpm, the proportion of each glycoform was constant when CHO cells were cultivated in PF-68 containing medium with the majority being doubly-glycosylated IFN- γ (80% 2N, 15% 1N and 5% 0N) (Figure 7B1). On the contrary, the glycosylation site occupancy of the recombinant IFN- γ was not constant throughout the batch culture performed in medium without surfactant (Figure 7B2). In absence of PF-68 and during the first few hours of the culture, the proportion of doubly-glycosylated IFN- γ produced by CHO cells was significantly reduced (65-70%) while that of the non-glycosylated glycoform (0N) remained close to 20%. Despite this, and after 55 h, the proportion of doubly glycosylated IFN- γ increased to reach a value similar to that obtained throughout the culture performed with PF-68 (close to 80%).

Interestingly, the absence of PF-68 from the culture medium in non-agitated cultures had no effect on the glycosylation macroheterogeneity of IFN- γ , since a constant profile (80% 2N,

15% 1N and 5% 0N) was measured throughout the cultures with or without PF-68 (Figures 8A & 8B).

Discussion

The aim of this work was to evaluate the effect of the surfactant PF-68 on CHO cell growth, death and metabolism, as well as IFN- γ production and glycosylation in mild conditions (with low or without agitation) in a rich and protein free medium. During the cultures performed in this work, the shear protective effect of PF-68 to animal cells is assumed to be negligible or non-existent. Under mild agitation conditions, PF-68 caused a significant increase in cell and IFN- γ titers. Indeed, the effect of PF-68 was dependent on the concentration utilized, between 0% and 0.1%.

For the studied concentrations, PF-68 was either in the form of unimers (0.001 and 0.01%) or in the form of micelles (0.1%). Apparently, in our culture conditions, effects of PF-68 observed on both cell density and IFN- γ production were linked to the quantity of surfactant available in the culture medium rather than its unimer or micellar form.

Contrary to agitated cultures, no lag phase was observed for cultures performed in static conditions without PF-68. This might be due to different contact durations with the nutrients or growth factors present in the culture medium. Previous studies have also reported enhanced growth of fibroblasts and CHO cells in the presence of PF-68 under static conditions, but the mechanisms for this effect remain yet to elucidated (³⁴, ⁵⁶). As previously reported, in non-agitated culture conditions, the supplementation of PF-68 in the medium strongly reduced the adherence of the IFN- γ producing CHO cells from 30% to 5% (⁵⁷). Indeed, the reduced adherence may be due to a decrease in hydrophobicity of the cell membrane after PF-68 adsorption (²⁴) and/or a reduced interaction of the cells with the treated surface of the culture flask.

Compared to cultures carried out without PF-68, the apparent increase in IFN- γ production for all cultures tested might be due to a stabilization of the recombinant protein (⁵⁸), or an improvement of the specific production rate (⁵⁹). To test the first hypothesis, cultures of CHO cells producing IFN- γ were performed in BDM without PF-68. Then culture supernatants containing IFN- γ were supplemented with 0.1% PF-68 and incubated at 37°C during a week. IFN- γ was assayed daily using an Elisa test and results indicated that no difference in IFN- γ concentration was observed compared to results obtained in similar conditions but without PF-68 (data not shown).

A significant effect of PF-68 on the glucose and glutamine metabolism of CHO cells was observed in both agitated and non agitated cultures. Indeed, specific rates of glucose and glutamine consumption were significantly lower in the presence of PF-68. A recent study has clearly demonstrated that PF-68 ranging from 0.01 and 0.2 % (w/v), for both static and agitated culture conditions, is capable of being internalized by CHO cells through endocytosis ⁽³⁷⁾. Furthermore, an other type of Pluronics (Pluronic P85) was shown to enhance drug transport across cellular barriers of human colon epithelium cell line, Caco-2, and brain endothelium *via* endocytosis ^(60, 61). Indeed, during pharmaceutical formulation processes, pluronic micelles, used as drug carriers, were shown to incorporate significant quantities of many water-insoluble drugs ⁽²⁵⁾ or polynucleotides ^(62, 63). The incorporation of drugs into pluronic micelles results in increased solubility and stability of drugs. In this study, it could be hypothesized that in the presence of 0.1% in the medium at 37°C, copolymers of PF-68 would self-assemble into micelles and then, could transport solubilized media components inside CHO cells. Therefore, in our experiments, PF-68 could serve for the assimilation of nutrients present in the rich BDM culture medium, such as fatty acids, hydrophobic amino acids or ethanolamine, thus improving the bioavailability of these compounds to the CHO cells. An increase in uptake of these nutrients by the addition of PF-68 was already suggested by Mizrahi for human lymphocytes cell lines cultivated in T-flasks ⁽³⁵⁾.

In agitated cultures as well as in non-agitated culture conditions, PF-68 addition dramatically reduced cell lysis. In fact, a maximal specific lysis rate 4 times higher in the absence of PF-68 than in the presence of PF-68 was reported for all cultures. For cultures performed in Erlenmeyer flasks at 40 rpm and 70 rpm, only low shear stresses due to mechanical agitation would occur although only low shear stresses due to mechanical agitation would occur ⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾. Therefore, the effect of PF-68 on the limitation of cell lysis may be not due to its shear protective properties. The same phenomenon was observed for cultures performed in non-agitated T-flasks, and it can be suggested that the reduction of cell lysis by the addition of PF-68 was neither due to its shear-protection capabilities (agitation and adhesion of cells to bursting bubbles) nor to the type of cell culture (adhesion or suspension).

As previously described, when CHO cells were cultivated in agitated condition in BDM medium supplemented with PF-68, the degree of glycosylation of the recombinant IFN- γ was constant over the time course with the following proportion ⁽⁴³⁾: 80% 2N, 15% 1N and 5% 0N. The same phenomenon was also observed when CHO cells were cultivated in a static mode in BDM medium with or without PF-68. However, under agitated conditions, the proportion of doubly glycosylated IFN- γ produced by CHO cells cultivated in the same medium but

without PF-68 was significantly reduced (65-70%) during the first 20 hour period prior to an increase up to 80% during the exponential growth phase. This phenomenon might be due to the lag phase of the cells grown in agitated culture in the absence of PF-68. The phenomenon was not observed in T-flasks as no lag phase was measured at the beginning of the culture. Therefore, our results suggest that PF-68 could have an impact on the glycosylation process itself during the initial phase of the culture by affecting cell growth.

Conclusions

In order to increase our knowledge regarding the effects of the surfactant PF-68 on the production of a recombinant glycoprotein by CHO cells in a chemically defined medium, kinetics of cell growth, death and metabolism, as well as IFN- γ production and glycosylation were performed in batch cultures in either Erlenmeyer flasks at 70 and 40 rpm or in non-agitated culture conditions.

We have shown that even without apparent shear forces and in absence of gas sparging, supplementation with PF-68 enhanced CHO cell growth in agitated cultures and significantly reduced cell lysis whatever the culture system used. We have demonstrated a relationship between the concentration of PF-68 (0-0.1%) and the maximal CHO cell titer even for surfactant concentrations below the CMC, meaning that, at least, unimer form of PF-68 improve the growth of the cells.

It was also observed that an increase in IFN- γ produced by CHO cells occurred when PF-68 was present in the medium, as a consequence of the higher cell densities and a higher specific production rate of IFN- γ during most of the culture duration. We hypothesize that the presence of PF-68 may improve transport of nutrients others than glucose and glutamine into CHO cells, thus resulting in higher cell growth and production rates.

The glycosylation macroheterogeneity was not directly affected by the presence of PF-68 under the mild operating conditions studied. CHO cells were able to maintain a high percentage of the doubly-glycosylated glycoforms (80%) throughout the process in both agitated and T-flask cultures and with or without PF-68, provided that the cells were not in a lag phase. Since an absence of PF-68 induced a strong lag phase in agitated cultures, a reduced percentage of 2N glycoforms was measured during this initial period; therefore, an indirect effect of the culture medium composition was observed on the consistency of the glycosylation profile of IFN- γ .

Nomenclature

BDM	Protein-free basal defined medium
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMC	Critical micelle concentration
CV	Coefficient of variation
FCS	Fetal Calf Serum
Glc	Glucose
Gln	Glutamine
IFN- γ	Recombinant human interferon gamma
Lac	Lactate
LDH	Lactate dehydrogenase
NH ₄ ⁺	Ammonia
PF-68	Pluronic F-68
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium

Aknowledgements

This work was financed by the Agence Nationale pour la Recherche Technique (ANRT) and Genclis SAS (Vandoeuvre-lès-Nancy, France). The authors also acknowledge Frédérique Marchal and Mickael Crégut for technical help and statistical analysis of the results, as well as B.E. Bihain for continuous support throughout the project.

References

1. Dingermann T. Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. *Biotechnol J.* 2008;3:90-97.
2. PhRMA (2008) Biotechnology Research Continues to Bolster Arsenal Against Disease with 633 Medicines in Development. www.phrma.org
3. Matasci M, Hacker DL, Baldi L, Wurm FM. Recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: current status and future prospects. *Drug Discov Today: Technologies.* 2009;5:37-42.
4. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotech.* 2004;22:1393-1398.
5. Butler M. Animal cell cultures: Recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;68:283-291.
6. Shields R, Lai J, Keck R, O'Connell L, Hong K, Meng Y, Weikert S, Presta L. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc γ RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem.* 2002;277:26733-26740.
7. Jefferis R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol Prog.* 2005;21:11-16.
8. Egrie JC, Dwyer E, Browne JK, Hitz A, Lykos MA. Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater *in vivo* potency than recombinant human erythropoietin. *Exp Hematol.* 2003;31:290-299.
9. Wyss D, Wagner G. The structural role of sugars in glycoproteins. *Curr Opin Biotechnol.* 1996;7:409-416.
10. Schmidt FR. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;65:363-372.
11. Lamotte D. Production et glycosylation de l'interféron-gamma humain par des cellules CHO cultivées en bioréacteurs discontinus et perfusés. Influence des conditions opératoires et du potentiel de glycosylation des cellules. PhD Thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL), Nancy, 1997.

12. Goldman MH, James DC, Rendall M, Ison AP, Hoare M, Bull AT. Monitoring recombinant human interferon-gamma N-glycosylation during perfused fluidized-bed and stirred-tank batch culture of CHO cells. *Biotechnol Bioeng.* 1998;60:596-607.
13. Nyberg GB, Balcarcel RR, Follstad BD, Stephanopoulos G, Wang DIC. Metabolic effects on recombinant interferon-g glycosylation in continuous culture of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng.* 1999;62:336-347.
14. Borys MC, Linzer DI, Papoutsakis ET. Culture pH affects expression rates and glycosylation of recombinant mouse placental lactogen proteins by Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Nat Biotechnol.* 1993;11:720-724.
15. Jenkins N, Castro P, Menon S, Ison A, Bull A. Effect of lipid supplements on the production and glycosylation of recombinant interferon- γ expressed in CHO cells. *Cytotechnology.* 1994;15:209-215.
16. Yang M, Butler M. Effects of Ammonia and Glucosamine on the Heterogeneity of Erythropoietin Glycoforms. *Biotechnol Prog.* 2002;18:129-138.
17. Ferrari J, Gunson J, Lofgren J, Krummen L, Warner TG. Chinese hamster ovary cells with constitutively expressed sialidase antisense RNA produce recombinant DNase in batch culture with increased sialic acid. *Biotechnol Bioeng.* 1998;60:589-595.
18. Rinderknecht E, O'Connor BH, Rodriguez H. Natural human interferon-gamma. Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation. *J Biol Chem.* 1984;259:6790-6797.
19. Mutsaers JHGM, Kamerling JP, Devos R, Guisez Y, Fiers W, Vliegthart JFG. Structural studies of the carbohydrate chains of human g-interferon. *Eur J Biochem.* 1986;156:651-654.
20. Nienow AW. Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology.* 2006;50:9-33.
21. Van der Pol L, Tramper J. Shear sensitivity of animal cells from a culture-medium perspective. *Trends in Biotechnol.* 1998;16:323-328.
22. Ahmed F, Alexandridis P, Neelamegham S. Synthesis and application of fluorescein-labeled pluronic block copolymers to the study of polymer-surface interactions. *Langmuir.* 2001;17:537-546
23. Murhammer DW, Goochee CF. Structural features of nonionic polyglycol polymer molecules responsible for the protective effect in sparged animal cell bioreactors. *Biotechnol Progr.* 1990;6:142-148.
24. Ghebeh H, Gillis J, Butler M. Measurement of hydrophobic interactions of mammalian cells grown in culture. *J Biotechnol.* 2002;95:39-48.
25. Kabanov AV, Alakhov VY. Pluronic Block Copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2002;19:1-72.
26. Meier SJ, Hatton TA, Wang DIC. Cell death from bursting bubbles: Role of cell attachment to rising bubbles in sparged reactors. *Biotechnol Bioeng.* 1999;62:468-478.
27. Michaels JD, Nowak JE, Mallik AK, Koczko K, Wasan DT, Papoutsakis ET. Analysis of cell-to-bubble attachment in sparged bioreactors in the presence of cell-protecting additives. *Biotechnol Bioeng.* 1995;47:407-419.
28. Chattopadhyay D, Rathman JF, Chalmers JJ. The protective effect of specific medium additives with respect to bubble rupture. *Biotechnol Bioeng.* 1995;45:473-480.
29. Jordan M, Sucker H, Einsele A, Widmer F, Eppenberger HM. Interactions between animal cells and gas bubbles: The influence of serum and Pluronic F-68 on the physical properties of the bubble surface. *Biotechnol Bioeng.* 1994;43:446-454.
30. Dey D, Boulton-Stone JM, Emery AN, Blake JR. Experimental comparisons with a numerical model of surfactant effects on the burst of a single bubble. *Chem Eng Sci.* 1997;52:2769-2783.
31. Ramirez OT, Mutharasan R. The role of the plasma membrane fluidity on the shear sensitivity of hybridomas grown under hydrodynamic stress. *Biotechnol Bioeng.* 1990;36:911-920.
32. Michaels JD, Petersen JF, McIntire LV, Papoutsakis ET. Protection mechanisms of freely suspended animal cells (CRL 8018) from fluid-mechanical injury. Viscometric and bioreactor studies using serum, pluronic F68 and polyethylene glycol. *Biotechnol Bioeng.* 1991;38:169-180.
33. Murhammer DW, Goochee CF. Scaleup of insect cell cultures: Protective effects of pluronic F-68. *Bio/Technology.* 1988;6:1411-1418.

34. Bentley PK, Gates RMC, Lowe KC, de Pomerai DI, Walker JAL. *In vitro* cellular responses to a non-ionic surfactant, Pluronic F-68. *Biotechnol Lett.* 1989;11:111-114.
35. Mizrahi A. Pluronic polyols in human lymphocyte cell line cultures. *J Clin Microbiol.* 1975;2:11-13.
36. Hokett SD, Cuenin MF, O'Neal RB, Brennan WA, Strong SL, Runner RR, McPherson JC, Van Dyke TE. Pluronic polyol effects on human gingival fibroblast attachment and growth. *J Periodontol.* 2000;71:803-809.
37. Gigout A, Buschmann MD, Jolicoeur M. The fate of Pluronic F-68 in chondrocytes and CHO cells. *Biotechnol Bioeng.* 2008;100:975-987.
38. Kornfeld R, Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* 1985;54:631-664.
39. Paulson JC, Colley KJ. Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem.* 1989;264:17615-17618
40. Allen S, Naim HY, Bulleid NJ. Intracellular folding of tissue-type plasminogen activator. Effects of disulfide bond formation on N-linked glycosylation and secretion. *J Biol Chem.* 1995;270:4797-4804
41. Holst B, Bruun AW, Kielland-Brandt MC, Winther JR. Competition between folding and glycosylation in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 1996;15:3538-3546
42. Shelikoff M, Sinskey AJ, Stephanopoulos G. A modeling framework for the study of protein glycosylation. *Biotechnol Bioeng.* 1996;50:73-90.
43. Kochanowski N, Blanchard F, Cacan R, Chirat F, Guedon E, Marc A, Goergen J-L. Influence of intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents on recombinant interferon-g glycosylation during batch and fed-batch cultures of CHO cells. *Biotechnol Bioeng.* 2008;100:721-733.
44. Hossler P, Khattak SF, Li ZJ. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology.* 2009;19:936-949.
45. Monaco L, Tagliabue R, Soria MR, Uhlen M. An *in vitro* approach for the expression of recombinant proteins in mammalian cells. *Biotechnol Appl Biochem.* 1994;20:157-171
46. Bragonzi A, Distefano G, Buckberry LD, Acerbis G, Foglieni C, Lamotte D, Campi G, Marc A, Soria MR, Jenkins N, Monaco L. A new Chinese hamster ovary cell line expressing $\alpha 2,6$ -sialyltransferase used as universal host for the production of human-like sialylated recombinant glycoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1474:273-282.
47. Schneider Y-J. Optimization of hybridoma cell growth and monoclonal antibody secretion in chemically defined serum- and protein-free medium. *J Immunol Methods.* 1989;116:67-77.
48. Rodríguez Niño MR, Rodríguez Patino JM. Surface tension of protein and insoluble lipids at the air-aqueous phase interface. *J Am Oil Chem Soc.* 1998;75 1233-1239.
49. Nielsen LK, Smythl GK, Greenfield PF. Hemacytometer Cell Count Distributions: Implications of Non-Poisson Behavior. *Biotechnol Prog.* 1991;7:560-563.
50. Goergen JL, Marc A, Engasser JM. Determination of cell lysis and death kinetics in continuous hybridoma cultures from the measurement of lactate dehydrogenase release. *Cytotechnology.* 1993;11:189-195.
51. Mols J, Burteau CC, Verhoeye FR, Ballez JS, Agathos SN, Schneider YJ. Fortification of a protein-free cell culture medium with plant peptones improves cultivation and productivity of an interferon-g producing CHO cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2003;39:291-296.
52. Butler M. Mammalian cell biotechnology. *Oxford University Press.* 1990.
53. Xu D, Wu T, Wu X, Zhang Y, Chen Y. Studies of protective properties of Pluronic and other agents on the Hybridoma cell culture. *Chin J Biotechnol.* 1995;11:101-107.
54. Zhang Z, Al-Rubeai M, Thomas CR. Effect of Pluronic F-68 on the mechanical properties of mammalian cells. *Enz Microb Technol.* 1992;14 980-983.
55. Passini CA, Goochee CF. Response of a mouse hybridoma cell line to heat shock, agitation, and sparging. *Biotechnol Prog.* 1989;5:175-188.
56. Keen MJ, Rapson NT. Development of a serum-free culture medium for the large scale production of recombinant protein from a Chinese hamster ovary cell line. *Cytotechnology.* 1995;17:153-163.

57. Tharmalingam T, Ghebeh H, Wuerz T, Butler M. Pluronic Enhances the Robustness and Reduces the Cell Attachment of Mammalian Cells. *Mol Biotechnol*. 2008;39:167-177.
58. Katakam M, Banga AK. Use of poloxamer polymers to stabilize recombinant human growth hormone against various processing stresses. *Pharm Dev Technol*. 1997;2:143-149.
59. Laouar L, Lowe KC, Mulligan BJ. Yeast responses to nonionic surfactants. *Enz Microb Technol*. 1996;18:433-438.
60. Batrakova EV, Kabanov AV. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J Control Release*. 2008;130:98-106.
61. Kabanov A, Batrakova E, Alakhov V. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release*. 2002;82:189-212.
62. Kabanov AV, Vinogradov SV, Suzdaltseva YG, Alakhov V. Water-soluble block polycations as carriers for oligonucleotide delivery. *Bioconjug Chem*. 1995;6:639-643.
63. Torchilin VP. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *J Control Release*. 2001;73:137-172.
64. Kato Y, Hiraoka S, Tada Y, Koh ST, Lee YS. Mixing time and power consumption for a liquid in a vertical cylindrical vessel, shaken in a horizontal circle. *Chem Eng Res Des*. 1996;74:451-455.
65. Busto VD, Rodríguez-Talou J, Giulietti AM, Merchuk JC. Effect of shear stress on anthraquinones production by *Rubia tinctorum* suspension cultures. *Biotechnol Progr*. 2008;24:175-181.
66. Suresh S, Srivastava VC, Mishra IM. Critical analysis of engineering aspects of shaken flask bioreactors. *Crit Rev Biotechnol*. 2009;29:255-278.

3.3.3. Contributions de l'article

L'influence du pluronic F-68 dans un milieu de culture dépourvu de sérum et de protéines a donc été étudiée au cours de cultures de cellules CHO effectuées en fioles d'Erlenmeyer et en flacon de Roux. Cette étude a mis en évidence l'importance de l'utilisation de ce tensio-actif au regard de la croissance et de la lyse cellulaire mais également de la production de la molécule d'intérêt et de la qualité de cette dernière. Pour des concentrations de PF-68 comprises entre 0 et 0,1%, un effet dose-dépendant sur la croissance et la lyse cellulaire a été observé au cours de cultures de cellules CHO effectuées en fioles d'Erlenmeyer agitées à 70 rpm. La diminution de la concentration du PF-68 entraîne une augmentation de la lyse cellulaire et ce malgré des conditions de cultures peu stressantes (faible vitesse d'agitation, aucune aération par sparger). La valeur de la CMC du PF-68 dans le milieu BDM a été déterminée et est de 0,1%. Il en résulte que l'effet du PF-68 sur le comportement cinétique des cellules CHO est lié à sa concentration plutôt qu'à sa forme (micelle ou unimère).

Bien que de nombreuses études aient été consacrées dans les années 90 à l'impact du pluronic F-68 en tant qu'agent protecteur vis-à-vis de contraintes hydrodynamiques (cf. paragraphe 2.2.3.5 de la synthèse bibliographique) (Handa-Corrigan *et al.*, 1989 ; Jordan *et al.*, 1994 ; Michaels *et al.*, 1991), les travaux exposés dans cet article montrent pour la première fois un effet du pluronic F-68 sur la production d'une protéine d'intérêt thérapeutique. En outre, les résultats de thèse de Nadine Kochanowski (2005) ainsi que nos résultats montrent

que lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu BDM, la glycosylation de l'IFN- γ demeure constante tout au long du procédé. Or, les résultats présentés dans cet article démontrent que la seule suppression du PF-68 dans le milieu de culture conduit à une hétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ . En effet, en absence de PF-68, une phase de latence de la croissance cellulaire au cours des 30 premières heures de culture est observée. Cette phase de latence des cellules pourrait être liée à la diminution du pourcentage de la glycoforme 2N (65-70% *vs.* 80%) observée au cours des 20 à 30 premières heures de la cinétique. Durant cette phase, la vitesse spécifique maximale de croissance est plus faible que celle obtenue pour la culture cellulaire en présence de PF-68 et cette vitesse spécifique de croissance diminue. Or, il a été montré que la variation de la vitesse spécifique de croissance lors d'une culture discontinue de cellules CHO influençait la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ (Hayter *et al.*, 1993).

Nous avons voulu vérifier si les cultures de cellules CHO effectuées dans des fioles d'Erlenmeyer permettaient une oxygénation suffisante des cellules et si la présence ou l'absence de PF-68 pouvait influencer le pourcentage d'oxygène dissous disponible pour les cellules CHO et expliquer les différences de cinétique de croissance observées dans ces deux conditions de culture.

Ainsi, en complément de cette étude, la mesure de l'oxygène dissous a été réalisée à l'aide d'un système non invasif (patch fluorescent) de mesure en ligne (Cellphase®, Fluorometrix) pour les cultures de cellules CHO effectuées en fioles d'Erlenmeyer agitées à 40 rpm et à 70 rpm (Figure 67).

En fioles d'Erlenmeyer agitées à 70 rpm, aucune limitation en oxygène n'est décelable au cours du procédé de culture des cellules CHO avec le milieu BDM en présence ou en absence de PF-68. En effet, la mesure de la pression partielle en oxygène est supérieure à 80% de la saturation en air tout au long du procédé. D'autres auteurs ont également montré le maintien d'une pression partielle en oxygène élevée lorsque les cellules CHO sont cultivées en fioles d'Erlenmeyer (Heinrich C. *New application for an established luminescence based sensor system – monitoring pO₂ and pH in shake flasks*, 21st meeting of the European Society for Animal Cell Technology, Dublin, 2009). En revanche, après 30 à 40 heures de culture ; les cellules CHO se trouvent en légère hypoxie lorsque les fioles d'Erlenmeyer sont agitées à 40 rpm. Cette limitation en oxygène peut probablement expliquer la plus faible densité cellulaire obtenue au cours de la culture à 40 rpm par rapport à celle effectuée à 70 rpm (28×10^8 cellules/L *vs.*

34×10^8 cellules/L). L'ajout deux fois par jour d'un mélange gazeux constitué de 5% de CO₂ et de 95% d'air permet de limiter l'hypoxie des cellules CHO au cours de la culture.

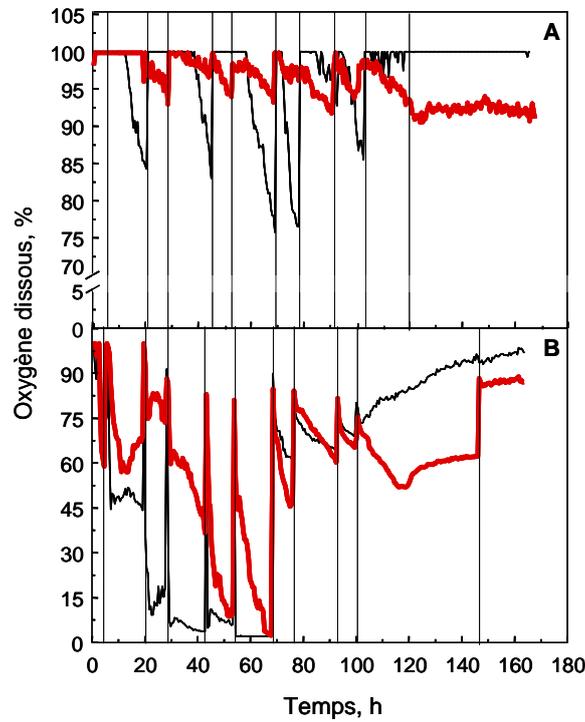


Figure 67 : Mesure de l'oxygène dissous (%) présent au cours de cultures de cellules CHO 320 réalisées avec le milieu BDM en présence (—) et en absence (—) de pluronic F-68 en fioles d'Erlenmeyer à 70 rpm (A) et à 40 rpm (B). (.....) = ajout dans la culture d'un mélange gazeux constitué de 5% de CO₂ et de 95% d'air.

3.4. Influence de l'apport de sérum et de la suppression du citrate de fer sur les cinétiques de croissance et de décès cellulaires, du métabolisme et de la production de l'IFN- γ au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 réalisées avec le milieu BDM

3.4.1. Cinétiques de croissance et de décès cellulaires

Comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre III et dans la première partie du présent chapitre, le milieu BDM est un milieu riche, tant sur le plan qualitatif que quantitatif (cf. Tableau 19 de la partie « Annexes »). La croissance des cellules CHO ainsi que la production de l'IFN- γ obtenues avec ce milieu sont plus élevées que pour des cultures réalisées avec le milieu pauvre RPMI supplémenté par du sérum. Dans cette partie, nous avons eu pour objectif de vérifier si l'ajout de sérum au milieu riche BDM permettait d'améliorer les performances cinétiques déjà atteintes par les cellules dans ce même milieu mais en absence de sérum. Par ailleurs, après avoir ajouté 5% de sérum au milieu BDM, nous avons également testé l'influence de la suppression du citrate de fer dans le milieu BDM supplémenté par du sérum (FCS-BDM).

La Figure 68 présente les cinétiques de croissance et de décès cellulaires obtenues au cours de cultures discontinues de cellules CHO effectuées avec le milieu BDM, le milieu BDM supplémenté par 5% de sérum (FCS-BDM) et le milieu FCS-BDM sans citrate de fer. Soulignons que pour les deux cultures cellulaires réalisées en présence de sérum (FCS-BDM et FCS-BDM sans citrate de fer), le surfactant PF-68 a été supprimé du milieu de culture. En effet, d'un point de vue macrocinétique, aucune différence significative n'a été observée lorsque les cultures de cellules CHO ont été effectuées avec le milieu BDM ou le milieu FCS-BDM sans PF-68. Les densités cellulaires maximales sont similaires, de l'ordre de 30×10^8 cellules/L lorsque les cellules CHO sont cultivées avec les milieux BDM et FCS-BDM. Par ailleurs, les vitesses spécifiques maximales de croissance sont comparables et proches de $0,03 \text{ h}^{-1}$ (Figure 69). La mort cellulaire est également comparable entre ces deux conditions de culture de cellules CHO, à l'exception d'une lyse cellulaire légèrement plus élevée après 180 h lorsque la culture est effectuée en présence de sérum (10×10^8 cellules/L *vs.* 5×10^8 cellules/L). Enfin, contrairement à la culture cellulaire effectuée sans sérum, une phase stationnaire de croissance est observable pendant près de 80 h. Il est possible que l'apport par le sérum de composés tels que l'albumine, l'insuline, la transferrine, la progestérone ou de vitamines autres que celles déjà présentes dans le milieu BDM dont notamment la vitamine E, permettent de maintenir cette phase stationnaire. Même s'il est difficile d'obtenir

la composition précise du sérum, celui-ci apporte des lipides et autres corps gras en quantité plus importante (cholestérol, HDL, LDL, phospholipides et triglycérides) que dans le milieu BDM, qui ne contient que les acides linoléique et thioactique. Il est donc possible que ces composés interviennent dans le maintien de la phase stationnaire de croissance. Par ailleurs, soulignons qu'aucune phase stationnaire de croissance n'est observée lorsque les cultures cellulaires sont effectuées avec le milieu SF-RPMI, contenant de l'albumine, de la transferrine et de l'insuline (cf. paragraphe 2.2 du chapitre IV). Il est donc peu probable que ces trois protéines à elles seules soient responsables de la phase stationnaire de croissance.

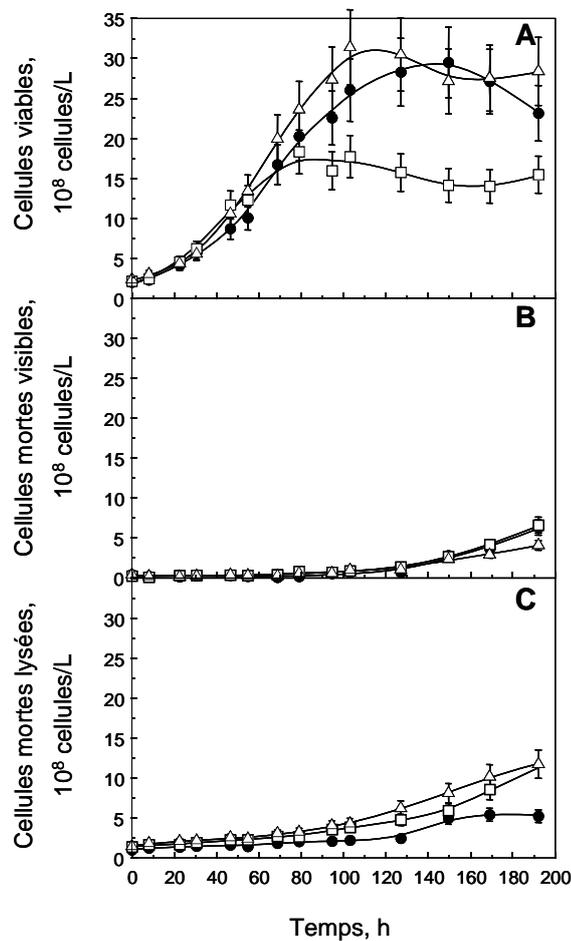


Figure 68 : Cinétiques de croissance (A) et de décès cellulaires (cellules mortes visibles : (B) et cellules mortes lysées : (C)) réalisées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM (●), avec le milieu FCS-BDM (Δ) et avec le milieu FCS-BDM sans citrate de fer (□).

Lorsque le citrate de fer est supprimé du milieu FCS-BDM, la densité cellulaire maximale obtenue est près de 2 fois plus faible (17×10^8 cellules/L) (Figure 68). En revanche, les vitesses spécifiques maximales sont similaires à celles calculées en présence de citrate de fer, proches

de $0,035 \text{ h}^{-1}$ (Figure 69). Cependant, contrairement aux cultures de cellules CHO réalisées en présence de citrate de fer, la croissance cellulaire des cultures réalisées sans citrate de fer s'arrête après 80 h de culture, soit près de 30 h avant la culture avec le milieu FCS-BDM et près de 60 h avant celle effectuée avec le milieu BDM.

Ainsi, bien que le milieu BDM et le sérum contiennent du sulfate de fer et probablement de la transferrine (pour le sérum), ces apports en fer ne semblent pas être suffisants pour assurer une croissance des cellules CHO comparable aux cultures de cellules effectuées en présence de citrate de fer. Ce résultat confirme donc l'effet positif de l'apport du citrate de fer observé dans le chapitre IV lorsque les cultures de cellules étaient effectuées avec le milieu FCS-RPMI supplémenté par du citrate de fer.

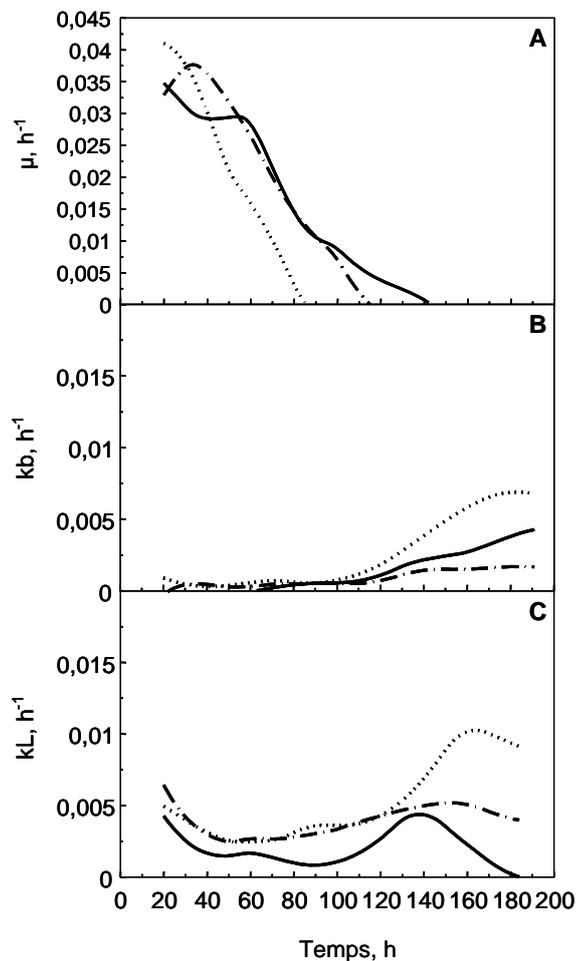


Figure 69 : Vitesses spécifiques de croissance (A) et de mort cellulaires (cellules mortes visibles (B) ; cellules mortes lysées (C)) mesurées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM (—), avec le milieu FCS-BDM (— ♦) et avec le milieu FCS-BDM sans citrate de fer (· · · ·).

En ce qui concerne la mort cellulaire, pour toutes les conditions de culture testées, les concentrations en cellules mortes visibles après 180 h de culture sont de l'ordre de 5×10^8 cellules/L avec des vitesses spécifiques de mort (kb) similaires et négligeables. En revanche, les concentrations en cellules lysées sont proches de 10×10^8 cellules/L pour les cultures cellulaires effectuées en présence de sérum alors qu'elles sont deux fois moins importantes lorsqu'il est absent.

La vitesse spécifique maximale de lyse (kL) atteint près de $0,01 \text{ h}^{-1}$ après 160 h de culture lorsque les cellules sont cultivées avec le milieu FCS-BDM sans citrate de fer. Ces résultats sont donc en accord avec ceux précédemment obtenus au cours de cultures supplémentées par du sérum (milieu FCS-RPMI) et de cultures en absence de citrate de fer (milieu BDM sans citrate de fer). Ainsi, la présence de sérum et/ou l'absence de citrate de fer au cours de cultures de cellules CHO entraînent une lyse cellulaire significative. En effet, comme nous l'avons précédemment souligné dans le chapitre IV, le citrate de fer est une source de fer participant au métabolisme énergétique des cellules. Il semble donc que le fer apporté par le sérum soit insuffisant, conduisant ainsi à une densité cellulaire réduite d'un facteur 2 et à une lyse cellulaire importante.

3.4.1.1. Cinétiques de production de l'IFN- γ

La Figure 70 présente les cinétiques de production de l'IFN- γ au cours des cultures discontinues de cellules CHO effectuées avec les milieux BDM, FCS-BDM et FCS-BDM sans citrate de fer.

Quelle que soit la culture, la production de l'IFN- γ est toujours associée à la croissance. Toutefois, les concentrations en IFN- γ ne sont pas comparables pour les trois conditions de culture. En effet, lorsque le milieu BDM est supplémenté par du sérum, bien que la concentration maximale en cellules soit similaire à celle obtenue avec le milieu de culture BDM, la production de l'IFN- γ est réduite de 25% pour atteindre une concentration maximale de l'ordre de 1,6 mg/L. Par ailleurs, la vitesse spécifique maximale de production de l'IFN- γ est inférieure à celle obtenue avec le milieu BDM ($0,002 \text{ mg}/10^8 \text{ cellules/h}$ *vs.* $0,003 \text{ mg}/10^8 \text{ cellules/h}$). Il est possible que la composition d'un milieu trop riche (BDM + sérum) soit défavorable à la cellule, peut-être en raison de phénomènes d'antagonisme entre les composés, les rendant alors moins disponibles pour la cellule.

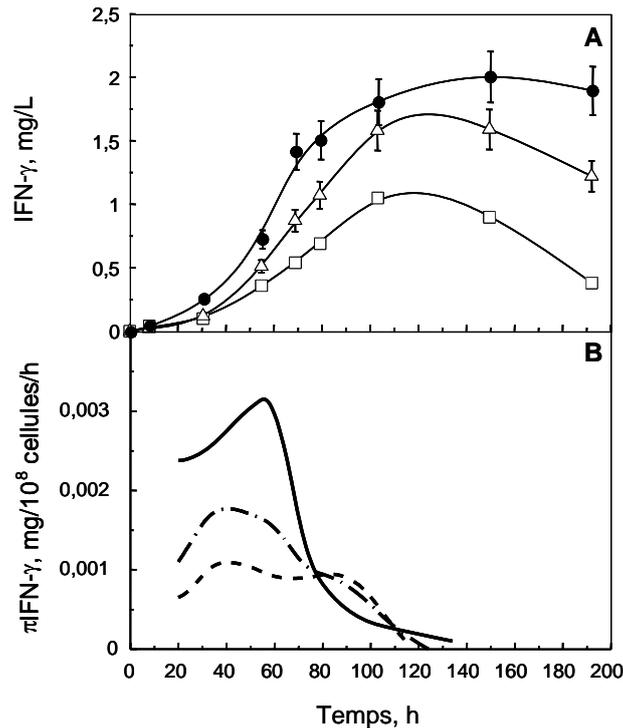


Figure 70 : (A) Cinétiques de production de l'IFN- γ réalisées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM (●), avec le milieu FCS-BDM (Δ) et avec le milieu FCS-BDM sans citrate de fer (\square). (B) Vitesses spécifiques de production de l'IFN- γ mesurées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 avec le milieu BDM (—), avec le milieu FCS-BDM (— •) et avec le milieu FCS-BDM sans citrate de fer (· · · ·).

L'absence de citrate de fer dans le milieu FCS-BDM entraîne une réduction supplémentaire de la production de l'IFN- γ par les cellules CHO. La concentration maximale en IFN- γ produit au cours de la culture effectuée avec le milieu FCS-BDM sans citrate de fer n'atteint plus que 1 mg/L avec une vitesse spécifique maximale de production près de 3 fois plus faible que celle obtenue au cours de la culture de cellules CHO réalisée avec le milieu BDM.

De façon tout à fait remarquable, l'ajout de sérum dans le milieu BDM diminue le rendement de production de l'IFN- γ par les cellules CHO (0,05 mg/10⁸ cellules/h *vs.* 0,08 mg/10⁸ cellules/h). Le rendement de production de l'IFN- γ obtenu au cours de la culture de cellules CHO effectuée avec le milieu FCS-BDM sans citrate de fer est comparable à celui obtenu avec citrate de fer.

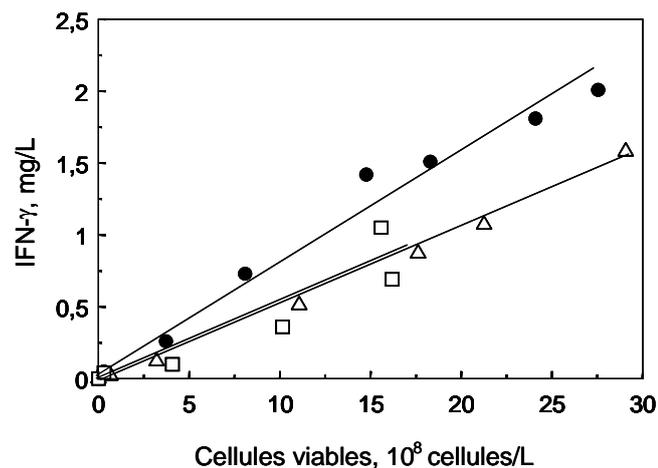


Figure 71 : Relation entre la croissance cellulaire et la concentration de l'IFN- γ établie au cours des cultures discontinues de cellules CHO cultivées avec les milieux BDM (●), FCS-BDM (Δ) et FCS-BDM sans citrate de fer (\square).

Ainsi, le sérum ajouté au milieu riche BDM ne permet pas d'améliorer la croissance cellulaire. De plus, le sérum a un effet négatif sur les capacités de production de l'IFN- γ par les cellules CHO alors que le citrate de fer n'a pas d'effet en dehors d'un effet sur la concentration en IFN- γ via la croissance cellulaire.

3.4.2. Cinétiques de consommation de substrats et de formation de produits

Toutes les cultures ont été effectuées avec une concentration initiale en glucose de 20 mM et en glutamine de 5 mM (Figure 72). Quel que soit le milieu de culture, les concentrations en lactate et en ions ammonium produits sont respectivement de 18 mM et de 6 mM.

Pour toutes les cultures, lorsque les cellules entrent en phase de déclin, une concentration résiduelle en glucose d'au minimum 3 mM est encore présente dans le milieu. L'épuisement du glucose n'est donc pas responsable de l'arrêt de la croissance cellulaire. Lorsque la culture cellulaire est effectuée avec le milieu BDM, la glutamine est entièrement consommée après 140 h de culture, ce qui coïncide avec l'arrêt de la croissance cellulaire et le début de la mort cellulaire. En revanche, pour les cellules CHO cultivées avec les milieux FCS-BDM et FCS-BDM sans citrate de fer, l'arrêt de la croissance cellulaire a lieu plus rapidement, respectivement après 110 h et 80 h de culture. Pour ces deux cultures, la glutamine ne semble pas être l'élément limitant responsable de l'arrêt de la croissance puisqu'il reste encore plus de 1 mM de glutamine pour la culture avec FCS-BDM et 2 mM de glutamine pour la culture

sans citrate de fer. Il est possible que certains éléments apportés par le sérum soient toxiques pour les cellules ou qu'il y ait un phénomène d'antagonismes entre les éléments apportés par le sérum et ceux présents initialement dans le milieu.

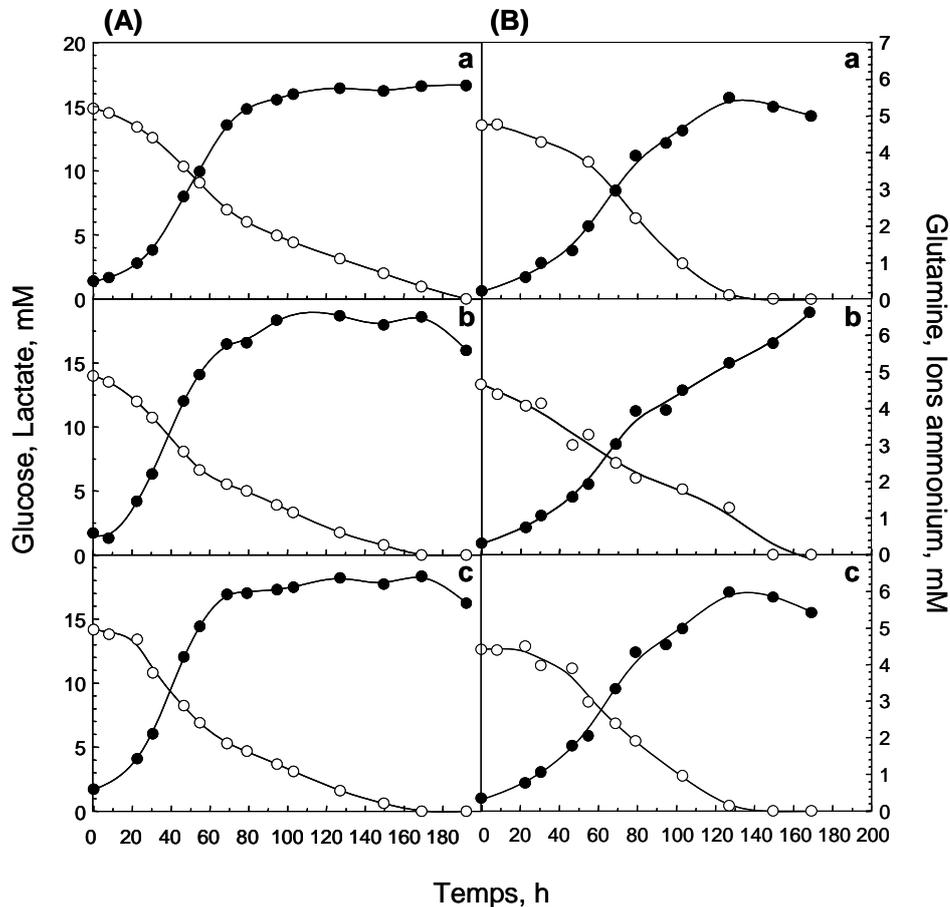


Figure 72 : (A) Cinétiques de consommation du glucose (○) et de production de lactate (●) et (B) cinétiques de consommation de glutamine (○) et de production d'ions ammonium (●) réalisées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec le milieu BDM (a), avec le milieu FCS-BDM (b) et avec le milieu FCS-BDM sans citrate de fer (c).

Lors de la culture de cellules CHO effectuée en absence de citrate de fer, une limitation en fer se produit probablement, conduisant à une altération de la respiration cellulaire et du métabolisme cellulaire, malgré la présence de 5% de sérum.

Les vitesses spécifiques maximales de consommation du glucose et de production de lactate sont plus faibles en absence de sérum par rapport aux deux autres cultures de cellules CHO effectuées avec sérum (glucose : 0,02 mmoles/ 10^8 cellules/h *vs.* 0,03-0,04 mmoles/ 10^8 cellules/h ; lactate : 0,04 mmoles/ 10^8 cellules/h *vs.* 0,05 mmoles/ 10^8 cellules/h) (Figure 73).

Quant aux vitesses spécifiques maximales de consommation de glutamine et de production d'ions ammonium, elles sont comparables quelles que soient les cultures, et respectivement de l'ordre de 0,004 mmoles/10⁸ cellules/h et 0,006 mmoles/10⁸ cellules/h.

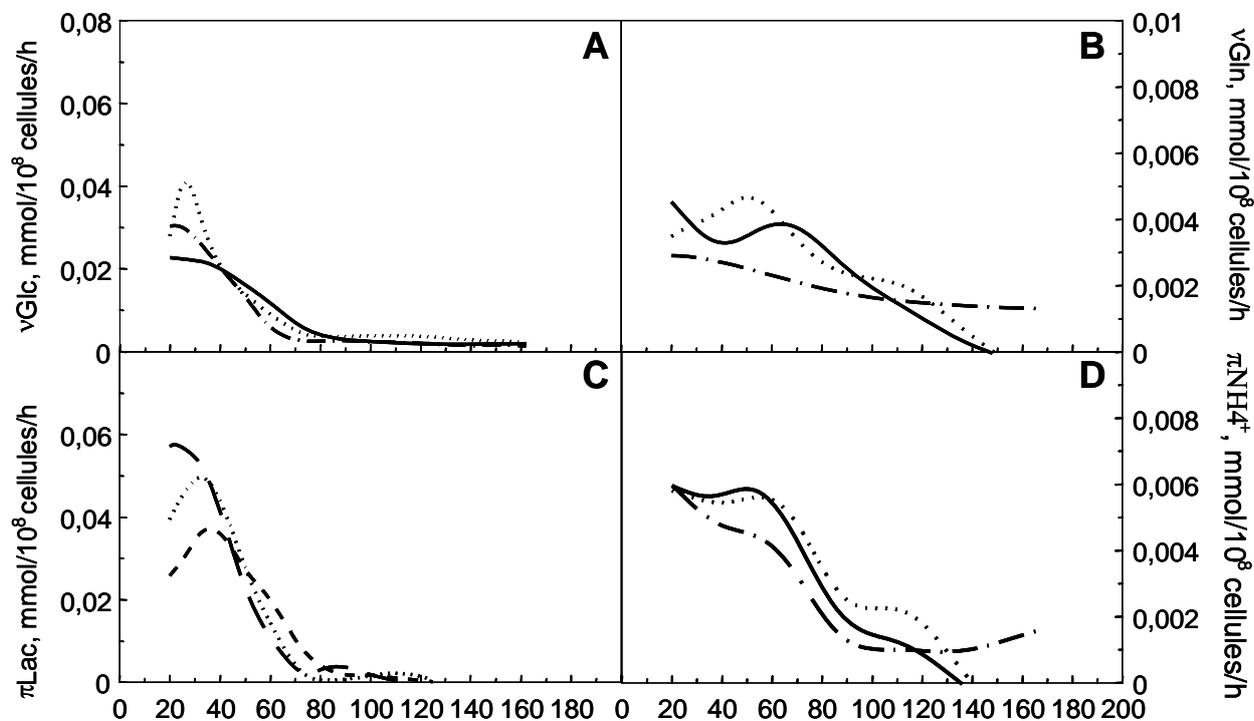


Figure 73 : Vitesses spécifiques de consommation du glucose (A) et de la glutamine (B) et de production de lactate (C) et d'ions ammonium (D) mesurées au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 cultivées avec les milieux BDM (—), FCS-BDM (— ♦) et FCS-BDM sans citrate de fer (· · · ·).

De nombreuses études rapportent que le sérum possède l'avantage d'améliorer la croissance cellulaire et la production de la protéine d'intérêt pour une large gamme de lignées cellulaires et qu'il est donc plus contraignant d'utiliser des milieux sans protéine car cela requiert une formulation spécifique pour garantir la production de la protéine d'intérêt (Jayme, 1991 ; Kim and Lee, 2009).

De façon tout à fait intéressante, l'ajout de sérum dans le milieu riche BDM ne permet pas d'améliorer les capacités de croissance de la cellule CHO, et il est même délétère pour la production de la protéine d'intérêt. Le milieu BDM constitue donc un milieu suffisamment riche pour s'affranchir du sérum. De plus, les pré-cultures cellulaires peuvent être effectuées avec sérum (milieu FCS-RPMI) et, sans aucune adaptation nécessaire, les cultures peuvent être effectuées en absence de sérum dans le milieu de culture BDM. Ainsi, outre les risques

associés à l'utilisation de produits d'origine animale pour la production de protéines thérapeutiques, comme par exemple la transmission du prion et les difficultés de purification (Huang *et al.*, 2007 ; Keen and Rapson, 1995 ; Schröder *et al.*, 2004), l'apport de sérum peut également, dans certaines conditions de culture, constituer un désavantage vis-à-vis des rendements de production de la protéine d'intérêt.

Enfin, lorsque le citrate de fer est supprimé du milieu FCS-BDM, la densité cellulaire maximale obtenue est près de deux fois plus faible. Ce résultat confirme ceux précédemment obtenus dans le chapitre IV et le paragraphe 3.2.1 de ce même chapitre et souligne l'importance de l'apport en fer biodisponible pour les cellules CHO. Dans cette condition de culture, le citrate de fer n'a pas d'effet direct sur les capacités de production de l'IFN- γ mais un effet sur la concentration en IFN- γ est observé via la croissance cellulaire.

3.5. Conclusions du chapitre V

Les travaux présentés dans ce chapitre ont permis de confirmer le rôle important joué par le citrate de fer au cours de cultures discontinues de cellules CHO, et ce malgré la richesse d'un milieu supplémenté ou non par du sérum (BDM, FCS-BDM). Lorsque seul le citrate de fer est supprimé du milieu riche BDM, aucune croissance cellulaire n'est possible. L'ajout de sérum dans le milieu de culture BDM a un effet négatif sur le rendement de production de l'IFN- γ alors que la suppression du citrate de fer du milieu FCS-BDM n'a pas d'effet sur la production de l'IFN- γ en dehors d'un effet sur la concentration en raison de la réduction de la croissance cellulaire. Par ailleurs, nous avons également mis en évidence l'importance de l'utilisation de surfactant comme le pluronic F-68 dans les milieux de culture cellulaire, et ce pour des cultures cellulaires effectuées en absence de contraintes hydrodynamiques (flacon de Roux) ou cultivées en fioles d'Erlenmeyer agitées à 40 rpm et 70 rpm.

Les principales conclusions sont schématisées dans la Figure 74.

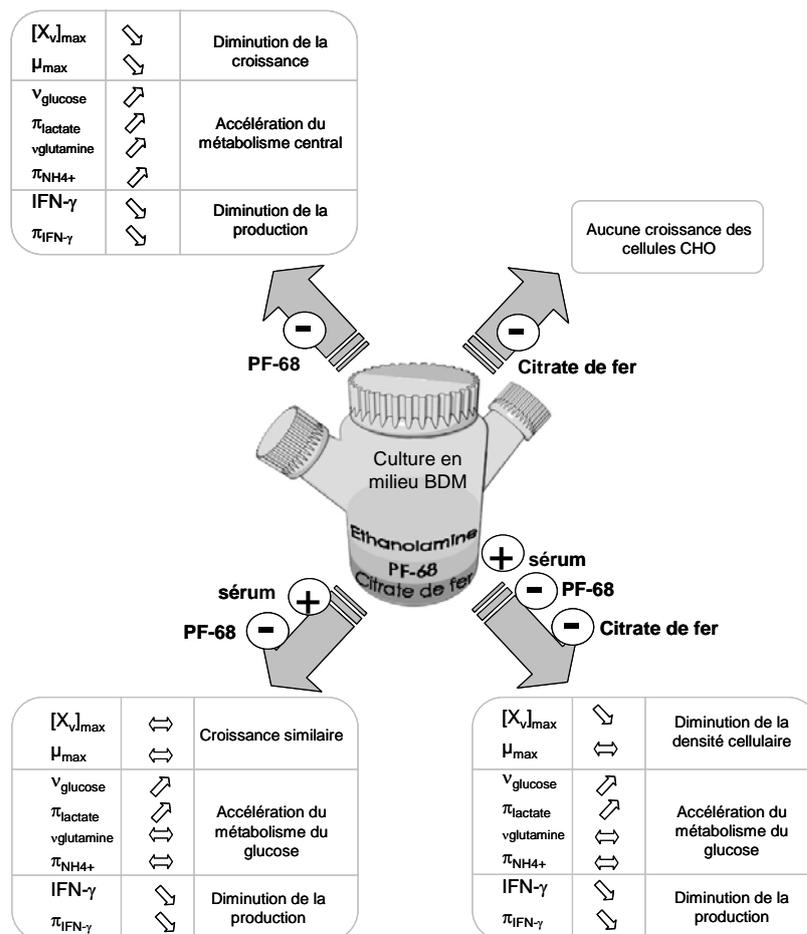


Figure 74 : Représentation schématique des principales conclusions du chapitre V.

Chapitre VI

Influence de la composition des milieux de culture sur la qualité de l'IFN- γ produit par les cellules CHO 320: caractérisation de l'hétérogénéité de structure, de la macrohétérogénéité de la glycosylation et de la relation structure/activité

CHAPITRE VI

4.1. Introduction

Au regard de l'accroissement de la production de protéines recombinantes complexes, un intérêt de plus en plus important est porté à la qualité des protéines produites. La glycosylation étant une modification post-traductionnelle (PTM) majeure, les études portant sur les maladies causées suite à une déficience de glycosylation et celles portant sur la caractérisation des protéines glycosylées produites par voie biotechnologique se sont considérablement développées (Dwek, 1998 ; Butler, 2006). Pour la production de glycoprotéines recombinantes thérapeutiques, il est indispensable de maintenir un profil de glycosylation constant au cours du procédé mais également d'un lot de production à l'autre (Restelli and Butler, 2002). Le maintien de la qualité des protéines recombinantes, généralement vis-à-vis de la glycosylation, représente un enjeu essentiel puisqu'une différence de glycosylation peut entraîner une altération de la solubilité, de l'activité et de la demi-vie de la protéine (Goochee and Monica, 1990 ; Walsh and Jefferis, 2006). Environ 50% des protéines humaines sont glycosylées (Wong, 2005). Toutefois, d'autres PTM peuvent également être caractérisées chez certaines protéines telles que la carboxylation, l'hydroxylation, la sulfatation, la phosphorylation, l'agrégation ou encore la protéolyse. Du point de vue des procédés, très peu d'études dans la littérature traitent de la caractérisation de ces différentes PTM. Quelques études ont caractérisé la sulfatation et la carboxylation du facteur IX, une protéine anti-coagulante produite par les cellules CHO (McGrath, 2006 ; Walsh and Jefferis, 2006). D'autres études ont montré que la désamination d'un anticorps commercial produit par les cellules CHO réduisait de 70% son efficacité (Harris *et al.*, 2001). Il a également été montré qu'en modifiant les conditions de culture cellulaire, il est possible de réduire la formation d'agrégats protéiques (Chaderjian *et al.*, 2005 ; Ju *et al.*, 2009 ; Spearman *et al.*, 2007).

Pour toutes les raisons évoquées précédemment, l'étude de la qualité de l'IFN- γ produit au cours des différentes conditions de culture de cellules CHO détaillées dans les chapitres IV et V de ce manuscrit nous a semblé être un objectif important.

Dans les chapitres IV et V, nous avons montré qu'une supplémentation en citrate de fer du milieu FCS-RPMI et que la présence de citrate de fer dans le milieu FCS-BDM permettaient d'augmenter la densité cellulaire maximale et la concentration finale de la protéine d'intérêt ainsi que son rendement de production. Par ailleurs, l'importance du citrate de fer dans le

milieu riche BDM non supplémenté par du sérum a également été soulignée en termes de croissance cellulaire, de métabolisme et de production de l'IFN- γ .

Comme nous l'avons exposé dans le chapitre III, l'IFN- γ possède deux sites de *N*-glycosylation sur les résidus asparagines 25 (Asn 25) et 97 (Asn 97). La protéine peut être glycosylée sur deux sites (glycoforme 2*N*), sur 1 site (glycoforme 1*N*), généralement sur l'Asn 25 ou aucun site (glycoforme 0*N*). On parle alors de macrohétérogénéité de la glycosylation. A l'inverse des cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu FCS-RPMI, la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ demeure constante lorsque les cellules CHO sont cultivées en mode discontinu avec le milieu BDM.

Aussi, dans ce chapitre, nous nous proposons d'étudier l'influence de la présence du citrate de fer et du sérum sur la qualité de l'IFN- γ lorsque les cellules CHO sont cultivées avec les milieux BDM, FCS-BDM et FCS-RPMI. La caractérisation de la qualité de l'IFN- γ a été déterminée par Western-blot suivie d'une analyse densitométrique. Cette technique nous a permis d'analyser la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ et de mettre en évidence une séquence tronquée de la forme non glycosylée de la protéine. Dans une seconde partie, l'identification des familles de protéases présentes au cours de cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu BDM ainsi qu'avec les milieux supplémentés par du sérum a également été effectuée par la réalisation de zymogrammes. Enfin, les propriétés fonctionnelles de l'IFN- γ produit par les cellules CHO ont été établies grâce à un test biologique.

4.2. Macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ

4.2.1. Influence de l'ajout de citrate de fer sur la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ produit au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 effectuées avec le milieu FCS-RPMI

La Figure 75 présente l'influence de l'ajout de 500 μ M de citrate de fer sur le profil de glycosylation de l'IFN- γ obtenu au cours de cultures discontinues de cellules CHO effectuées avec le milieu FCS-RPMI. La macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ a été évaluée par Western-blot. L'analyse densitométrique des films photosensibles impressionnés a permis de suivre, au cours des cultures, l'évolution de la proportion de chacune des trois glycoformes. Comme nous l'avons montré dans le chapitre III, une diminution du pourcentage de glycoformes 2*N* au profit d'une augmentation de la glycoforme 0*N* de l'IFN- γ

est observée au bout de 50 h de culture pour la culture effectuée avec le milieu FCS-RPMI. En effet, alors qu'en début de culture, 70-80% de l'IFN- γ sont doublement glycosylés, 10-15% sont mono-glycosylés et 5-10% sont non glycosylés, le profil de glycosylation évolue au bout de 50 heures de culture vers des proportions de l'ordre de 60-65% (2N), 10-15% (1N) et 20-25% (0N). Ces résultats corroborent ceux obtenus au cours de travaux antérieurs réalisés au LRGP (Kochanowski, 2005 ; Lamotte, 1997) mais également ceux d'autres équipes (Curling *et al.*, 1990; Goldman *et al.*, 1998) pour des cultures de cellules CHO en mode discontinu et avec le milieu pauvre RPMI supplémenté ou non par du sérum. Pour les cultures de cellules effectuées sans sérum, la composition du milieu RPMI est celle développée par Hayter *et al.* (1991) et optimisée par Castro *et al.* (1992).

De plus, en ce qui concerne la glycoforme 0N de l'IFN- γ , la présence tout au long de la culture de deux bandes distinctes entre 15 et 17 kDa, témoigne d'une hétérogénéité de structure de la chaîne polypeptidique de l'IFN- γ . Ainsi, une partie de l'IFN- γ est partiellement dégradée. Différents auteurs ont effectivement déjà rapporté une dégradation de la structure primaire de l'IFN- γ (Castro *et al.*, 1995 ; Curling *et al.*, 1990; Dijkmans *et al.*, 1987; Goldman *et al.*, 1997 ; James *et al.*, 1996 ; Lamotte, 1997 ; Mols *et al.*, 2005).

Dans le cas de cultures réalisées avec le milieu FCS-RPMI auquel 500 μ M de citrate de fer ont été ajoutés, aucune séquence tronquée de la glycoforme 0N n'est observée. Ainsi, lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu FCS-RPMI, l'ajout de citrate de fer permet d'éviter la dégradation de la glycoforme 0N de l'IFN- γ tout au long du procédé de culture cellulaire. Ce point est très important puisque l'activité anti-virale de l'IFN- γ est réduite lorsque son extrémité C ou N-terminale n'est pas intacte (Arakawa *et al.*, 1986b ; Farrar and Schreiber, 1993 ; Nacheva *et al.*, 2003). La suppression de 13 acides aminés du côté C-terminal (Arakawa *et al.*, 1986a) et de 15 acides aminés (Arakawa *et al.*, 1989) du côté C-terminal conduit à une activité anti-virale réduite d'un facteur 1000. Par ailleurs, la fixation de l'IFN- γ à son récepteur est également réduite lorsque l'extrémité C-terminale de l'IFN- γ est tronquée (Lundell *et al.*, 1991).

En outre, alors qu'avec le milieu FCS-RPMI sans supplémentation en fer, un déclin de la proportion de la glycoforme 2N au cours de la phase de croissance des cellules CHO a été identifié, une supplémentation de 500 μ M de citrate de fer dans ce même milieu permet de maintenir un profil constant des trois glycoformes tout au long du procédé de culture.

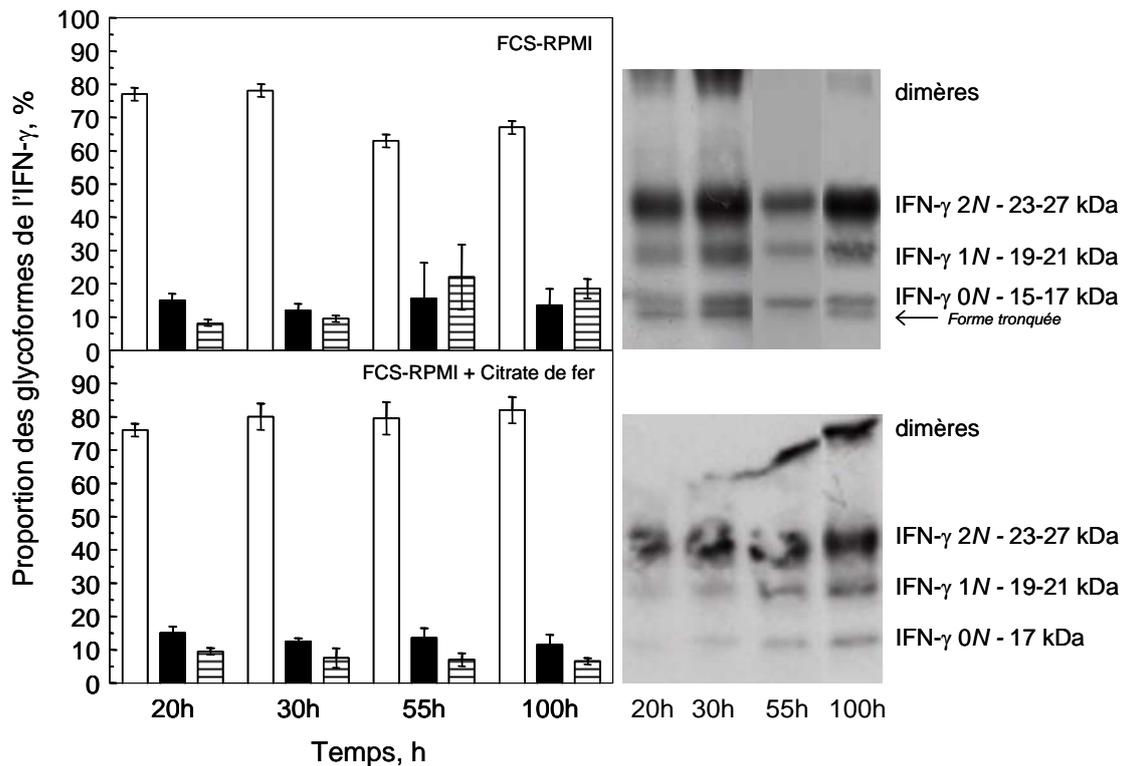


Figure 75 : Macrohéétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 en milieux FCS-RPMI et FCS-RPMI supplémenté par 500 μ M de citrate de fer. Les histogrammes représentent la moyenne des quantifications issues de 2 Western-blot indépendants des proportions des glycoformes 2N (□), 1N (■) et 0N (▨) de l'IFN- γ . Les barres d'erreur indiquent un indice de confiance de 95%.

Ainsi, dans le milieu supplémenté en fer, les proportions des glycoformes 2N, 1N et 0N demeurent constantes et à des valeurs respectivement voisines de 70-80%, 10-15% et 5-10%. Le citrate de fer est un composé présent dans la composition du milieu riche BDM mais absent de celle du milieu RPMI. Ainsi, comme observé avec le milieu BDM, il semble que le fer permette de maintenir un profil de glycosylation constant tout au long du procédé de culture lorsqu'il est ajouté au milieu FCS-RPMI.

4.2.2. Influence de différentes formes d'apport en fer sur la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ produit au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 effectuées avec le milieu FCS-RPMI

Afin d'approfondir la compréhension des mécanismes permettant l'obtention d'un profil constant de la glycosylation de l'IFN- γ au cours de cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu FCS-RPMI supplémenté avec 500 μ M de citrate de fer, l'influence de différentes formes d'apport en fer au milieu FCS-RPMI a été étudiée.

La Figure 76 présente la cinétique de la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ produit au cours de cultures discontinues de cellules CHO effectuées avec trois conditions de milieux décrites dans le chapitre IV:

- ✓ milieu FCS-RPMI + 500 μ M de citrate de fer ammoniacal
- ✓ milieu FCS-RPMI + 500 μ M du complexe citrate de fer - sélénite de sodium
- ✓ milieu FCS-RPMI + 500 μ M d'EDTA-fer

L'addition de citrate de fer ammoniacal ou du complexe citrate de fer – sélénite de sodium dans le milieu FCS-RPMI permet de retrouver des résultats comparables à ceux obtenus au cours de cultures discontinues de cellules CHO effectuées avec le milieu FCS-RPMI supplémenté par du citrate de fer. Ainsi, la présence de citrate de fer, de citrate de fer ammoniacal ou du complexe citrate de fer – sélénite de sodium permet d'empêcher le phénomène de sous-glycosylation observé au cours du temps lors de culture de cellules CHO effectuées avec du milieu FCS-RPMI non supplémenté en fer. Par ailleurs, ces différentes formes d'apport en fer permettent également d'empêcher la formation d'une forme tronquée de la structure primaire de l'IFN- γ . Le citrate de fer, le complexe citrate de fer – sélénite de sodium et le citrate de fer ammoniacal étant des chélateurs d'ions, l'hypothèse privilégiée est la chélation par ces composés d'un ion métallique agissant comme cofacteur d'une ou plusieurs enzymes protéolytiques présentes dans le milieu de culture. Ainsi, ces composés permettraient l'inhibition de l'activité protéolytique de certaines enzymes à métaux ou métalloprotéases, dont la présence a été rapportée au cours de procédés de culture de cellules CHO (Elliott *et al.*, 2003 ; Sandberg *et al.*, 2006; Robert *et al.*, 2009).

En revanche, la supplémentation du milieu FCS-RPMI avec de l'EDTA-fer se traduit par une modification considérable du profil de glycosylation de l'IFN- γ produit au cours de cultures

discontinues de cellules CHO. En effet, le pourcentage de glycoforme 2N de l'IFN- γ est à son niveau le plus bas dès le début de la culture (60-65%). Ainsi, dès le début de la culture, les proportions des glycoformes 2N, 1N et 0N de l'IFN- γ sont respectivement de l'ordre de 60-65%, 10-15% et 20-25%. Ce profil de glycosylation est maintenu constant tout au long de la culture cellulaire.

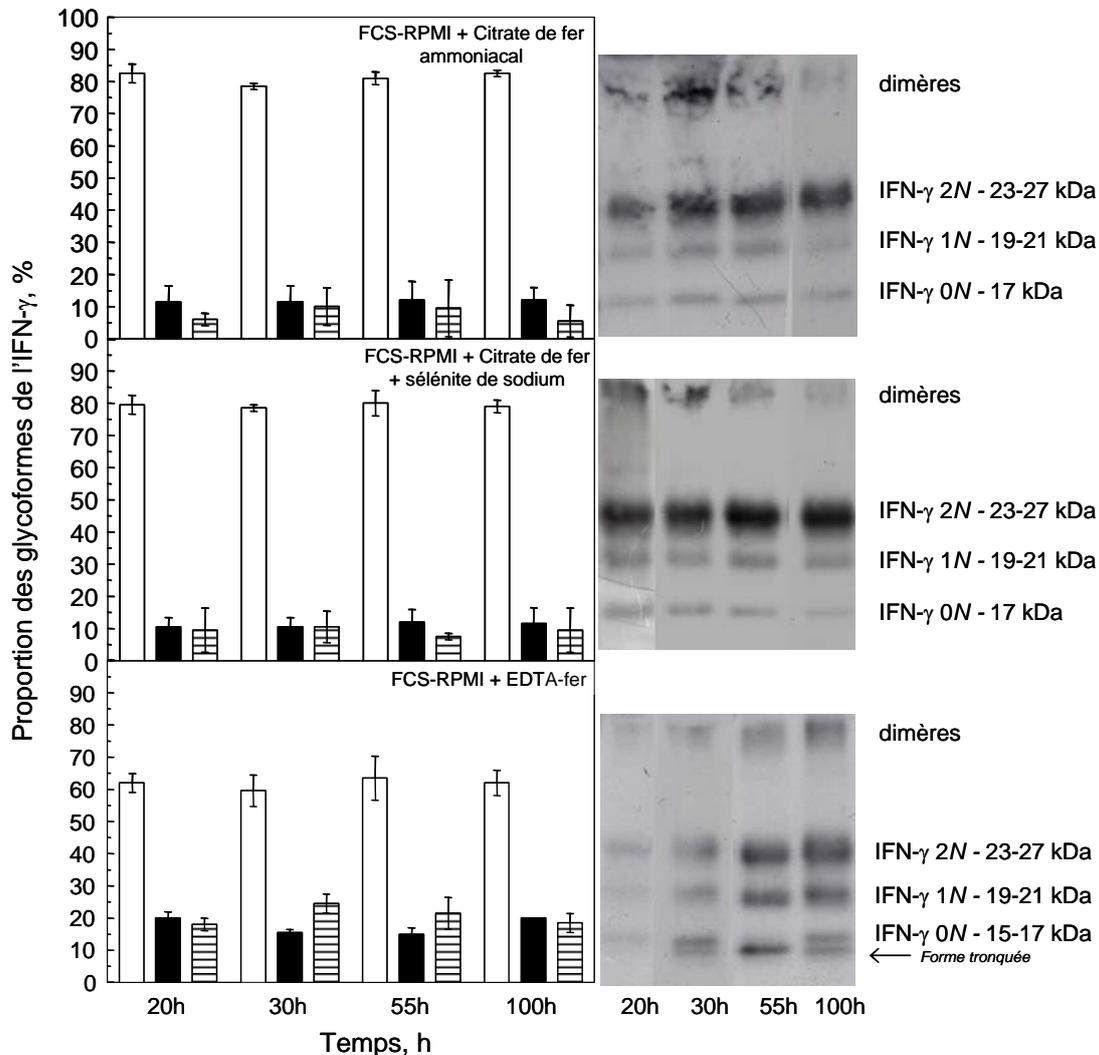


Figure 76 : Macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 effectuées avec le milieu FCS-RPMI supplémenté par différents apports en fer. Les histogrammes représentent la moyenne des quantifications issues de 2 Western-blots indépendants des proportions des glycoformes 2N (□), 1N (■) et 0N (▨) de l'IFN- γ . Les barres d'erreur indiquent un indice de confiance de 95%.

De plus, contrairement aux autres formes d'apport en fer, l'ajout de fer complexé à l'EDTA ne permet pas d'empêcher la dégradation de la forme non-glycosylée de l'IFN- γ avec le milieu FCS-RPMI. En effet, deux bandes distinctes, de poids moléculaires compris entre 15 et 17 kDa, sont identifiables dès le début de la culture. Ce résultat est étonnant étant donné que

l'EDTA-fer, au même titre que le citrate de fer, est connu pour ses propriétés de chélation de métaux. Dans l'hypothèse d'une protéolyse par une ou des métalloprotéase(s), l'EDTA-fer devrait permettre l'inhibition de cette activité. Il est toutefois possible que la concentration apportée dans le milieu de culture (500 μ M) ne soit pas optimale et/ou que l'EDTA soit engagé dans la chélation des ions Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ou Mg^{2+} apportés en quantité non négligeable sous forme de sels inorganiques dans le milieu de culture. Par ailleurs, dans le chapitre IV, nous avons montré que l'ajout d'EDTA-fer était défavorable à la production de l'IFN- γ . Une phase de latence de près de 60 h était observée lorsque le milieu de culture contient de l'EDTA-fer. Ainsi, l'EDTA-fer ajouté au milieu de culture semble non seulement avoir un effet négatif sur la production de l'IFN- γ produit par les cellules CHO mais également sur la qualité de l'IFN- γ ; les deux effets obtenus pouvant probablement être corrélés.

4.2.3. Influence de l'ajout de sérum et de la suppression du citrate de fer sur la glycosylation de l'IFN- γ produit au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 effectuées avec le milieu BDM

De façon classique, comme déjà observée auparavant (chapitres III et V), lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu riche BDM, le profil de glycosylation de l'IFN- γ demeure constant tout au long de la culture discontinue. Les proportions des glycoformes 2N, 1N et 0N de l'IFN- γ sont maintenues respectivement à des valeurs voisines de 80%, 10-15% et 5-10%.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de l'ajout de 5% de sérum sur le profil de la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ produit au cours de cultures discontinues de cellules CHO effectuées avec le milieu riche BDM (Figure 77). Dans un second temps, afin d'identifier le rôle du citrate de fer dans le milieu BDM, le citrate de fer faisant partie intégrante de la composition du milieu BDM, nous l'avons alors supprimé du milieu FCS-BDM.

Il est à noter que lorsque le sérum a été ajouté dans le milieu BDM, le pluronic F-68 a été dans le même temps supprimé. Nous avons vu dans le paragraphe 3.3.2 du chapitre V, qu'il n'y avait pas d'effet direct du pluronic F-68 sur la glycosylation de l'IFN- γ . L'ajout de sérum dans le milieu riche BDM dépourvu de PF-68 conduit à des profils de glycosylation de l'IFN- γ différents de ceux obtenus dans le milieu BDM. En effet, pour les deux conditions de culture de cellules CHO supplémentées par du sérum (FCS-BDM sans PF-68 et FCS-BDM

sans PF-68 et sans citrate de fer), les proportions des glycoformes 2N, 1N et 0N de l'IFN- γ sont respectivement maintenues à des valeurs proches de 50-55%, 25-30% et 20-25%.

Ainsi, lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu FCS-BDM (avec ou sans citrate de fer), la glycoforme 2N de l'IFN- γ est toujours majoritaire mais dans une proportion beaucoup moins élevée que lorsque l'IFN- γ est produit au cours de cultures de cellules effectuées avec le milieu BDM (80% *vs.* 50-55%).

L'état physiologique des cellules peut être évoqué pour tenter d'expliquer cette diminution de la proportion de l'occupation des deux sites de glycosylation de l'IFN- γ entre une culture réalisée avec le milieu BDM et une culture réalisée avec le milieu BDM supplémenté par du sérum. En effet, Kochanowski *et al.* (2008) ont montré l'existence d'une relation entre le maintien d'une charge énergétique élevée et le maintien d'un profil constant de glycosylation de l'IFN- γ au cours de cultures discontinues de cellules CHO. Selon, Hayter *et al.* (1991), une variation de la vitesse spécifique de croissance lors d'une culture discontinue des cellules CHO 320 influencerait la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ . Bien que pour toutes les cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu BDM, qu'il soit supplémenté ou non par du sérum, les vitesses spécifiques maximales de croissance soient similaires (0,03–0,035 h⁻¹), il semble nécessaire de mentionner qu'une lyse cellulaire plus importante est observée lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu FCS-BDM. Par ailleurs, les vitesses spécifiques maximales de production de lactate sont plus faibles lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu BDM par rapport à celles cultivées avec le milieu FCS-BDM (0,035 mmoles/10⁸ cellules/h *vs.* 0,05 mmoles/10⁸ cellules/h), ce qui traduit une plus grande efficacité du métabolisme du glucose. Enfin, la production de l'IFN- γ est réduite lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu FCS-BDM. Il faut souligner que pour les cultures effectuées en présence de sérum, les vitesses spécifiques de production de l'IFN- γ sont faibles, notamment en début de culture (0,001 mg/10⁸ cellules/h) et atteignent au maximum 0,002 mg/10⁸ cellules/h alors qu'avec le milieu BDM, les vitesses spécifiques maximales de production de l'IFN- γ sont proches de 0,003 mg/10⁸ cellules/h dès le début de la culture. Ainsi, bien que les cinétiques de croissance cellulaire soient comparables entre des cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu BDM ou avec le milieu FCS-BDM, l'ensemble des données relatives à la lyse cellulaire, au métabolisme et à la production de l'IFN- γ permettent de décrire un état physiologique des cellules CHO différent lorsque les cellules sont cultivées avec le milieu FCS-BDM. De même que pour les cultures supplémentées en EDTA-fer, les vitesses spécifiques de production de l'IFN- γ particulièrement faibles au début des cultures effectuées en présence de sérum peuvent

probablement être corrélées avec une proportion de glycoformes 2N faible et proche de 50-55%.

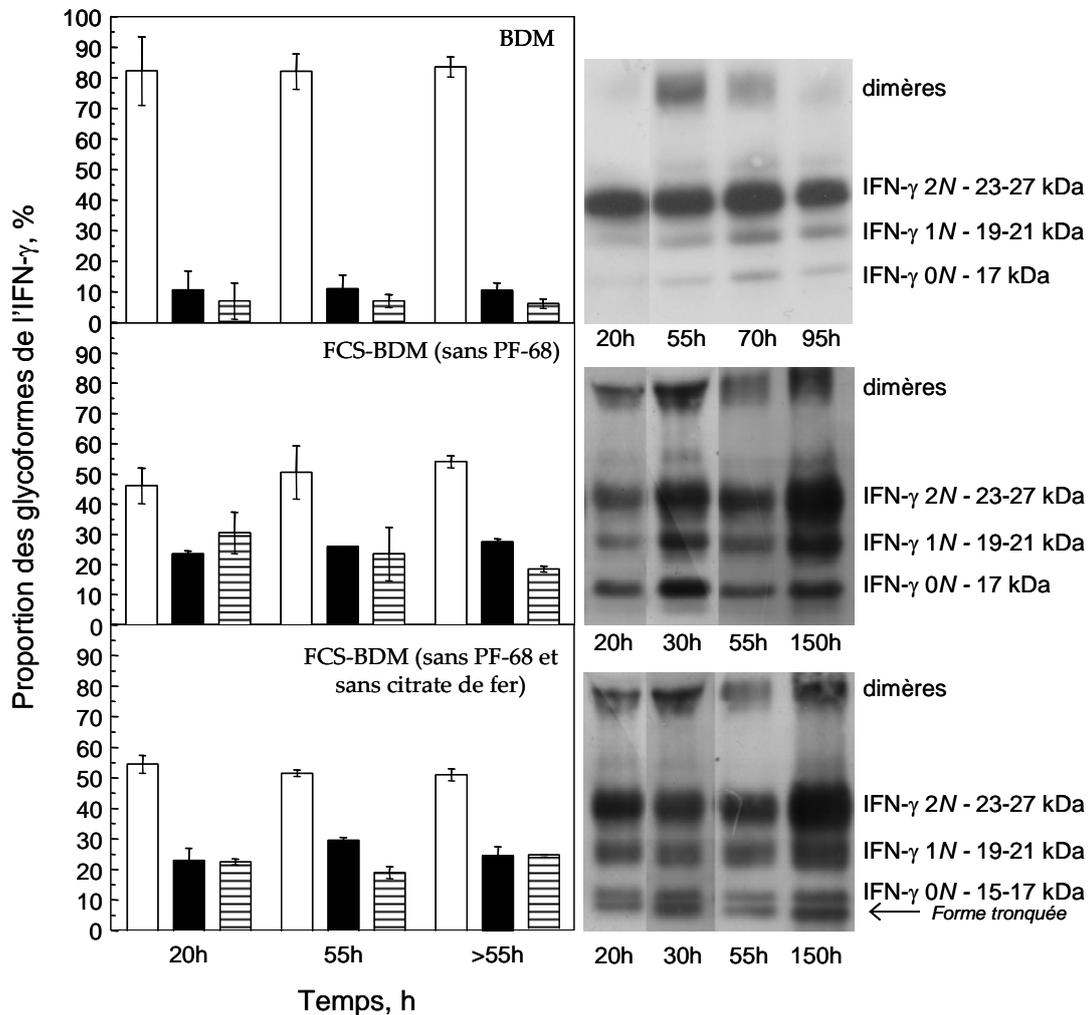


Figure 77 : Macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 effectuées avec les milieux BDM, FCS-BDM et FCS-BDM sans citrate de fer avec différents ajouts ou suppressions de suppléments. Les histogrammes représentent la moyenne des quantifications issues de 2 Western-blots indépendants des proportions des glycoformes 2N (□), 1N (■) et 0N (▨) de l'IFN- γ . Les barres d'erreur indiquent un indice de confiance de 95%.

En revanche, aucune diminution de l'occupation des sites de glycosylation de l'IFN- γ après 50 h de culture n'est observée, que le citrate de fer soit présent ou non dans le milieu de culture FCS-BDM. Ainsi, au vue de l'ensemble de ces résultats, il semblerait que l'addition de sérum au milieu riche BDM influence de manière négative les capacités de production des cellules CHO, tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif.

Il est possible que la formulation d'un milieu trop riche (BDM + sérum), soit défavorable à la cellule, probablement en raison d'un phénomène d'antagonismes entre les composés, les rendant moins biodisponibles pour la cellule.

Enfin, la suppression du citrate de fer lors de cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu FCS-BDM conduit à la formation d'une séquence tronquée de la forme non-glycosylée de l'IFN- γ tout au long du procédé de culture. Ce résultat est en accord avec les résultats précédemment obtenus lors de cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu FCS-RPMI non supplémenté par du citrate de fer. La présence de 500 μ M de citrate de fer aussi bien dans les milieux de culture FCS-RPMI que FCS-BDM permet donc d'éviter la formation d'une séquence tronquée de la forme non-glycosylée de l'IFN- γ produit par des cellules CHO. Une dégradation partielle de l'IFN- γ produit par des cellules CHO 320 avait déjà été observée au LRGP lors de cultures effectuées avec le milieu FCS-RPMI (Lamotte, 1997). Cette dégradation protéolytique ne serait pas directement liée au sérum mais serait due à une protéase intra ou extracellulaire synthétisée par la cellule suite à un changement des conditions de milieu (Gawlitzeck *et al.*, 1995b ; Kratje *et al.*, 1994). L'ajout de sérum dans le milieu BDM n'altère pas la forme ON de l'IFN- γ . En revanche, lorsque le citrate de fer est supprimé du milieu BDM supplémenté par du sérum, une dégradation protéolytique de l'IFN- γ est obtenue. Il semble nécessaire de souligner que le sérum contient des protéases (Galati *et al.*, 2003). Le clivage de la structure primaire de l'IFN- γ a notamment été rapporté lors de cultures de cellules CHO réalisées en présence de sérum, alors qu'en absence de sérum, aucune protéolyse n'avait été mise en évidence (Castro *et al.*, 1995).

4.2.4. Influence de la suppression du citrate de fer sur la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ produit au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 effectuées avec le milieu BDM

Afin de valider notre hypothèse selon laquelle la ou les protéase(s) impliquée(s) dans la protéolyse de l'IFN- γ ne seraient pas apportées par le sérum mais sécrétées par la cellule, nous avons caractérisé la qualité de l'IFN- γ produit au cours de cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu BDM sans citrate de fer. Toutefois, aucune croissance cellulaire n'étant possible en absence de citrate de fer dans le milieu BDM (cf. paragraphe 3.2 du Chapitre V), la caractérisation de la qualité de l'IFN- γ a été réalisée lorsque les cellules CHO ont été cultivées avec le milieu BDM sans citrate de fer auquel 500 μ M de citrate de fer ont été ajoutés après 30 h de culture. L'ajout de citrate de fer après 30 h de culture a permis

d'obtenir une croissance correcte des cellules et peu de cellules lysées au cours de la culture. La production de l'IFN- γ recombinant étant associée à la croissance des cellules CHO et les vitesses spécifiques de production de l'IFN- γ étant après 30 h de culture similaires et voisines de 0,06 mg/10⁸ cellules/h pour les cultures de cellules CHO effectuées avec les milieux BDM et BDM sans citrate de fer (ajout à 30 h de culture), la caractérisation de la qualité de l'IFN- γ produit avant ajout de citrate de fer dans le milieu de culture devrait permettre de vérifier si l'IFN- γ est dégradé.

La caractérisation de la qualité de l'IFN- γ produit au cours d'une culture de cellules CHO effectuée avec le milieu BDM dépourvu de citrate de fer pendant les 30 premières heures de la culture est présentée sur la Figure 78.

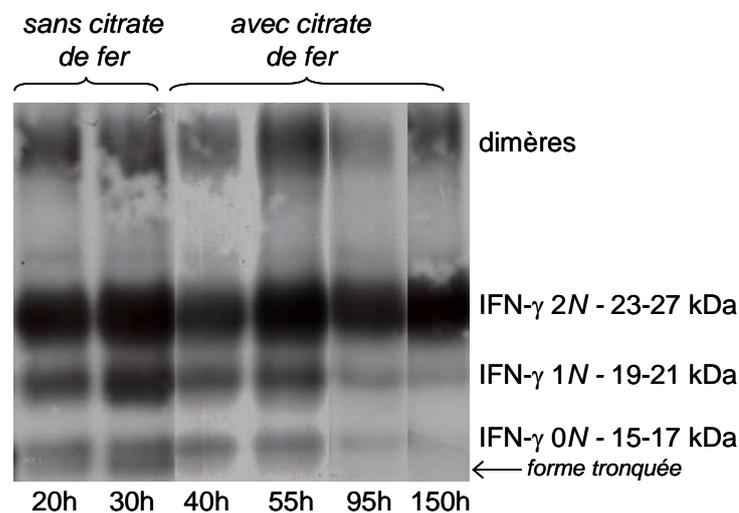


Figure 78 : Visualisation par Western-blot de la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ produit au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320. Le milieu BDM ne contient pas initialement de citrate de fer, puis 500 μ M de citrate de fer ont été ajoutés après 30 h de culture.

L'absence de citrate de fer dans le milieu de culture BDM sans sérum amène à une dégradation partielle de l'IFN- γ observable au cours des 30 premières heures de la culture. L'IFN- γ étant produit pendant environ 120 h, l'ajout de citrate de fer dans le milieu à 30 h de culture permet d'éviter la dégradation de l'IFN- γ . Ainsi, la proportion d'IFN- γ dégradé diminue au fur et à mesure de la culture, l'IFN- γ nouvellement synthétisé n'étant pas protéolysé. En raison de la sensibilité du Western-blot, l'IFN- γ protéolysé n'est donc plus détecté après 55 h de culture.

Ainsi, au regard de ce résultat, il peut raisonnablement être conclu qu'au moins une ou plusieurs protéase(s) impliquée(s) dans le processus de dégradation de l'IFN- γ ne sont pas

apportées ou induites par le sérum. En outre, ce résultat confirme l'hypothèse selon laquelle le citrate de fer permet d'inhiber l'activité protéolytique de l'enzyme impliquée dans le processus de dégradation de l'IFN- γ . Enfin, l'ajout de 500 μ M de citrate de fer après 30 h de cultures discontinues de cellules CHO effectuées avec le milieu BDM sans citrate de fer permet de stopper la dégradation protéolytique initiée de l'IFN- γ .

4.3. Conclusions

L'objectif de ce chapitre était de caractériser la qualité de l'IFN- γ produit au cours de cultures discontinues de cellules CHO et d'identifier les effets des différentes suppléments apportées aux milieux FCS-RPMI et BDM. En effet, comme nous l'avons indiqué dans le chapitre III, lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu BDM, la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ demeure constante tout au long du procédé. On peut supposer que le milieu de culture BDM, de par sa composition riche et diversifiée, tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif, apporte des éléments permettant d'assurer une glycosylation efficace. La supplémentation du milieu RPMI par du sérum n'empêche pas la diminution de la glycosylation, suggérant que des constituants additionnels apportés par le milieu BDM sont absents ou présents en trop faibles quantités dans le sérum.

Nos résultats montrent que l'ajout de 500 μ M de citrate de fer, un composé présent dans le milieu BDM mais absent dans le milieu RPMI, lors de cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu FCS-RPMI permet de maintenir constante la macroglycosylation de l'IFN- γ tout au long de la culture. Le citrate de fer est donc un composé essentiel qui permet, probablement de façon indirecte, de maintenir une glycosylation constante de l'IFN- γ au cours de cultures réalisées avec le milieu pauvre FCS-RPMI.

Jusqu'à présent, les facteurs responsables de la diminution de la glycosylation de l'IFN- γ n'ont pas été clairement identifiés. Toutefois, l'influence de la composition du milieu de culture sur le métabolisme cellulaire (Goochee and Monica, 1990), et *a fortiori* sur le processus de glycosylation a toujours été fortement suspectée. De nombreux travaux ont été conduits pour expliquer la diminution de la glycosylation, généralement dans des conditions de limitation en glucose (Hayter *et al.*, 1992). Dans notre cas, pour toutes les cultures de cellules CHO réalisées, la concentration initiale en glucose a été fixée à 20 mM, afin qu'il ne soit pas limitant.

L'apport de citrate de fer ammoniacal ou du complexe citrate de fer – sélénite de sodium a également permis de maintenir constante la glycosylation de l'IFN- γ au cours de cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu FCS-RPMI. Ainsi, l'apport de fer biodisponible aux cellules CHO permet d'améliorer la croissance cellulaire, la production de l'IFN- γ ainsi que la qualité de ce dernier. Le fer est un élément impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques (respiration cellulaire, enzymes du TCA...), cet élément concourt au bon fonctionnement cellulaire et ainsi à l'amélioration de l'état physiologique général de la cellule. En revanche, nous avons également montré dans ce chapitre que l'ajout de sérum au milieu riche BDM réduisait fortement le pourcentage de glycoformes 2N (50-55% *vs.* 80%) ; ce pourcentage peu élevé demeurant constant au cours de la culture. Cette diminution de l'occupation des sites de glycosylation pourrait être liée à un phénomène d'antagonismes entre les composés du sérum et ceux du milieu BDM, rendant alors un ou plusieurs composés moins disponibles pour la cellule. Ainsi, la composition du milieu de culture influence le profil de glycosylation de l'IFN- γ au cours de cultures discontinues de cellules CHO ; l'ajout et/ou le retrait de composés pouvant être positif comme négatif. Des études récentes ont montré que des paramètres autres que la composition du milieu de culture, tels que le pH, la température ou encore les stress hydrodynamiques peuvent également influencer l'occupation des sites de glycosylation, en particulier du tPA produit au cours de cultures de cellules CHO (Gawlitzeck *et al.*, 2009 ; Senger and Karim, 2003).

Enfin, nous avons montré que la présence de fer complexé au citrate, quel que soit le milieu utilisé (RPMI, BDM, avec ou sans sérum) permet d'éviter la protéolyse partielle de l'IFN- γ produit au cours de cultures discontinues de cellules CHO. Cette dégradation partielle de l'IFN- γ n'est pas propre à la présence de sérum dans le milieu de culture puisqu'une séquence tronquée de la forme 0N de l'IFN- γ est obtenue avec le milieu riche BDM dépourvu de citrate de fer au cours des 30 premières heures de culture. Ainsi, sur la base de ces résultats, il semblerait que l'activité impliquée dans le processus de dégradation partielle de l'IFN- γ soit de nature protéasique et synthétisée par la cellule. Il serait donc intéressant d'essayer de mieux caractériser cette activité protéasique active en absence de citrate de fer.

4.4. Hétérogénéité de la structure primaire de l'IFN- γ

4.4.1. Caractérisation de l'hétérogénéité de la structure primaire de l'IFN- γ par zymographie

Afin de déterminer la présence de protéases et de mettre en évidence la ou les famille(s) de protéases impliquées dans le processus de dégradation partielle de l'IFN- γ , des zymogrammes à gélatine et à caséine ont été réalisés pour différentes conditions de culture.

4.4.1.1. Mise en évidence des activités gélatinase

La Figure 79 présente des zymogrammes à gélatine réalisés pour 3 conditions de culture de cellules CHO effectuées avec des milieux différents :

- ✓ milieu BDM
- ✓ milieu BDM supplémenté avec du sérum (FCS-BDM)
- ✓ milieu RPMI supplémenté avec du sérum (FCS-RPMI)

Selon les conditions de culture, l'activité gélatinase présente dans les surnageants de culture des cellules CHO diffère. En effet, lorsque les cellules CHO sont cultivées avec les milieux FCS-BDM et FCS-RPMI, autrement dit avec des milieux supplémentés en sérum, deux bandes plus ou moins diffuses sont détectées dès le début de la culture : une bande de poids moléculaire proche de 90 kDa et une autre de poids moléculaire proche de 65 kDa. Contrairement aux cultures effectuées en présence de sérum, aucune activité protéasique n'est détectée au début de la culture en milieu BDM. Après 20 h de culture, une seule bande apparaît (90 kDa), dont l'intensité augmente avec le temps.

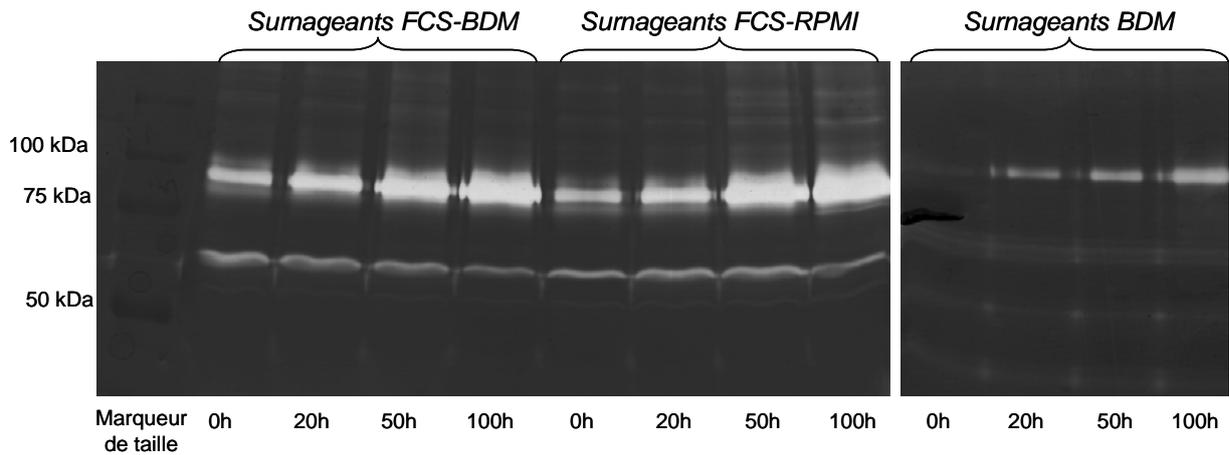


Figure 79 : Zymogrammes des activités gélatinase présentes au cours de cultures de cellules CHO 320 effectuées avec les milieux FCS-BDM, FCS-RPMI et BDM.

Ainsi, lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu BDM, une seule activité gélatinase est détectée dès les premières heures de la culture. Cette activité est soit relarguée suite à une lyse cellulaire soit sécrétée par la cellule puisqu'elle augmente au cours du procédé. Etant donné que le processus de mort cellulaire reste extrêmement négligeable durant cette culture, nous privilégierons l'excrétion. Lorsque les cultures de cellules CHO sont mises en œuvre avec des milieux contenant du sérum, deux activités gélatinase sont apportées par le sérum. Il faut également souligner que l'activité gélatinase de poids moléculaire d'environ 90 kDa augmente au cours du temps de façon similaire à la culture effectuée avec le milieu BDM, mais est présente en quantité plus élevée. Il semble donc que l'activité gélatinase identifiée vers 90 kDa soit à la fois apportée par le sérum et sécrétée par la cellule ; cette activité pouvant être due à une même enzyme ou différentes enzymes de poids moléculaire similaires.

De façon à identifier la famille de protéases à laquelle appartiennent les protéases visualisées sur zymogramme à gélatine, des inhibiteurs de différentes familles de protéases ont été ajoutés dans le tampon d'incubation des gels après séparation électrophorétique (Figure 80) :

- ✓ Cocktail anti-protéases ne contenant pas d'EDTA : inhibiteur des protéases à sérine et à cystéine.
- ✓ PMSF : inhibiteur des protéases à sérine
- ✓ EDTA : inhibiteur des métalloprotéases
- ✓ Citrate de fer : inhibiteur de la protéolyse de l'IFN- γ

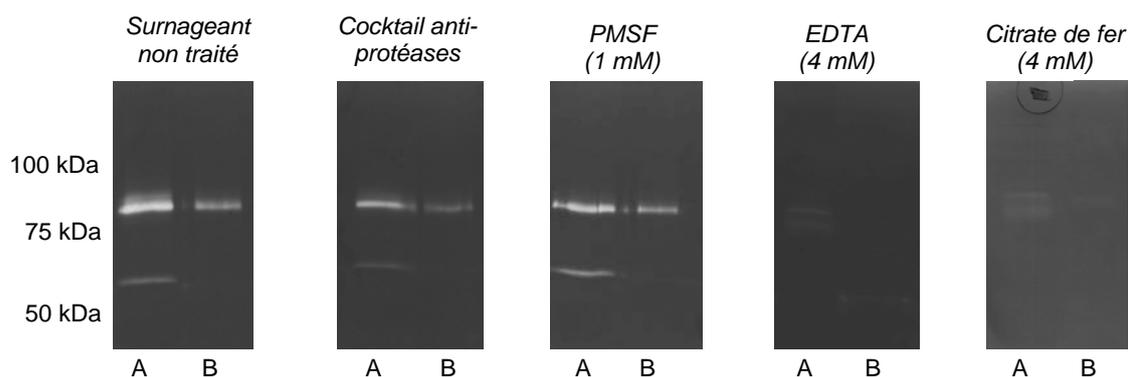


Figure 80 : Zymogrammes, traités avec 3 inhibiteurs de différentes familles de protéases et avec le citrate de fer, des activités gélatinase présentes dans deux surnageants de culture prélevés à 100 h de culture lorsque les cellules CHO 320 ont été cultivées avec les milieux FCS-BDM (A) et BDM (B).

Les activités gélatinases des surnageants issus de cultures de cellules CHO effectuées avec les milieux FCS-BDM et BDM sont inhibées en présence d'EDTA mais ne le sont pas en présence de PMSF ou du cocktail anti-protéases. Les deux bandes observées en absence d'EDTA sont donc probablement les produits de dégradation de métalloprotéases présentes dans le sérum ou excrétées par la cellule. La Figure 80 met en évidence que le citrate de fer, au même titre que l'EDTA, permet d'inhiber l'activité des métalloprotéases présentes dans les surnageants de culture des cellules CHO.

Sur la base des poids moléculaires, plusieurs métalloprotéases peuvent correspondre aux bandes détectées sur zymogrammes à gélatine. Pour la bande dont le poids moléculaire est proche de 90 kDa, il pourrait s'agir de la forme latente (~ 92 kDa) ou active (~ 86 kDa) de la MMP-9. En effet, les métalloprotéases sont exprimées sous une forme inactive, encore appelée zymogène (pro-MMP) puis activées par d'autres protéases ou encore *in-vitro* par l'addition de composés chimiques tels que l'agent organomercurel (APMA) (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990). L'activation de l'enzyme par l'APMA repose sur la modification chimique du résidu cystéine du prodomaine interagissant avec l'atome de zinc du site actif par le mercure de l'APMA. Cette modification entraîne un déplacement du prodomaine du site actif permettant une autolyse de l'enzyme aboutissant à l'élimination du prodomaine.

En ce qui concerne l'activité protéasique identifiée à un poids moléculaire proche de 65 kDa, différentes métalloprotéases pourraient en être à l'origine; trois protéases sous forme active, à

savoir la MMP-2 (~ 66 kDa), la MMP-15 (~ 60 kDa) et la MMP-24 (~62 kDa) et quatre protéases sous forme zymogène, la pro-MMP-2 (~72 kDa), la pro-MMP-14 (~66 kDa), la pro-MMP-15 (~72 kDa) et la pro-MMP-16 (~64 kDa). En effet, il est à noter que plusieurs auteurs rapportent le fait que les formes zymogènes, a priori inactives, peuvent être révélées par zymogrammes (Elliott *et al.*, 2003 ; Mols *et al.*, 2005).

Afin de déterminer s'il s'agit d'une forme zymogène ou d'une forme active des métalloprotéases, les surnageants de culture ont été traités par l'APMA avant dépôt sur gel. L'APMA permet de cliver le propeptide du zymogène, ce qui conduit à une protéase dont le poids moléculaire est d'environ 10 kDa plus faible.

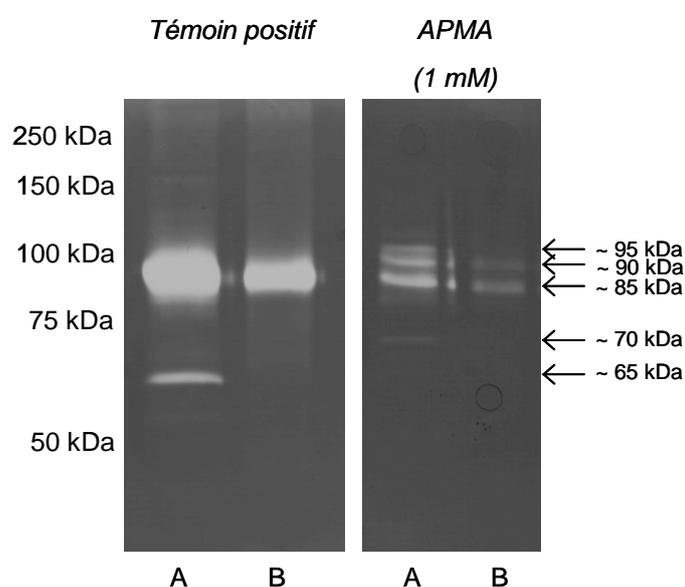


Figure 81 : Zymogrammes des activités gélatinase présentes dans deux surnageants de culture prélevés à 100 h de culture lorsque les cellules CHO 320 ont été cultivées avec les milieux FCS-BDM (A) et BDM (B). L'APMA est un activateur de la forme zymogène des métalloprotéases.

Lorsque les cultures de cellules CHO sont effectuées avec le milieu BDM, le traitement des surnageants de culture avec l'APMA conduit à la formation de deux bandes dont la différence des poids moléculaires est d'environ 10 kDa (piste B du zymogramme « APMA »). Ce résultat montre donc que l'activité protéasique obtenue en absence de traitement à l'APMA pourrait correspondre à la forme zymogène de la MMP-9 (pro-MMP-9). D'autres études ont rapporté la présence d'une métalloprotéase pro-MMP-9 sécrétée au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320 (Mols *et al.*, 2005) et de cellules CHO-K1 (Elliott *et al.*, 2003).

Lorsque les cultures de cellules CHO sont effectuées avec le milieu FCS-BDM, après traitement à l'APMA, trois bandes distinctes apparaissent, dont deux de poids moléculaires identiques à ceux obtenus pour la culture cellulaire effectuée avec le milieu BDM (piste A du zymogramme « APMA »). Ainsi, pour cette condition de culture, il semblerait qu'il y ait présence d'une autre protéase de poids moléculaire supérieur de quelques kilodaltons à celle mise en évidence pour la culture en absence de sérum et de traitement à l'APMA. Cette protéase non identifiée est donc apportée ou induite par le sérum. La présence de MMP-9 (active ou inactive) dans les cultures de cellules CHO effectuées avec les milieux BDM et FCS-BDM a été déterminée grâce à un anticorps anti-MMP-9 spécifique (Figure 82). Ce résultat montre que la MMP-9 est présente dans les surnageants de cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu FCS-BDM. Ainsi, il est probable que la 3^e protéase identifiée sur zymogramme à gélatine soit la MMP-9 et plus précisément la pro-MMP-9 (Elliott *et al.*, 2003 ; Mols *et al.*, 2005). En revanche, aucune MMP-9 n'a été identifiée lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu BDM.



Figure 82 : Mise en évidence par Western-blot de la MMP-9 dans les surnageants (T=100 h) de cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu BDM (A & B) et le milieu FCS-BDM (C & D). Pistes A & C : surnageants non concentrés ; pistes B & D : surnageants concentrés 10 fois.

Après traitement à l'APMA (Figure 81), une bande d'intensité très faible est également détectée vers 70 kDa. Cette bande correspond probablement à une forme tronquée du côté C-terminal de la MMP-9 (Mols *et al.*, 2005). En effet, la procédure d'activation par l'APMA entraîne certainement aussi une autolyse du domaine hémapexine, pouvant générer une protéine migrant vers 65 – 70 kDa (David, 2007).

Après traitement à l'APMA, la bande de poids moléculaire proche de 65 kDa n'est plus détectée. Etant donné la faible intensité initiale, il semblerait que la protéase responsable de la dégradation de la gélatine soit également une protéase sous forme latente. Ainsi, l'activation de la forme latente avec l'APMA conduit à la présence des formes latentes et actives de la protéase qui se retrouvent alors en quantité insuffisante pour être détectée par zymographie. Sur la base de leur poids moléculaire et parmi celles sous forme latente, il est très probable que la pro-MMP-14 soit impliquée. En effet, Mols *et al.* (2005) ont montré que la lignée cellulaire CHO 320 cultivée avec le milieu FCS-BDM sécrétait une pro-MMP-14 et une MMP-14 active. Par ailleurs, pour ces conditions de culture, ils ont montré l'absence de MMP-2, sous quelle que forme que ce soit, par Western-blot.

4.4.1.2. Mise en évidence d'activités caséinase

La Figure 83 présente les résultats obtenus sur zymogramme à caséine. Pour un surnageant de fin de culture issu de la culture de cellules CHO réalisée avec le milieu BDM, trois bandes sont détectées mais avec une intensité très faible (Figure 83A, piste a). Concernant la culture réalisée avec le milieu FCS-BDM, 4 bandes d'intensités plus élevées sont obtenues (Figure 83A, piste b).

Le suivi cinétique des protéases à activité caséinase de cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu FCS-BDM est présenté sur la Figure 83B. Trois bandes de poids moléculaires proches de 220 kDa, 90 kDa et 85 kDa ont été identifiées avec une intensité constante tout au long de la culture. La protéase de poids moléculaire proche de 220 kDa est probablement apportée ou induite par le sérum puisqu'elle n'est pas retrouvée lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu BDM. Les bandes observées pour des poids moléculaires proches de 90 kDa et 85 kDa sont pour une large part également dues à des protéases apportées ou induites par le sérum. En effet, étant donné que ces bandes ont également été identifiées pour la culture effectuée avec le milieu BDM mais avec une intensité très faible (Figure 83A), il est possible que la cellule sécrète en très faible quantité les protéases responsables de la dégradation de la caséine. Une autre hypothèse consiste en la présence d'activités protéasiques subsidiaires, résultant de la pré-culture des cellules CHO effectuée avec le milieu FCS-RPMI, autrement dit en présence de sérum.

Enfin, après 100 h de culture, deux activités protéasiques supplémentaires sont détectées. Une des deux bandes correspond à une protéase de poids moléculaire proche de 140 kDa, cette bande correspond à une activité protéasique présente aussi bien dans les surnageants de cultures des cellules CHO effectuées avec le milieu FCS-BDM que pour celles effectuées

avec le milieu BDM. Une autre bande de poids moléculaire proche de 40 kDa est détectée avec une faible intensité lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu FCS-BDM. Ces protéases sont donc probablement libérées au cours de la lyse cellulaire étant donné qu'après 100 heures de culture, les cellules CHO commencent à entrer en phase de déclin.

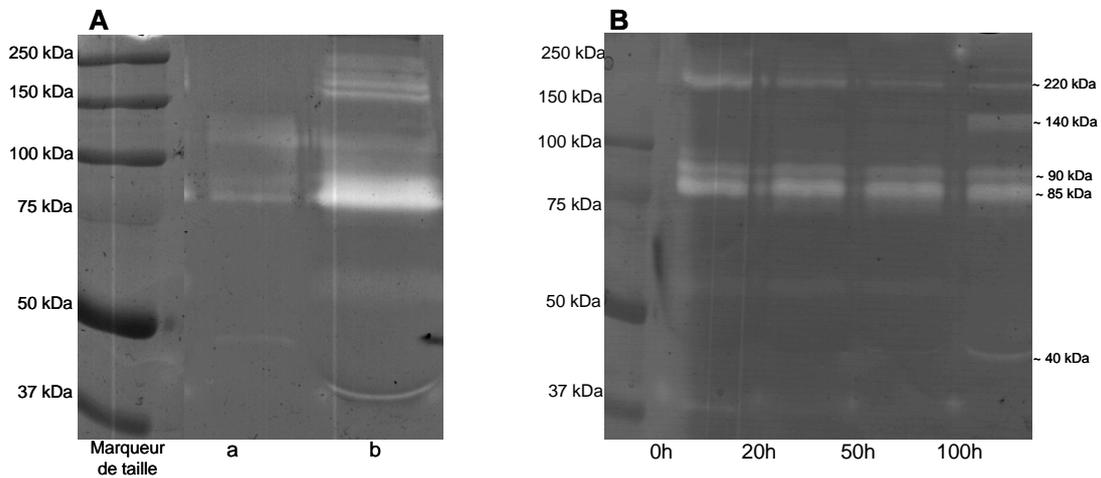


Figure 83 : (A) Zymogramme des activités caséinase présentes dans deux surnageants de culture prélevés à 100 h de culture lorsque les cellules CHO 320 ont été cultivées avec les milieux BDM (a) et FCS-BDM (b). (B) Zymogramme des activités caséinase présentes au cours de cultures de cellules CHO 320 effectuées avec le milieu FCS-BDM.

Afin d'identifier la ou les famille(s) de protéases auxquelles appartiennent les protéases ayant une activité caséinase, des inhibiteurs de différentes familles de protéases ont été ajoutés dans le tampon d'incubation des gels, après séparation électrophorétique des protéines (Figure 84).

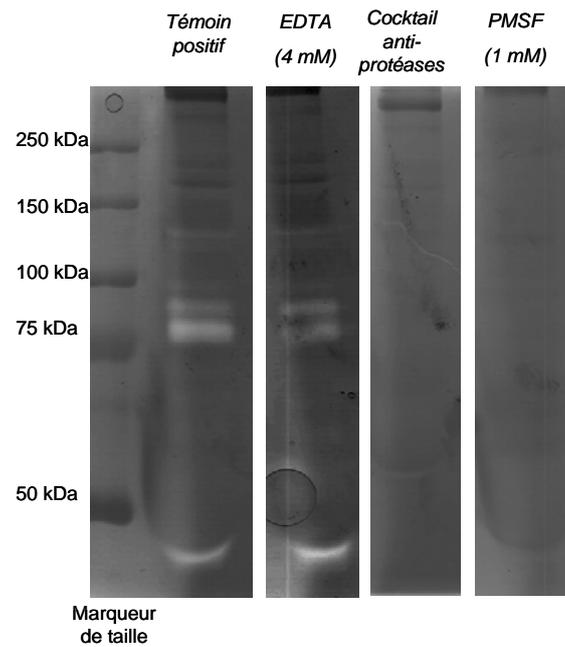


Figure 84 : Zymogrammes des activités caséinase présentes dans un surnageant de culture prélevé à 100 h de culture lorsque les cellules CHO 320 ont été cultivées avec le milieu FCS-BDM. Les zymogrammes ont été traités avec 3 inhibiteurs de différentes familles de protéases.

L'ajout d'EDTA ne permet pas d'inhiber les activités caséinases retrouvées dans les surnageants de culture de cellules CHO. Les protéases responsables de la dégradation de la caséine ne sont donc pas des métalloprotéases. A la fois le cocktail anti-protéases à sérine et à cystéine et le PMSF permettent d'inhiber la totalité des activités caséinases. Il semblerait donc que les protéases à activité caséinase détectées dans les surnageants de culture de cellules CHO soient des protéases à sérine.

Une caractérisation plus approfondie de chaque protéase à sérine n'a pas été effectuée. Mols *et al.* (2005) ont montré la présence de protéases à sérine au cours de cultures discontinues de cellules CHO 320, notamment l'urokinase (u-PA) présente à la fois sous ses formes actives et inactives, l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), le complexe PA/PAI (t-PA ou u-PA associé au PAI (inhibiteur des t-PA et u-PA) et 2 protéases à sérine membranaires, la dipeptidyl peptidase IV et la tripeptidyl peptidase II. La dipeptidyl peptidase a été identifiée chez de nombreux types de cellules (McDonald and Barrett, 1986). Cette enzyme clive spécifiquement la séquence alanine-proline et l'IFN- γ possède cette séquence en position 122-123 permettant de libérer un peptide composé de 21 acides aminés (2,4 kDa). Toutefois, la masse moléculaire de cette enzyme est de 110 kDa sous sa forme inactive et de 140 kDa sous sa forme active. Etant donné que la dégradation partielle de l'IFN- γ se produit dès le début de la culture et qu'avec un zymogramme à caséine, une bande d'environ 140 kDa n'est

visualisée qu'à partir de 100 h de culture, il est donc peu probable que cette enzyme soit impliquée dans la dégradation partielle de l'IFN- γ visualisée en début de culture.

L'activité caséinase de poids moléculaire proche de 140 kDa pourrait également correspondre à la tripeptidyl peptidase II, sa masse moléculaire théorique étant de 138 kDa.

Une autre protéase à sérine de masse moléculaire proche de 40 kDa a également été mise en évidence en fin de culture au cours de nos travaux. Outre les travaux de Mols *et al.* (2005), d'autres études ont également rapporté la présence de protéases à sérine libérées en fin de cultures discontinues de cellules CHO 320 (Goldman *et al.*, 1997). L'analyse par spectrométrie de masse des séquences d'IFN- γ retrouvées dans les surnageants de culture cellulaire a conduit Goldman *et al.* (1997) à identifier plusieurs produits de protéolyse de l'IFN- γ au cours de la culture. Ces auteurs ont montré que l'IFN- γ pourrait être clivé en fin de culture par l'action de carboxypeptidases ou de protéases à sérine relarguées par les cellules mortes. Par ailleurs, d'après ces auteurs, l'IFN- γ serait soumis à l'action d'une endoprotéase non identifiée dès le début de la culture, le clivant au niveau de la glutamine 133. Cette coupure permettrait d'obtenir un IFN- γ tronqué contenant 10 acides aminés de moins (soit environ 1,1 kDa).

Les protéases à sérine de masses moléculaires proches de 220 kDa, 90 kDa et 85 kDa ont été obtenues de façon constante tout au long du procédé de culture de cellules CHO effectuée avec le milieu FCS-BDM. La protéase de 220 kDa est apportée par le sérum ; il est possible qu'il s'agisse d'un complexe protéasique. En ce qui concerne les activités protéasiques dont les masses moléculaires sont proches de 90 kDa et 85 kDa, il est possible qu'il s'agisse du plasminogène (92 kDa) et de sa forme active, à savoir la plasmine (85 kDa). Toutefois, chez l'homme, le plasminogène est synthétisé essentiellement par le foie. Seuls les polynucléaires éosinophiles, le rein et la cornée sont également capables de le synthétiser (Cerba, 2007). Ces deux protéases à sérine étant présentes à un niveau très faible lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu BDM, l'hypothèse que ces deux protéases soient le plasminogène et la plasmine est peu probable, sauf si une activité résiduelle liée à la pré-culture persiste. En effet, les pré-cultures sont effectuées en présence de milieu FCS-RPMI.

4.4.1.3. Conclusions

Nous avons montré au début de ce chapitre que dans certaines de nos conditions de culture, la production de l'IFN- γ par les cellules CHO était altérée puisqu'une dégradation partielle de l'IFN- γ était observée dès le début de la culture. La dégradation des protéines recombinantes produites au cours d'un procédé de culture de cellules animales est généralement attribuée à l'activité d'une ou plusieurs protéases sécrétées par les cellules (Chuan *et al.*, 2006; Page *et al.*, 1984 ; Sandberg *et al.*, 2006).

En effet, différentes études ont montré la présence de protéases au cours de cultures de cellules CHO (Elliott *et al.*, 2003 ; Mols *et al.*, 2005 ; Robert *et al.*, 2009 ; Sandberg *et al.*, 2006 ; Satoh *et al.*, 1990), d'hybridomes et de myélomes de souris (Karl *et al.*, 1990 ; Spens and Haggstrom, 2005 ; Van Erp *et al.*, 1991).

Une forme tronquée de l'IFN- γ est présente lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu BDM en absence de citrate de fer. En effet, le zymogramme à gélatine a montré qu'une protéase était détectée dans le surnageant de culture. Nos travaux montrent que la protéase impliquée est une métalloprotéase autre que la pro-MMP-9. Nous avons également montré que l'activité gélatinase de cette protéase est inhibée par l'ajout de 4 mM d'EDTA ou de 4 mM de citrate de fer dans le tampon d'activation du zymogramme.

La présence de la MMP-9 a été confirmée grâce à un anticorps anti-MMP-9 spécifique lorsque les cellules CHO sont cultivées en présence de sérum. Le substrat privilégié de la MMP-9 est le motif suivant : Gly-Pro-Gln-Gly+Ile-Phe-Gly-Gln (Netzel-Arnett *et al.*, 1993). Dans les conditions de culture avec sérum, cette métalloprotéase MMP-9 pourrait cliver l'IFN- γ non glycosylé au niveau du site Gly₅₄-Ile₅₅ (Barrett *et al.*, 1998 ; Mols *et al.*, 2005).

Enfin, nos travaux ont également permis de mettre en évidence plusieurs autres protéases appartenant à deux familles différentes. Une métalloprotéase apportée par le sérum a été mise en évidence avec un poids moléculaire proche de 65 kDa. Il pourrait s'agir de la pro-MMP-14 (Mols *et al.*, 2005). Les cinq autres protéases mises en évidence dans les surnageants de culture de cellules CHO appartiennent à la famille des protéases à sérine et possèdent une activité caséinase. L'activité protéasique de 220 kDa est apportée ou induite par le sérum ; celles de poids moléculaires proches de 140 kDa et 40 kDa sont relarguées après 100 h de culture, autrement dit au moment où les cellules entrent en phase de déclin. Elles sont donc probablement libérées au cours de la mort cellulaire. Enfin, des protéases à sérine de poids moléculaires proches de 90 kDa et 85 kDa ont également été mises en évidence. L'ensemble

de ces protéases à sérine ne sont probablement pas impliquées dans la protéolyse de l'IFN- γ produit au cours des cultures de cellules CHO. En revanche, il est possible que ces protéases aient un effet négatif sur la croissance des cellules CHO. En effet, il a été montré que l'ajout d'aprotinine dans le milieu de culture, un inhibiteur de protéases à sérine, permettait d'améliorer les vitesses spécifiques de croissance des cellules NS0 (Spens and Haggstrom, 2005). L'inhibition des protéases à sérine peut effectivement permettre de maintenir l'intégrité de certaines protéines membranaires ou de facteurs de croissance autocrines, augmentant ainsi leur biodisponibilité. Etant donné que nous avons mis en évidence la présence de protéases à sérine dans les surnageants de culture de cellules CHO, l'ajout d'aprotinine dans les cultures de cellules CHO pourrait améliorer la croissance cellulaire. Enfin, notons que la présence d'aspartylprotéases n'a pas été étudiée au cours de nos travaux. En effet, l'étude des protéases à acides est notamment importante lorsque la protéine est produite au cours du procédé et ensuite purifiée. En effet, les étapes de purification requièrent généralement l'utilisation de tampons acides, favorisant ainsi l'activité des protéases à acide aspartique (Robert *et al.*, 2009 ; Spens and Haggstrom, 2005). Dans le cas de l'IFN- γ , la caractérisation de la qualité de l'IFN- γ a été effectuée à partir d'IFN- γ non purifié, les protéases à acide aspartique ne peuvent donc pas être responsables de la dégradation de l'IFN- γ identifiée.

4.4.2. Etude de la relation structure/activité de l'IFN- γ

Dans cette partie, nous nous proposons d'étudier l'influence de la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ sur ses propriétés biologiques, notamment sur ses propriétés d'activation d'une lignée leucémique monocyttaire humaine (THP-1). En effet, bien que l'IFN- γ commercial soit non glycosylé et biologiquement actif, il semble important de garder à l'esprit que l'IFN- γ naturel est quant à lui glycosylé (Sareneva *et al.*, 1995). Il apparaît donc intéressant de caractériser l'influence de la glycosylation de l'IFN- γ sur ses propriétés biologiques.

4.4.2.1. Mise au point de la méthode

Comme décrit dans le paragraphe 3.3 du chapitre « Matériels & Méthodes », l'activité de l'IFN- γ a été déterminée par la mesure du pourcentage d'activation des cellules THP-1 lorsque celles-ci sont cultivées en présence d'IFN- γ . Plus précisément, la stimulation des cellules THP-1 par l'IFN- γ conduit à l'expression des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) tels que les récepteurs HLA-DR (antigènes des leucocytes humains) (Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1988 ; Portillo *et al.*, 1989 ; Sarrazin, 2007). L'utilisation d'anticorps anti-HLA-DR couplés au FITC a donc permis de déterminer le pourcentage des récepteurs HLA-DR exprimés à la surface cellulaire suite à l'action de l'IFN- γ sur les cellules THP-1.

Dans un premier temps, afin de déterminer les concentrations d'IFN- γ nécessaires à l'activation des cellules THP-1, une gamme de concentrations comprise entre 0 et 100 ng/ml d'IFN- γ a été testée (Figure 85). L'IFN- γ commercial étant produit chez *E. coli*, il est par conséquent non glycosylé ; alors que l'IFN- γ produit au cours des cultures de cellules CHO 320 est majoritairement glycosylé. Nous avons utilisé de l'IFN- γ produit au cours de cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu BDM ; le pourcentage des glycoformes 2N, 1N et 0N est donc respectivement de l'ordre de 80-90%, 5-10%, 0-5%. Par ailleurs, l'IFN- γ produit chez *E. coli* (IFN- γ commercial) est un IFN- γ purifié alors que l'IFN- γ produit par les cellules CHO n'a pas été purifié. Les essais ont donc été réalisés à partir d'IFN- γ produits par deux systèmes d'expression différents.

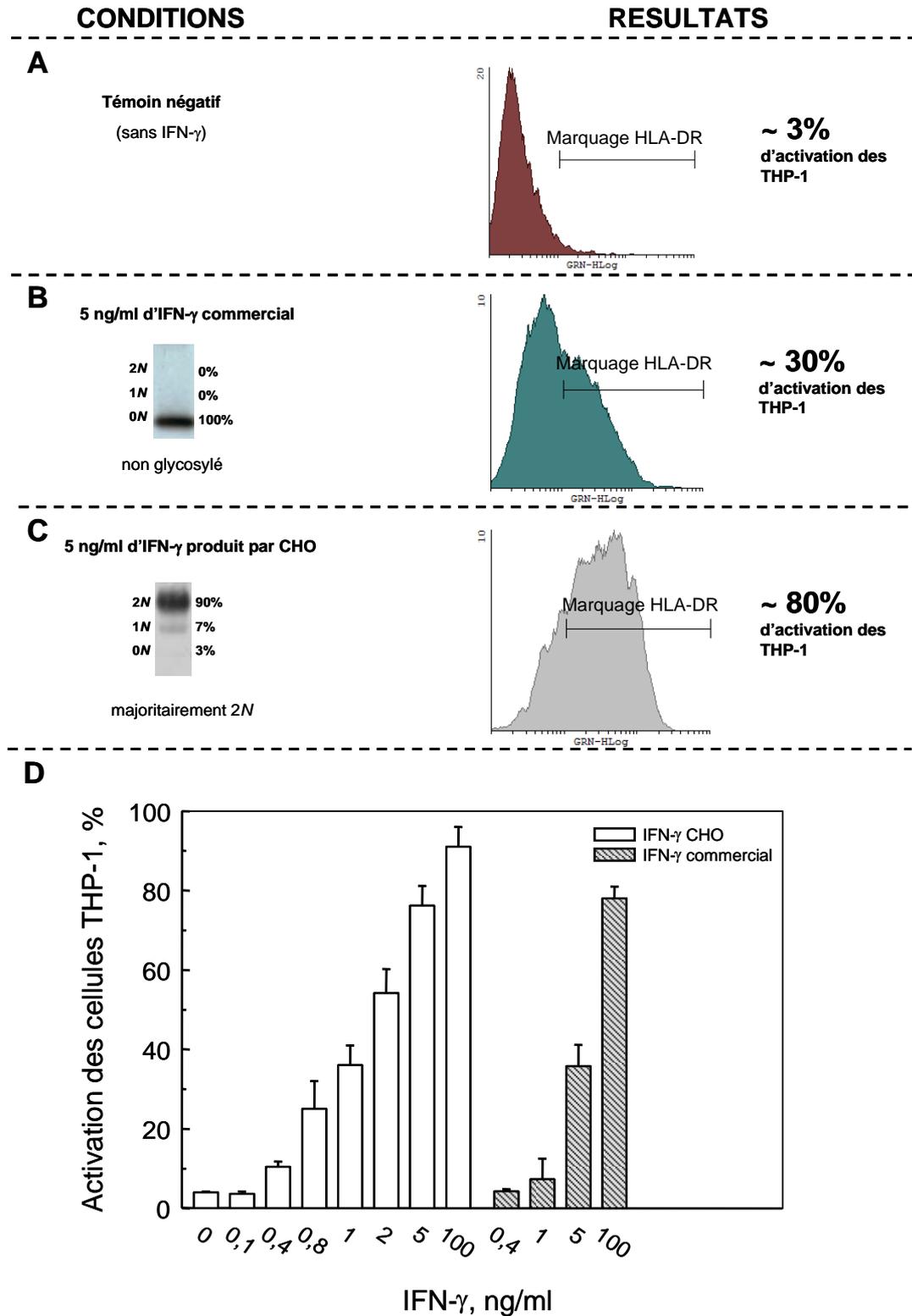


Figure 85 : Evaluation de la fluorescence des cellules THP-1 en absence d'IFN- γ (A), en présence de 5 ng/ml d'IFN- γ produit chez *E. coli* (commercial) (B), en présence de 5 ng/ml d'IFN- γ produit par les cellules CHO 320 (C). Histogrammes représentant les pourcentages d'expression des récepteurs HLA-DR à la surface des cellules THP-1 en fonction de la concentration de l'IFN- γ (D). Les barres d'erreur représentent les écarts-type ($n \geq 3$).

Lorsque les cellules THP-1 sont cultivées en absence d'IFN- γ , les antigènes HLA-DR sont exprimés faiblement, seuls 3 à 4% de l'ensemble des cellules visualisées par le cytomètre présentent une expression. L'activation des cellules THP-1 est proportionnelle à la concentration en IFN- γ . De façon tout à fait intéressante, l'activation des cellules THP-1 par l'IFN- γ produit par les cellules CHO est supérieure à celle obtenue en présence d'IFN- γ commercial à concentration identique. Par exemple, 35% des cellules THP-1 ont exprimé les récepteurs HLA-DR en présence de 1 ng/ml d'IFN- γ produit par les cellules CHO alors que seulement 7% a été obtenu en présence de 1 ng/ml d'IFN- γ commercial (produit par *E. coli*). L'IFN- γ produit par les cellules CHO n'étant pas purifié, différents échantillons témoins ont été testés de façon à s'assurer que l'activation des cellules THP-1 est induite uniquement par l'IFN- γ présent dans les surnageants de culture (Figure 86).

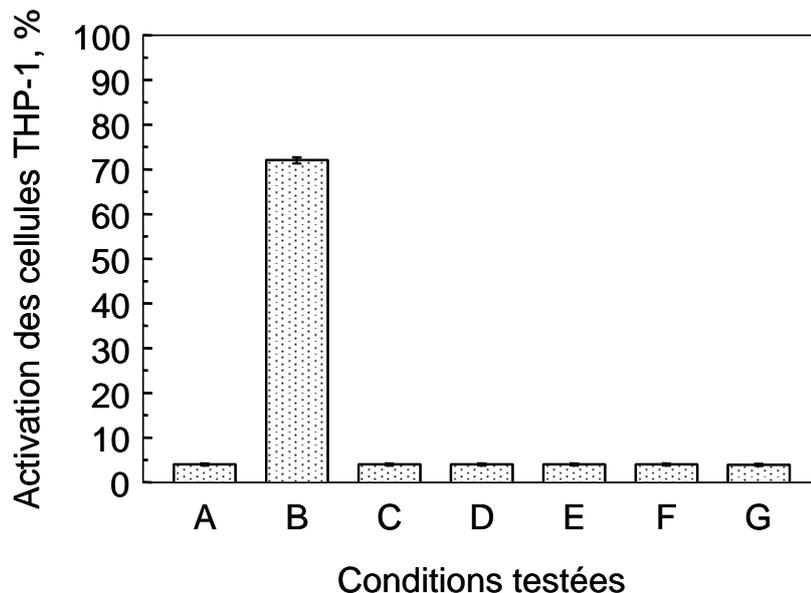


Figure 86 : Pourcentage d'activation des cellules THP-1 en fonction des conditions suivantes : A : sans IFN- γ (Témoin négatif); B : IFN- γ produit par CHO (5 ng/ml) (Témoin positif); C: milieu de culture neuf ; D et E: surnageants de culture de cellules CHO K1 à 48 h et 100 h; F et G : surnageants de culture de cellules CHO exprimant une protéine recombinante autre que l'IFN- γ à 48 h et 100 h.

Lorsque les cellules THP-1 sont cultivées en présence du milieu de culture neuf (BDM), aucune stimulation des cellules THP-1 n'est induite, suggérant que le milieu de culture ne contient pas initialement de substances susceptibles d'activer les cellules THP-1. Les cellules CHO-K1 sont des cellules dérivées, tout comme les cellules CHO 320, de la lignée CHO Dux-B11. Les cellules CHO-K1 sont des cellules adaptées à la culture en suspension (Kochanowski *et al.*, 2006) et ne produisent aucune protéine recombinante. Des surnageants

de cultures de cellules CHO-K1 prélevés après 48 h et 100 h de culture n'induisent aucune stimulation des cellules THP-1, ce qui nous permet de conclure que les cellules CHO ne libèrent ou ne sécrètent aucune molécule susceptible de stimuler les cellules THP-1. Ce résultat est confirmé par l'absence d'activation des cellules THP-1 en présence d'un surnageant de culture de cellules CHO exprimant une protéine recombinante autre que l'IFN- γ (Figure 86, F et G).

4.4.2.2. Suivis cinétiques de l'activité de l'IFN- γ produit au cours de cultures de cellules CHO 320 effectuées avec le milieu BDM

Lors de cette étude, nous avons voulu mesurer les capacités d'activation de l'IFN- γ produit au cours d'une culture de cellules CHO effectuée avec le milieu BDM (Figure 87).

Trois surnageants de culture prélevés à des temps différents de la culture ont été utilisés : 30 h, 55 h et 125 h de culture.

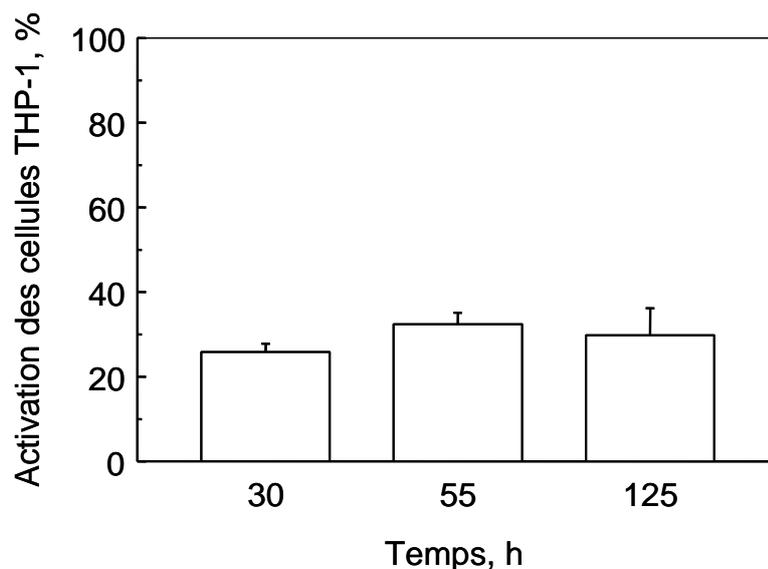


Figure 87 : Pourcentage d'activation des cellules THP-1 par l'IFN- γ produit par les cellules CHO et présent dans les surnageants de culture prélevés à 30 h (A), à 55 h (B) et à 125h (C) lors d'une culture discontinue de cellules CHO effectuée avec le milieu BDM. Les barres d'erreur représentent les écarts-type (n = 3).

L'activité de l'IFN- γ est constante tout au long du procédé lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu BDM. Comme décrit dans la 1^{ère} partie de ce chapitre, la glycosylation de l'IFN- γ demeure constante lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le

milieu BDM et aucune protéolyse de l'IFN- γ n'est observée. Ainsi, il n'est pas surprenant que l'activité de l'IFN- γ soit maintenue constante au cours de ce procédé.

4.4.2.3. Activité de l'IFN- γ produit par les cellules CHO après traitement enzymatique par la N-Glycosidase F

L'activation des cellules THP-1 induite par l'IFN- γ produit par les cellules CHO est supérieure à celle obtenue pour une même concentration d'IFN- γ mais produit par *E. coli*. L'IFN- γ commercial n'est pas glycosylé et, par ailleurs, a été soumis à différentes étapes de purification et de formulation, contrairement à l'IFN- γ produit par les cellules CHO. Afin de s'affranchir des différences de traitement de l'IFN- γ après les étapes de production pouvant potentiellement influencer l'activité de l'IFN- γ , nous avons opté pour une déglycosylation enzymatique de l'IFN- γ produit par les cellules CHO (réalisée avec la Glycosidase F de chez Roche).

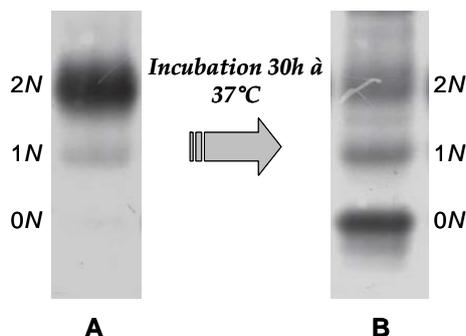


Figure 88 : Visualisation par Western-blot des différents glycoformes de l'IFN- γ , avant (A) et après (B) traitement enzymatique de l'IFN- γ par la N-Glycosidase F dans le surnageant de culture cellulaire.

Pour éviter de dénaturer l'IFN- γ , nous avons donc traité l'IFN- γ par la N-Glycosidase F en ajoutant directement cette enzyme dans le surnageant de culture (Figure 88). La déglycosylation obtenue est partielle mais elle permet d'obtenir de l'IFN- γ sous-glycosylé. Ainsi, sans traitement enzymatique, les pourcentages de glycoformes 2N, 1N et 0N de l'IFN- γ étaient respectivement de l'ordre de 90%, 7% et 3%, les pourcentages obtenus après traitement par la N-glycosidase F sont respectivement de 35%, 20% et 45%. Le pourcentage de glycoformes glycosylées de l'IFN- γ est donc réduit de moitié.

L'IFN- γ commercial a également été traité par la N-glycosidase F sans qu'aucun changement de propriété n'ait été détecté. Cet échantillon a été utilisé comme témoin dans le test

d'activité biologique afin de prendre en compte la présence de l'enzyme *N*-Glycosidase F dans le test d'activité de l'IFN- γ .

Au début de cette étude, nous avons montré qu'une concentration de 1 ng/ml d'IFN- γ permettait d'induire une activation de 30 à 35% des cellules THP-1 alors que pour avoir un pourcentage d'activation comparable, il était nécessaire d'utiliser 5 ng/ml d'IFN- γ commercial non glycosylé. Sur la base de ces résultats, nous avons volontairement utilisé des concentrations différentes d'IFN- γ pour stimuler les cellules THP-1, soit 5 ng/ml d'IFN- γ commercial et 1 ng/ml d'IFN- γ produit par les cellules CHO. Ainsi, ces concentrations différentes nous permettent d'obtenir des signaux identiques mais aussi une sensibilité de la mesure suffisante pour visualiser une différence d'activité (supérieure ou inférieure)

En absence d'IFN- γ , le pourcentage des molécules HLA-DR exprimées à la surface des cellules THP-1 est de l'ordre de 3%, comme nous l'avons déjà mentionné au début de cette partie. Lorsque les cellules THP-1 sont stimulées par 5 ng/ml d'IFN- γ commercial, un pourcentage d'activation des cellules THP-1 de l'ordre de 30 % est obtenu. En présence de la même concentration d'IFN- γ commercial ayant été traité au préalable avec la *N*-Glycosidase F, le pourcentage d'activation des cellules THP-1 reste inchangé et proche de 30 %. Nous pouvons donc raisonnablement conclure que la présence de *N*-Glycosidase F n'a aucun impact sur le test d'activité biologique de l'IFN- γ .

Enfin, en présence de 1 ng/ml d'IFN- γ produit par les cellules CHO, le pourcentage d'activation des cellules THP-1 avoisine les 30 % ; ce pourcentage chute à une valeur proche de 20% en présence de la même concentration d'IFN- γ sous-glycosylé (après traitement à la *N*-Glycosidase F).

Sur la base de ces résultats et de ceux obtenus lorsque les cellules THP-1 sont stimulées par 1 ng/ml d'IFN- γ commercial, une relation entre la proportion de formes glycosylées de l'IFN- γ et son activité a été établie (Figure 89). En effet, plus l'IFN- γ est glycosylé, plus la protéine recombinante est capable d'activer les cellules THP-1.

Ainsi, les résultats obtenus dans cette étude montrent que la glycosylation influence les propriétés biologiques de l'IFN- γ , notamment en termes d'activation d'une lignée monocyttaire. Il est connu que la microhétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ , en particulier la présence d'acides sialiques en α 2,6, permet d'améliorer ses propriétés pharmacocinétiques (Bragonzi *et al.*, 2000) et qu'une hypersialylation de l'IFN- γ entraîne une augmentation de son temps de demi-vie (Sareneva *et al.*, 1993). En revanche, peu d'études

rapportent l'influence de la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ sur ses propriétés biologiques. Il a été montré que l'activité anti-virale de l'IFN- γ non-glycosylé et celle de l'IFN- γ glycosylé sont similaires *in-vitro* (Sareneva *et al.*, 1994). Arakawa *et al.* (1986) ont en effet montré que l'activité anti-virale de l'IFN- γ ne dépendait pas de sa glycosylation mais de la structure primaire de l'extrémité C-terminale (Arakawa *et al.*, 1986b). D'autres études ont également montré l'importance de la structure primaire du côté C-terminal (Arakawa *et al.*, 1989 ; Nacheva *et al.*, 2003). Lundell *et al.* (1991) ont montré que la fixation de l'IFN- γ à son récepteur était réduite lorsque l'extrémité C-terminale n'était pas intacte.

L'IFN- γ est une cytokine impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques : immunomodulatrices, anti-virales ou encore anti-prolifératives. Bien qu'il ait été rapporté que les propriétés anti-virales de l'IFN- γ sont indépendantes de son degré de glycosylation, nous montrons ici que la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ joue un rôle important pour ses propriétés immunomodulatrices.

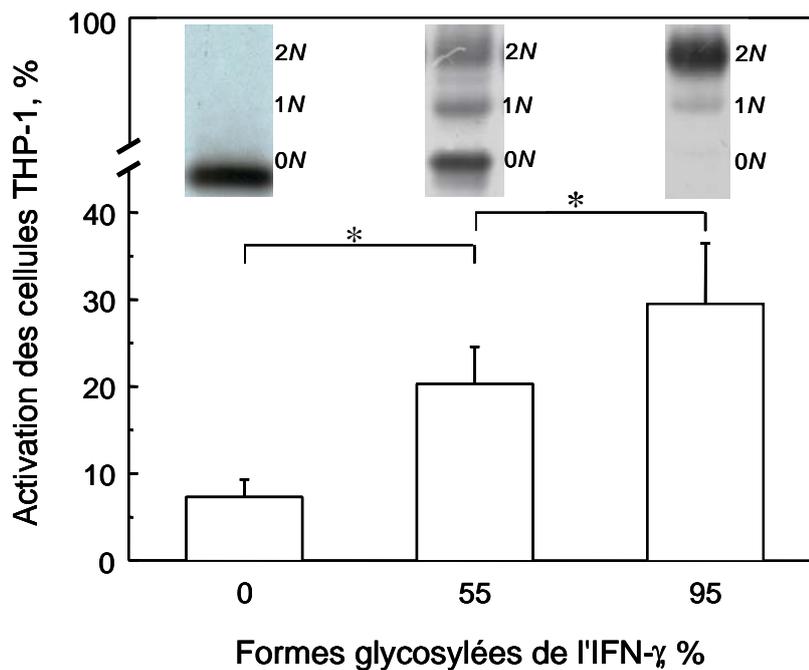


Figure 89 : Pourcentage d'activation des cellules THP-1 en fonction de la proportion de glycoformes 2N + 1N de l'IFN- γ ; les cellules THP-1 ont été stimulées par 1 ng/ml d'IFN- γ . Le symbole * indique que les valeurs sont significativement différentes (test de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$, $n=4$).

Il existe donc une relation entre la macrohétérogénéité de la glycosylation et l'activité de l'IFN- γ produit par les cellules CHO. Cette étude montre donc une fois de plus que la qualité de l'IFN- γ produit joue un rôle prépondérant sur son activité biologique.

4.5. Conclusions du chapitre VI

Les travaux présentés dans ce chapitre ont permis d'aboutir au maintien d'une glycosylation constante de l'IFN- γ produit au cours de cultures discontinues de cellules CHO effectuées avec le milieu FCS-RPMI. Par ailleurs, nous avons mis en évidence plusieurs familles de protéases présentes au cours des cultures de cellules CHO productrices d'IFN- γ . Il semble essentiel de souligner que ce travail nous a permis de définir des conditions de milieux permettant d'éviter la dégradation partielle de l'IFN- γ au cours du procédé de culture. Enfin, la relation entre le degré de glycosylation macroscopique de l'IFN- γ et son activité biologique *in-vitro* a été établie. Les principales conclusions sont schématisées dans la Figure 90.

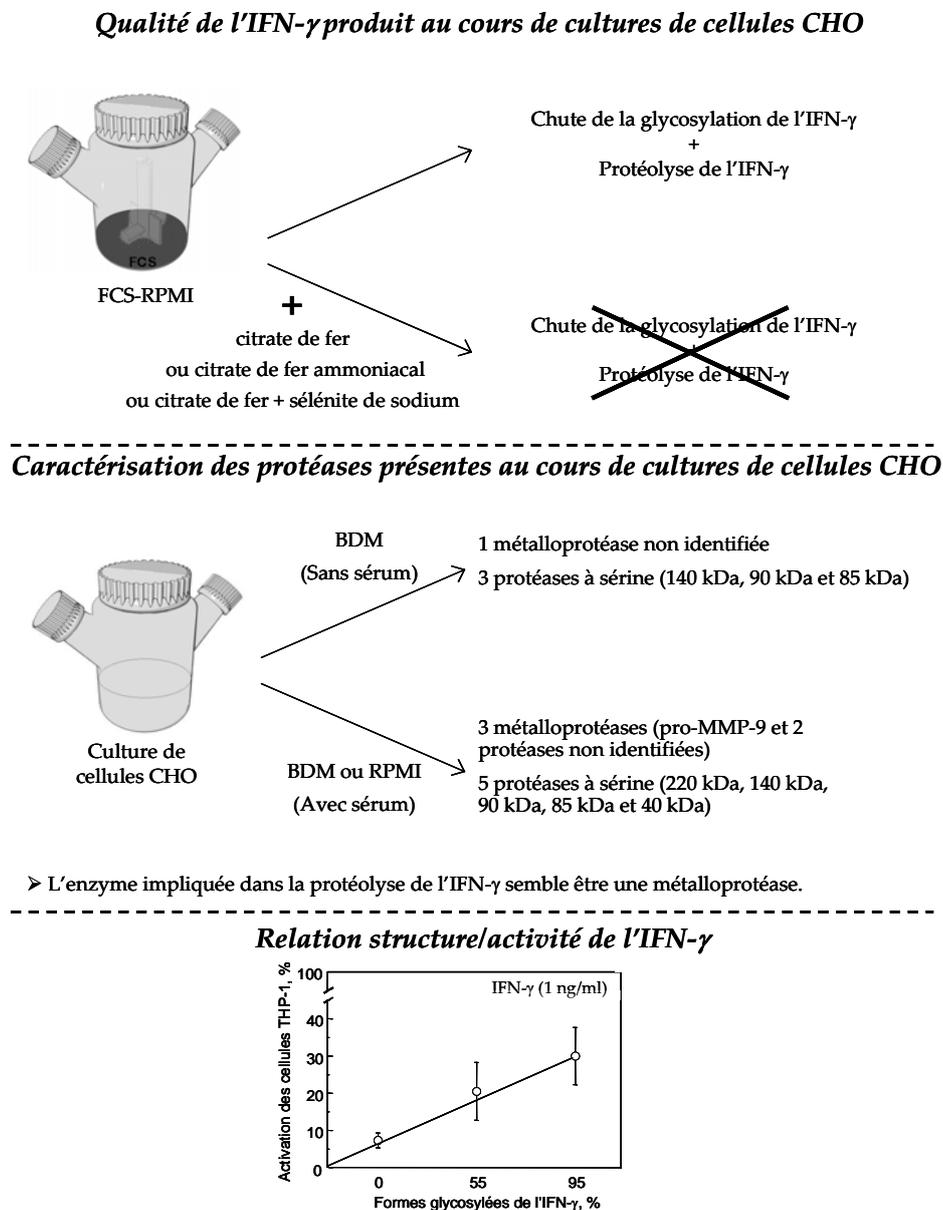


Figure 90 : Représentation schématique des principales conclusions du chapitre VI.

Conclusion générale & Perspectives

CONCLUSION GENERALE

Bien que la glycosylation des protéines ait fait l'objet de nombreux travaux, peu de données sont disponibles quant au suivi, au cours du temps, de l'évolution de la macrohétérogénéité de la glycosylation des glycoprotéines recombinantes. Les mécanismes biochimiques conduisant à l'altération du processus de glycosylation au cours d'un procédé cellulaire restent, à l'heure actuelle, toujours soumis à discussion. Néanmoins, des études ont montré que les conditions de culture peuvent modifier le métabolisme cellulaire, et par conséquent affecter le processus de glycosylation intracellulaire.

Au cours d'une thèse réalisée il y a quelques années au LRGP, Nadine Kochanowski a montré que le milieu de culture avait une influence sur la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ humain recombinant produit par les cellules CHO. Sur ces observations, notre travail a eu pour objet l'amélioration des connaissances relatives aux procédés de cultures en masse de cellules animales afin de permettre une meilleure maîtrise de la qualité de la protéine recombinante produite (IFN- γ). Pour ce faire, la démarche expérimentale adoptée a été de focaliser notre étude sur l'influence de la composition des milieux de culture sur les caractéristiques cinétiques et physiologiques des cellules CHO productrices d'IFN- γ . Nous avons donc travaillé à partir de deux milieux de culture de compositions très différentes (milieux BDM et RPMI), en ciblant notre approche plus particulièrement sur l'effet de 3 composés (citrate de fer, éthanolamine et pluronic F-68) présentes dans le milieu BDM mais absentes dans le milieu RPMI. Dans un premier temps, la croissance et le décès cellulaires ainsi que le métabolisme et la production de l'IFN- γ ont été étudiées en fonction des différentes conditions de culture testées. Dans un second temps, nous avons étudié l'influence de la composition du milieu de culture sur la qualité de l'IFN- γ . A cet égard, l'étude de la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ et l'étude de sa protéolyse ont été réalisées. Enfin, l'influence de la glycosylation de l'IFN- γ sur ses propriétés biologiques a été étudiée en vue d'établir une relation structure-fonction de la protéine d'intérêt.

Dans un premier temps, les principales contributions apportées par nos résultats seront résumées, puis, dans un second temps, nous proposerons des perspectives visant à confirmer, compléter et élargir notre étude.

Influence du milieu de culture sur la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ

L'influence du milieu de culture sur les performances cinétiques et physiologiques des cellules CHO a été clairement établie par la mise en œuvre de cultures discontinues avec les milieux BDM et FCS-RPMI. La capacité de croissance et de production de l'IFN- γ sont augmentées lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu BDM en comparaison avec le milieu FCS-RPMI. De plus, les rendements de production de lactate sont plus faibles lorsque les cellules sont cultivées avec le milieu BDM, ce qui semble traduire un métabolisme énergétique plus efficace comparativement aux cultures réalisées dans le milieu FCS-RPMI.

Outre l'étude physiologique, nous avons confirmé que contrairement à des cultures réalisées avec le milieu FCS-RPMI, la glycosylation de l'IFN- γ demeure constante tout au long du procédé lorsque celui-ci est effectué avec le milieu BDM. La variation de la glycosylation observée au cours de cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu FCS-RPMI et conduisant à de l'IFN- γ sous-glycosylé, intervient exclusivement pendant la phase de croissance. Or, ni le glucose, ni la glutamine ne sont limitants pour la croissance cellulaire au moment où chute la glycosylation de l'IFN- γ , suggérant que ces deux substrats ne le sont pas non plus pour les réactions de glycosylation. Ainsi, le phénomène de sous-glycosylation observé lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu FCS-RPMI se produit en absence de limitation en glucose et en glutamine. Enfin, les métabolites dont les concentrations pourraient être potentiellement toxiques, tels que le lactate et les ions ammonium, ne semblent pas influencer la variation d'occupation des sites de glycosylation de l'IFN- γ .

Ces résultats sont en accord avec les études précédentes faites au LRGP (Kochanowski, 2005), et m'ont permis de valider l'approche expérimentale mise en œuvre pour la suite de ce travail.

Suivi des paramètres macrocinétiques de la cellule CHO (consommation de substrats et formation de produits)

Effet de 3 composés (citrate de fer, éthanolamine et pluronic F-68)

La supplémentation par du citrate de fer, de l'éthanolamine et du pluronic F-68 d'un milieu pauvre RPMI sans sérum a permis d'obtenir une croissance de cellules CHO similaire à celle obtenue lorsque les cellules sont cultivées en présence de sérum. En outre, dans ces

conditions de culture, les vitesses spécifiques de consommation de glucose, de glutamine et de production respectives de lactate et d'ions ammonium sont plus faibles comparativement à des cultures réalisées en présence de sérum, suggérant une utilisation du glucose et de la glutamine plus efficace. La supplémentation par ces 3 composés dans le milieu RPMI sans sérum a également permis d'augmenter la production de l'IFN- γ . Grâce à l'ajout de ces 3 molécules supplémentaires, nous avons donc formulé un milieu RPMI sans sérum, nommé SF-RPMI, qui permet d'obtenir des performances du procédé de production supérieures à celles obtenues en présence de sérum. Une étude plus approfondie de chaque molécule supplémentaire a permis de montrer que seuls le citrate de fer et le PF-68 permettaient d'influencer les caractéristiques physiologiques et cinétiques des cellules CHO. Nous avons montré que la présence de citrate de fer dans la culture cellulaire permettait de retarder de 72 heures l'apparition de cellules apoptotiques et que la capacité de croissance était augmentée, la densité cellulaire maximale étant presque doublée. Quant au PF-68, l'ajout dans le milieu de culture de 0,1% de ce dernier, a permis d'augmenter de 60% le titre final de l'IFN- γ . Ces augmentations constituent une amélioration du procédé d'un point de vue biotechnologique.

Influence du pluronic F-68 (PF-68) au cours de cultures de cellules CHO effectuées sous faible agitation ou sans agitation

L'influence du PF-68 dans un milieu de culture dépourvu de sérum et de protéines (BDM) a été étudiée au cours de cultures de cellules CHO effectuées en fioles d'Erlenmeyer et en flacon de Roux. Cette étude a mis en évidence l'importance de l'utilisation de ce tensio-actif au regard de la croissance et de la lyse cellulaire mais également de la production de l'IFN- γ et de sa qualité. Pour des concentrations de PF-68 comprises entre 0 et 0,1%, un effet dose-dépendant sur la croissance et la lyse cellulaire a été observé au cours de cultures de cellules CHO effectuées en fioles d'Erlenmeyer agitées à 70 rpm. La seule suppression du PF-68 dans le milieu de culture BDM conduit à la production de l'IFN- γ sous glycosylé au début de la culture. Ce phénomène est probablement lié à la phase de latence de la croissance des cellules observée au cours des 30 premières heures de culture lorsque les cultures sont effectuées en absence de PF-68 et en fioles d'Erlenmeyer agitées à 70 rpm.

Importance de l'apport en fer dans les procédés de culture de cellules CHO

L'utilisation de différentes sources de fer, telles que le citrate de fer, le complexe citrate de fer – sélénite de sodium et l'EDTA-fer, dans le milieu de culture FCS-RPMI a permis d'identifier les formes de fer particulièrement biodisponibles pour les cellules CHO. Il apparaît que le citrate de fer et le citrate de fer complexé au sélénium sont des sources de fer biodisponibles pour les cellules CHO, contrairement à l'EDTA-fer. De même, l'amélioration des performances cinétiques et physiologiques des cellules CHO lorsque le citrate de fer est ajouté au milieu RPMI sans sérum montre que la transferrine pourrait être limitante. Quant au sulfate de fer (ferreux) présent comme la transferrine dans le milieu RPMI sans sérum optimisé par Castro *et al.* (1992), il serait moins biodisponible que le citrate de fer et propice à l'oxydation en fer ferrique.

L'apport de citrate de fer ou de citrate de fer complexé au sélénium a non seulement permis de stimuler la croissance mais également d'augmenter les capacités de production de l'IFN- γ par les cellules CHO. En revanche, l'apport d'EDTA-fer se traduit par un effet négatif sur la production de l'IFN- γ , avec une production décelable qu'après 60 heures de culture et un titre final presque deux fois inférieur à celui obtenu lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu FCS-RPMI supplémenté par le citrate de fer.

Suivis des maturations post-traductionnelles de l'IFN- γ

Maintien d'un profil constant de la glycosylation de l'IFN- γ au cours du procédé

Pour avoir une efficacité clinique, il est préférable que les glycoprotéines recombinantes aient une glycosylation « correcte ». Il est donc primordial, notamment pour les industriels, de mettre en place des procédés de culture qui n'engendrent pas de variations de la glycosylation des protéines recombinantes de façon à ce qu'elles aient une qualité constante. Alors que les cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu FCS-RPMI ne permettent pas de maintenir une glycosylation constante de l'IFN- γ tout au long du procédé, la seule addition de citrate de fer (500 μ M) à ce même milieu de culture permet de maintenir le profil de glycosylation constant au cours de la culture cellulaire. La présence de 500 μ M de citrate de fer complexé au sélénium ou de citrate de fer ammoniacal permet également de garantir une qualité constante de l'IFN- γ tout au long du procédé de culture des cellules CHO lorsqu'elles sont cultivées avec du milieu FCS-RPMI.

L'apport d'EDTA-fer se traduit par une modification considérable du profil de glycosylation de l'IFN- γ produit au cours de cultures de cellules CHO. Le pourcentage de la glycoforme 2N est à son niveau le plus bas dès le début de la culture (60-65%), les glycoformes 1N et 0N étant respectivement de 10-15% et 20-25%. Ce profil de glycosylation est maintenu constant tout au long du procédé.

Il semble donc que le fer, uniquement lorsqu'il est apporté sous une forme biodisponible pour la cellule CHO, a un impact physiologique important et permet d'assurer un profil de glycosylation constant de l'IFN- γ au cours du procédé.

Enfin, la supplémentation du milieu BDM par du sérum réduit fortement le pourcentage de glycoformes 2N (50-55% *vs.* 80%) ; ce pourcentage peu élevé demeurant constant au cours de la culture.

Ainsi, au regard de l'ensemble de ces résultats, la composition du milieu de culture influence le profil de glycosylation de l'IFN- γ produit au cours de cultures discontinues de cellules CHO, l'ajout et/ou le retrait de composés pouvant être positif comme négatif, tant sur les rendements de croissance des cellules que de production et de qualité de la protéine d'intérêt.

Maîtrise de la protéolyse de l'IFN- γ

Cette étude a contribué à la caractérisation des conditions de culture permettant de s'affranchir de la protéolyse de l'IFN- γ produit par les cellules CHO. En effet, nous avons pu mettre en évidence que la protéolyse de l'IFN- γ se produit en absence ou en présence de sérum. En revanche, quel que soit le milieu utilisé (RPMI, BDM avec ou sans sérum), l'ajout de citrate de fer permet d'éviter la dégradation de l'IFN- γ . L'utilisation de citrate de fer lors de cultures de cellules CHO productrices d'IFN- γ permet donc de maîtriser et d'éviter la protéolyse de l'IFN- γ .

Contrairement à l'ajout d'EDTA, l'ajout de citrate de fer ammoniacal ou du complexe citrate de fer – sélénium, permet au même titre que le citrate de fer, de prévenir la protéolyse de l'IFN- γ produit par les cellules CHO.

Cette maîtrise de la protéolyse revêt un caractère important puisqu'il est généralement très difficile de parvenir au contrôle de la protéolyse des protéines recombinantes produites en cultures de cellules animales. En effet, la protéolyse, même faible, ne peut être évitée en culture cellulaire, et les seules solutions visant à limiter ce phénomène consistent à réduire la température de la culture, à éviter de récolter les surnageants de fin de culture, à optimiser les conditions de pH, ou encore à améliorer la viabilité cellulaire (Chuan *et al.*, 2006 ; Goochee *et al.*, 1991 ; Gramer and Goochee, 1993). En conséquence, une perte de productivité de la

protéine d'intérêt peut survenir lorsque ces actions sont mises en oeuvre. Le sérum ou la fétuine peuvent être ajoutés aux cultures cellulaires pour inhiber les sialidases ; quant aux protéases, l'ajout d'albumine peut parfois conduire à leur inhibition. Toutefois, en raison des réglementations concernant les produits d'origine animale et leur coût élevé, ces substrats ne sont que très rarement utilisés.

Caractérisation des familles de protéases présentes au cours de la culture cellulaire

La mise en oeuvre de zymogrammes à gélatine et à caséine a permis la caractérisation de plusieurs familles de protéases présentes au cours de cultures discontinues de cellules CHO productrices d'IFN- γ . Lorsque les cellules CHO sont cultivées avec le milieu BDM, la présence d'une activité gélatinase, probablement une métalloprotéase, de poids moléculaire proche de 90 kDa, a été mise en évidence. Cette protéase est sécrétée par les cellules puisqu'aucune activité n'est détectée au début de la culture, puis l'activité augmente au cours de la culture. L'activité gélatinase est inhibée par l'ajout de citrate de fer après séparation électrophorétique. De plus, la présence de 3 activités caséinases, de poids moléculaires proches de 140 kDa, 90 kDa et 85 kDa, a également été mise en évidence pour ces conditions de culture ; ces protéases appartiennent à la famille des protéases à sérine.

Enfin, lorsque les cellules CHO sont cultivées en présence de sérum, en plus d'activités protéasiques supplémentaires, l'ensemble des protéases mises en évidence pour les cultures effectuées avec le milieu BDM sont toujours présentes. Ainsi, deux autres gélatinases ont été mises en évidence, de poids moléculaires proches de 90 kDa et de 65 kDa. En ce qui concerne la protéase dont le poids moléculaire avoisine 90 kDa, son identification a été réalisée par Western-blot, et pourrait correspondre à la pro-MMP-9 (Elliott *et al.*, 2003 ; Mols *et al.*, 2005). Quant à la protéase de poids moléculaire proche de 65 kDa, il pourrait s'agir de la pro-MMP-14 (Mols *et al.*, 2005). Cette protéase est apportée par le sérum puisque son activité est détectée dès le début de la culture et demeure constante tout au long de la culture. Deux caséinases, autres que celles déjà mises en évidence au cours des cultures sans sérum, ont également été détectées, l'une de poids moléculaire de 220 kDa et l'autre de 40 kDa. Ces protéases appartiennent également à la famille des protéases à sérine.

Enfin, les protéases à sérine de poids moléculaires proches de 140 kDa et 40 kDa sont relarguées après 100 h de culture et sont donc probablement le résultat d'une libération par les cellules au moment de leur mort.

Ainsi, parmi l'ensemble des protéases mises en évidence au cours des cultures de cellules CHO effectuées avec le milieu BDM, il est très probable que l'activité responsable de la protéolyse de l'IFN- γ soit la gélatinase de poids moléculaire proche de 90 kDa dont l'inhibition par le citrate de fer a été vérifiée. Soulignons toutefois, que des synergies entre les protéases existent et qu'il est donc possible que cette enzyme soit active qu'en présence d'autres protéases dont les protéases à sérine que nous avons également mises en évidence.

Identification d'une relation entre la qualité de l'IFN- γ et son activité

Nous avons également voulu étudier l'influence de la glycosylation de l'IFN- γ sur ses propriétés fonctionnelles. Le développement d'un test d'activité de l'IFN- γ a été établi à partir d'une lignée leucémique monocyttaire humaine (THP-1). L'activité *in-vitro* de l'IFN- γ produit par les cellules CHO et celle de l'IFN- γ commercialisé par la société R&D Systems produit chez *E. coli*, et par conséquent non glycosylé, ont été étudiées. A concentration identique, l'expression des récepteurs HLA-DR à la surface des cellules THP-1 en présence d'IFN- γ glycosylé produit par les cellules CHO, est supérieure à celle obtenue en présence d'IFN- γ commercial non-glycosylé. Les essais de purification de l'IFN- γ produit par les cellules CHO n'ont malheureusement pas permis d'obtenir de l'IFN- γ purifié en quantité suffisante afin de caractériser une relation structure/activité plus aboutie. Ainsi, contrairement à l'IFN- γ produit par les cellules CHO, l'IFN- γ commercial utilisé dans le test d'activation des cellules THP-1 est purifié et lyophilisé. De façon à pouvoir comparer l'IFN- γ non glycosylé par rapport à l'IFN- γ glycosylé, nous avons fait subir une déglycosylation à l'IFN- γ produit par les cellules CHO. En particulier, ce traitement nous a permis d'obtenir de l'IFN- γ sous-glycosylé. Alors qu'avant traitement les pourcentages de glycoformes 2N, 1N et 0N de l'IFN- γ étaient respectivement de l'ordre de 90%, 7% et 3%, les pourcentages obtenus après traitement sont respectivement de 35%, 20% et 45%. Nos résultats montrent que cet IFN- γ sous-glycosylé conduit à une activation des antigènes HLA-DR réduite de 30% par rapport à celle obtenue en présence d'un IFN- γ glycosylé et non traité. En dépit de l'absence de purification de l'IFN- γ , nous avons pu néanmoins mettre en évidence une relation entre la glycosylation et l'activité de l'IFN- γ .

Ainsi, sur la base d'un test d'expression de l'antigène HLA-DR, nos travaux montrent que l'activité de l'IFN- γ *in-vitro* est améliorée lorsque l'IFN- γ est glycosylé.

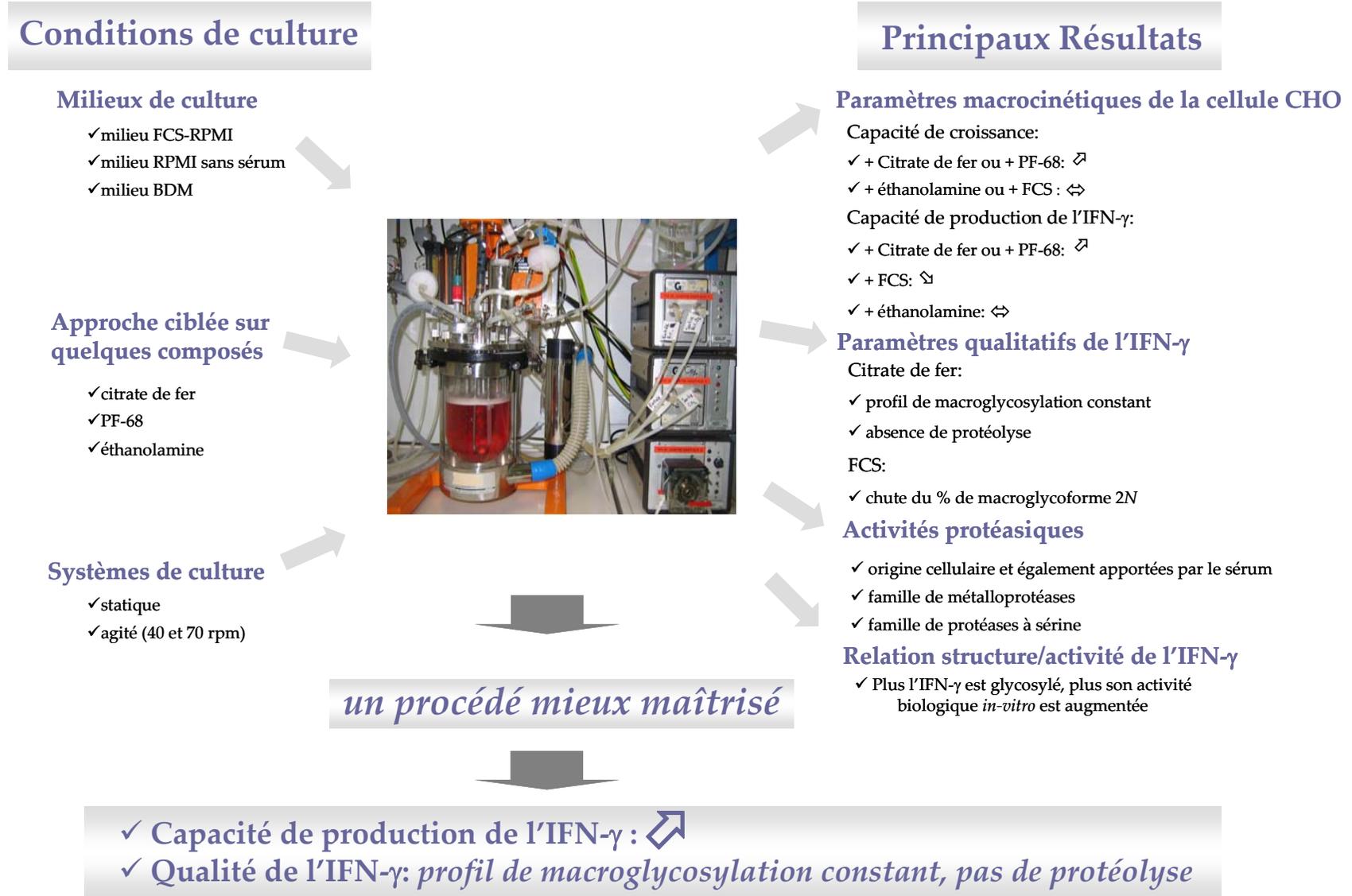


Figure 91 : Représentation schématique des principaux résultats de cette étude.

PERSPECTIVES

L'étude de la composition des milieux de culture, et plus particulièrement des 3 molécules (citrate de fer, éthanolamine et pluronic F-68) présentes dans le milieu BDM mais absentes du milieu RPMI, nous a permis de progresser dans la compréhension et la maîtrise des paramètres pouvant influencer la qualité de l'IFN- γ produit au cours de procédés de culture de cellules de mammifère CHO. En effet, l'influence du citrate de fer et du pluronic F-68 sur les performances cinétiques et physiologiques des cellules CHO, conduisant au maintien d'une qualité constante de l'IFN- γ , tant sur le plan de la glycosylation que de l'intégrité de ce dernier, a clairement été établie au cours de cette étude. Ainsi, notre étude montre comment la qualité d'une protéine thérapeutique recombinante est influencée par la composition du milieu de culture. Toutefois, les résultats obtenus suscitent, à leur tour, de nombreuses interrogations, qui nécessiteraient des études complémentaires.

En premier lieu, il semble nécessaire de souligner que des travaux précédents au LRGP (Nadine Kochanowski, 2005) ont montré qu'une relation semblait exister entre les évolutions des pools intracellulaires de nucléotides, de nucléotides-sucres et de la charge énergétique et l'évolution de la macroglycosylation de l'IFN- γ . Ainsi, il conviendrait de suivre l'évolution des pools intracellulaires de nucléotides, de nucléotides-sucres et de la charge énergétique lorsque les cellules CHO sont supplémentées en fer ou par du sérum et du pluronic F-68. Cette étude permettrait de mieux comprendre les mécanismes intracellulaires impliqués dans le processus de glycosylation de l'IFN- γ .

Il serait également particulièrement intéressant d'étudier la microhétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ dans les différentes conditions de culture que nous avons établies et qui conduisent à des degrés de glycosylation macroscopique très différents. Néanmoins, il serait indispensable de mettre au point les conditions de purification afin d'avoir des quantités suffisantes d'IFN- γ à analyser par spectrométrie de masse ou par électrophorèse capillaire.

Par ailleurs, l'étude détaillée de l'identification des protéases (métalloprotéases et protéases à sérine) mises en évidence dans nos travaux devrait être appréhendée. En effet, il serait très intéressant de parvenir à l'identification formelle de la ou des protéase(s) impliquée(s) dans la protéolyse de l'IFN- γ . De plus, la mise en évidence de l'implication d'une seule protéase

ou d'un ensemble de protéases interagissant entre elles et s'activant mutuellement permettrait de mieux comprendre les mécanismes conduisant à la protéolyse de l'IFN- γ .

Des travaux sur des lignées cellulaires produisant des protéines recombinantes protéolysées autres que l'IFN- γ permettraient d'identifier si le citrate de fer apporté dans les milieux de culture pourrait également prévenir la protéolyse d'autres protéines recombinantes. De même, l'influence de la supplémentation par du citrate de fer pourrait être testée sur d'autres protéines recombinantes glycosylées.

L'étude de l'influence du citrate de fer sur la réduction de la mort des cellules CHO par apoptose mériterait d'être poursuivie et approfondie. Il conviendrait donc d'étudier si la présence de citrate de fer dans la culture de cellules CHO permet d'induire ou augmenter la quantité des facteurs anti-apoptotiques Bcl2 et Bcl-xL, de diminuer les facteurs pro-apoptotiques tels que Bax et Bak, le cytochrome c ou encore la libération de caspases. L'étude des récepteurs appartenant à la superfamille des TNF serait également intéressante. Ces différentes analyses pourraient alors apporter d'autres éléments de réponse quant aux mécanismes impliqués dans le processus de mort cellulaire par apoptose et les effets positifs du citrate de fer.

Une approche protéomique (gel à deux dimensions, puce à protéines) ou encore l'utilisation de technologies récentes telles que la spectrométrie de masse à désorption-ionisation laser assistée par matrice (SELDI-TOF MS) permettraient l'identification de marqueurs biologiques (Woolley and Al-Rubeai, 2009). En effet, ces marqueurs biologiques s'exprimant à la suite d'un stress apparaissent au cours de la culture plus précocement que les marqueurs généralement suivis lors des procédés de culture cellulaire tels que le pH, une limitation en glucose et glutamine, une accumulation en lactate et ions ammonium, une perte d'intégrité membranaire ou encore la mesure de l'apoptose. Ainsi, l'identification de certains de ces marqueurs pourrait permettre d'améliorer le contrôle et la maîtrise des procédés de culture de cellules de mammifère. La mise en œuvre d'une corrélation potentielle entre l'apparition de ces marqueurs biologiques et la composition du milieu de culture (présence de citrate de fer, de pluronic F-68...) pourrait s'avérer tout à fait intéressante.

Enfin, l'étude de l'influence de la relation entre le degré de glycosylation de l'IFN- γ et l'activité biologique mériterait d'être approfondie. En confirmation de ce travail, l'étude de l'activité de l'IFN- γ produit par les cellules CHO devrait être réalisée à partir d'IFN- γ purifié. Nous avons montré que la glycosylation de l'IFN- γ permettait d'augmenter son activité *in-vitro* mais il pourrait être d'autant plus intéressant d'étudier son efficacité qui est la

résultante de l'activité et du temps de demi-vie de la protéine. Il a déjà été rapporté que l'IFN- γ non glycosylé est éliminé plus rapidement de la circulation sanguine que l'IFN- γ naturel (Sareneva *et al.*, 1993). Ainsi, la purification de l'IFN- γ produit par les cellules CHO permettrait de tester l'IFN- γ glycosylé sur animaux (souris Balb C) afin d'étudier son efficacité à stimuler le système immunitaire par rapport à de l'IFN- γ non glycosylé. En particulier, suite à la stimulation par l'IFN- γ , la libération de cytokines spécifiques comme l'IL-12 pourrait être mesurée dans le sérum des souris.

Annexes

Tableau 19 : Composition finale des milieux de culture BDM, RPMI et du sérum de veau fœtal (SVF). Le fournisseur étant dans l'impossibilité de fournir la composition du lot de sérum que nous avons utilisé, celle d'un lot de SVF commercialisé par Hyclone est présentée.

	Milieu de base (mg/L)		SVF (mg/L)
	BDM	RPMI	
Sels inorganiques			
CaCl ₂ anh.	18,2		13,4
CaCl ₂ · 2H ₂ O	119,5		
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O		100	
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,001		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,379		15,3
KCl	288,2	400	
KNO ₃	0,035		10,4 meq/l
MgCl ₂ , 6H ₂ O	55,5		
MgSO ₄		100	28,7
MgSO ₄ · 7H ₂ O	109,1		
NaCl	6118,2	6000	
NaHCO ₃	1909,1	2000	
Na ₂ HPO ₄ anh.	125,2	600	
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O			134 meq/l
Na ₂ SeO ₃ · 5H ₂ O	0,008		
ZnSO ₄	0,391		
Autres composés			
Acétate de sodium (anh.)	4,55		
Acide Linoléique	0,038		
Acide thiotactique DL-68	0,091		
Acide L-amino-n-butyrique	0,5		
D-glucose	2955 ,45	2000	700
D-glucuronolactone	0,164		
Glucuronate de sodium	0,164		
HEPES	2708,18		
Putrescine 2 HCl	0,073		
Pyruvate de sodium	100		
Rouge de phénol	9,182	5	
Tween 80®	1,136		
Cofacteurs et précurseurs nucléotidiques			
Coenzyme A	0,227		
Diphosphopyridine nucléotide	0,636		
Flavine Adénine Dinucléotide	0,091		
Triphosphopyridine nucléotide	0,091		
Coccarboxylase	0,091		
Glutathion (réduit)	0,164	1	
Déoxyadénosine	0,909		
Déoxyguanosine	0,909		
Déoxycytidine· HCl	0,909		
Hypoxantine	1,818		
5-methyl déoxycytosine	0,009		
Thymidine	1,227		
Uridine triphosphate, sodium	0,091		

	Milieu de base (mg/L)		SVF (mg/L)
	BDM	RPMI	
Acides aminés			
L-Alanine	18,32		
L-Arginine	34,2	200	
L-Arginine.HCl	95,91		
L-Asparagine	18,19	50	
Acide-L-Aspartique	20,58	20	
L-Cystéine	11,36		
L-Cystine	32,77	50	
D-Glucosamine.HCl	0,35		
Acide L-Glutamique	41,53	20	
L-Glutamine	135,7	300	
Glycine	18,27	10	
L-Histidine.HCl.H ₂ O	29,55	15	
L-Hydroxy-proline		20	
L-Isoleucine	51,14	50	
L-Leucine	55,49	50	
L-Lysine.HCl	86,45	40	
L-Méthionine	16,08	15	
L-Ornithine.HCl	0,85		
L-Phénylalanine	33,77	15	
L-Proline	34,42	20	
L-Sérine	24,84	30	
L-Taurine	0,38		
L-Théronine	50,31	20	
L-Tryptophane	9,79	5	
L-Tyrosine	42,13	20	
L-Valine	50,32	20	
Vitamines			
Acide ascorbique (Vitamine C)	4,54		inf 0,5
α-tocopherol phosphate	0,002		
D-biotine (Vitamine H)	0,012	0,2	20 x 10 ⁻⁶
Calciférol (Vitamine D2)	0,023		39 x 10 ⁻⁶
Chlorure de choline	8,29	3	
Cobalamine (Vitamine B12)	1,55	0,005	317 x 10 ⁻⁶
Acide folique	2,41	1	32
I-Inositol	11,47	35	
Menadione (Vitamine K)	0,023		
Nicotinamide		1	
Niacine	0,006		0,001
Niacinamide	0,022		
Panthothénate de Calcium D	0,025	0,3	
Acide para-Aminobenzoïque	0,011	1	
Pyridoxal-HCl	1,82	1	
Pyridoxine-HCl	0,033		0,037
Riboflavine	0,2	0,2	0,131
Thiamine.HCl	1,96	1	0,052
Vitamine A	0,023		
β-carotène (Vitamine E)/Rétinol (Vitamine E)			0,11/inf 0,1

	Milieu de base (mg/L)		SVF (mg/L)
	BDM	RPMI	
Suppléments BDM			
Pluronic F-68	1000		
Citrate de fer	122,4		
Ethanolamine	45,81		
Suppléments RPMI (BITS)			
Alanine		8,9	
Albumine bovine*		5000	29000
CuSO ₄		2,49 x 10 ⁻³	0,02
Insuline bovine		5	6,5 µU/ml
Putrescine		0,161	
Pyruvate de sodium		110	
FeSO ₄ · 7H ₂ O		0,834	
Na ₂ SeO ₃ · 5H ₂ O		1,72 x 10 ⁻³	
Transferrine		5	
ZnSO ₄		0,862	
Autres composés présents dans le SVF			
Acide urique			16
Bilirubine			20
Chlorure			99 meq/dl
Créatine			23
γ-Globulines			inf 0,1%tp
Hémoglobine*			16
IgG			0,1
Lactate deshydrogénase			392 UI/L
Phosphate inorganique			110
Phosphatase alcaline			206 UI/L
Progestérone			0,0013
PTH			56 x 10 ⁻⁶
Sélénium			0,013
Transaminase SGOT			64 UI/L
Transaminase SGPT			4 UI/L
Cholestérol			380
HDL			180
LDL			70
Phospholipides			450
Triglycérides			640

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adams, M.L., Lavasanifar, A. and Kwon, G.S. (2003) Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *J Pharm Sci.* 92:1343-1355.
- Ahmed, F., Alexandridis, P. and Neelamegham, S. (2001) Synthesis and application of fluorescein-labeled pluronic block copolymers to the study of polymer-surface interactions. *Langmuir.* 17:537-546.
- Al-Rubeai, M. and Singh, R.P. (1998) Apoptosis in cell culture. *Curr Opin Biotechnol.* 9:152-156.
- Al-Rubeai, M., Singh, R.P., Goldman, M.H. and Emery, A.N. (1995) Death mechanisms of animal cells in conditions of intensive agitation. *Biotechnol Bioeng.* 45:463-472.
- Altamirano, C., Illanes, A., Becerra, S., Cairó, J.J. and Gòdia, F. (2006) Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *J Biotechnol.* 125:547-556.
- Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I.B.H. and Ma rz, L. (1999) Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconjugate J.* 16:109-123.
- Amiot, J., Germain, L., Turgeon, S., Lemay, M., Ory-Salam, C. and Auger, F.A. (2004) Peptides from milk protein hydrolysates to improve the growth of human keratinocytes in culture. *Int Dairy J.* 14:619-626.
- Andrews, N.C. (1999) Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med.* 341:1986-1995
- Aparicio, T. and Lehy, T. (1999) Métalloprotéases matricielles en pathologie digestive. *Gastroenterol Clin Biol.* 23:330-341.
- Arakawa, T., Hsu, Y.-R. and Chang, D. (1986b) Structure and activity of glycosylated human interferon- γ . *J Interferon Res.* 6:687-695.
- Arakawa, T., Hsu, Y.-R., Parker, C.G. and Lai, P.-H. (1986a) Role of polycationic C-terminal portion in the structure and activity of recombinant human interferon- γ . *J Biol Chem.* 261:8534-8539.
- Arakawa, T., Narachi, M.A., Hsu, Y.-R., Everett, R.R., Lai, P.-H. and Fish, E.N. (1989) The effect of C-terminal processing on the activity of human interferon- γ . *Drug Design Discov.* 4:217-225.
- Arden, N. and Betenbaugh, M.J. (2004) Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. *Trends Biotechnol.* 22:174-180.
- Arden, N. and Betenbaugh, M.J. (2006) Regulating apoptosis in mammalian cell cultures. *Cytotechnology.* 50:77-92.
- Arenzana-Seisdedos, F., Mogensen, S.C., Vuillier, F., Fiers, W. and Virelizier, J.L. (1988) Autocrine secretion of tumor necrosis factor under the influence of interferon- γ amplifies HLA-DR gene induction in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 85:6087-6091.
- Ashford, D.A., Alafi, C.D., Gamble, V.M., Mackay, D.J., Rademacher, T.W., Williams, P.J., Dwek, R.A., Barclay, A.N., Davis, S.J., *et al.* (1993) Site-specific glycosylation of recombinant rat and

- human soluble CD4 variants expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 268:3260-3267.
- Ashwell, G. and Morell, A.** (1974) The dual role of sialic acid in the hepatic recognition and catabolism of serum glycoproteins. *Biochem Soc Symp.* 40:117-124.
- Atkinson, D.E. and Walton, G.M.** (1967) Adenosine Triphosphate Conservation in Metabolic Regulation. *Biol Chem.* 242:3239-3241.
- Baker, K.N., Rendall, M.H., Hills, A.E., Hoare, M., Freedman, R.B. and James, D.C.** (2001) Metabolic control of recombinant protein N-glycan processing in NS0 and CHO cells. *Biotechnol Bioeng.* 73:188-202.
- Baker, R.D., Baker, S.S. and Rao, R.** (1998) Selenium deficiency in tissue culture: Implications for oxidative metabolism. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 27:387-392.
- Baneyx, F. and Mujacic, M.** (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol.* 22:1399-1407.
- Barbouche, N.** (2008) Réponse biologique de cellules animales à des contraintes hydrodynamiques: simulation numérique, expérimentation et modélisation en bioréacteurs de laboratoire. PhD Thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL), Nancy.
- Barnard, G.C., Henderson, G.E., Srinivasan, S. and Gerngross, T.U.** (2004) High level recombinant protein expression in *Ralstonia eutropha* using T7 RNA polymerase based amplification. *Protein Expression Purif.* 38:264-271.
- Barnes, D. and Sato, G.** (1980) Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal Biochem.* 102:255-270.
- Barrett, A.J.** (1994) Classification of peptidases. *Methods Enzymol.* 244:1-15.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D. and Woessner, J.F.** (1998) Handbook of proteolytic enzymes. San Diego, Academic press.
- Bashir, N., Kuhen, K. and Taub, M.** (1992) Phospholipids regulate growth and function of MDCK cells in hormonally defined serum free medium. *In Vitro Cell Dev Biol.* 28A:663-668.
- Batrakova, E.V., Dorodnych, T.Y., Klinskii, E.Y., Kliushnenkova, E.N., Shemchukova, O.B., Goncharova, O.N., Arjakov, S.A., Alakhov, V.Y. and Kabanov, A.V.** (1996) Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: *in vivo* evaluation of anti-cancer activity. *Br J Cancer.* 74:1545-1552.
- Batrakova, E.V. and Kabanov, A.V.** (2008) Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J Controlled Release.* 130:98-106.
- Batrakova, E.V., Li, S., Alakhov, V.Y., Miller, D.W. and Kabanov, A.V.** (2003) Optimal structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 304:845-854.

- Bause, E.** (1983) Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem J.* 209:331-336.
- Beck, A., Cochet, O. and Wurch, T.** (2010) Glycofi's technology to control the glycosylation of recombinant therapeutic proteins. *Expert Opin Drug Discov.* 5:95-111.
- Bentley, P.K., Gates, R.M.C., Lowe, K.C., de Pomerai, D.I. and Walker, J.A.L.** (1989) *In vitro* cellular responses to a non-ionic surfactant, Pluronic F-68. *Biotechnol Lett.* 11:111-114.
- Bertino, J.R. and Hillcoat, B.L.** (1968) Regulation of dihydrofolate reductase and other folate-requiring enzymes. *Adv Enzyme Regul.* 6:335-349.
- Billiau, A. and Vandebroek, K.** (2001) IFN γ San Diego, Calif., J. J. Oppenheim.
- Biteau, F.** (2009) Production de protéines recombinantes par des plantes carnivores génétiquement transformées : application à *Drosera rotundifolia* et transfert de la technologie à *Nepenthes alata*. PhD Thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL), Nancy.
- Bocci, V., Pacini, A., Pessina, G.P., Paulesu, L., Muscettola, M. and Lunghetti, G.** (1985) Catabolic sites of human interferon-gamma. *J Gen Virol.* 66:887-891.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. and Howard, J.** (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol Invest.* 15:749-795.
- Bonifacino, J.S. and Weissman, A.M.** (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 14:19-57.
- Borys, M.C., Linzer, D.I. and Papoutsakis, E.T.** (1993) Culture pH affects expression rates and glycosylation of recombinant mouse placental lactogen proteins by Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Nat Biotechnol.* 11:720-724.
- Bour, J.M., Maugras, M., Capiaumont, J., Dousset, B., Straczek, J., Gelot, M.A. and Nabet, P.** (1988) Marqueurs biochimiques de la prolifération et de la mort des hybridomes en culture. *BioScience.* 7:35-40.
- Bragonzi, A., Distefano, G., Buckberry, L.D., Acerbis, G., Foglieni, C., Lamotte, D., Campi, G., Marc, A., Soria, M.R., et al.** (2000) A new Chinese hamster ovary cell line expressing α 2,6-sialyltransferase used as universal host for the production of human-like sialylated recombinant glycoproteins. *Biochim Biophys Acta, Gen Subj.* 1474:273-282.
- Brew, K., Dinakarandian, D. and Nagase, H.** (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477:267-283.
- Brooks, S.A.** (2006) Protein glycosylation in diverse cell systems: implications for modification and analysis of recombinant proteins. *Expert Review of Proteomics.* 3:345-359.
- Brot, N. and Weissbach, H.** (1991) Biochemistry of methionine sulfoxide residues in proteins. *Biofactors.* 3:91-96.
- Bruillard, M., Lorphelin, D., Collignon, O., Lorphelin, W., Thouvenot, B., Gothie, E., Jacquenet, S., Ogier, V., Roitel, O., et al.** (2007) Nonrandom variations in human cancer ESTs indicate that mRNA heterogeneity increases during carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:7522-7527.

- Bryant, J.C.** (1966) Mammalian cells in chemically defined media in suspension cultures. *Ann N Y Acad Sci.* 139:143-161.
- Buko, A.M., Kentzer, E.J., Petros, A., Menon, G., Zuiderweg, E.R. and Sarin, V.K.** (1991) Characterization of a posttranslational fucosylation in the growth factor domain of urinary plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 88:3992-3996.
- Bureau, J.F., Bihl, F., Brahic, M. and Le Paslier, D.** (1995) The gene coding for interferon-gamma is linked to the D12S335 and D12S313 microsatellites and to the MDM2 gene. *Genomics.* 28:109-112.
- Burgener, A. and Butler, M.** (2006) Medium Development. *Cell culture technology for pharmaceutical and cell based therapies.* Ozturk SS and Hu W-S. New-York, Taylor & Francis.
- Butler, M.** (2006) Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by Mammalian cell systems. *Cytotechnology.* 50:57-76.
- Butler, M. and Huzel, N.** (1995) The effect of fatty acids on hybridoma cell growth and antibody productivity in serum-free cultures. *J Biotechnol.* 39:165-73.
- Cacan, R. and Verbert, A.** (1999) Free and N-linked oligomannosides as markers of the quality control of newly synthesized glycoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 258:1-5.
- Castro, P.M.L., Hayter, P.M., Ison, A.P. and Bull, A.T.** (1992) Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon- γ production by CHO cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 38:84-90.
- Castro, P.M.L., Ison, A.P., Hayter, P.M. and Bull, A.T.** (1995) The macroheterogeneity of recombinant human interferon- γ produced by Chinese-hamster ovary cells is affected by the protein and lipid content of the culture medium. *Biotechnol Appl Biochem.* 21:87-100.
- Cerba, L.P.** (2007) Guide des analyses spécialisées.
- Cereghino, G.P.L., Cereghino, J.L., Ilgen, C. and Cregg, J.M.** (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opin Biotech.* 13:329-332.
- Cereghino, J.L. and Cregg, J.M.** (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* 24:45-66.
- Chaderjian, W., Chin, E., Harris, R. and Etcheverry, T.** (2005) Effect of copper sulfate on performance of a serum-free CHO cell culture process and the level of free thiol in the recombinant antibody expressed. *Biotechnol Prog.* 21:550-553.
- Chattopadhyay, D., Rathman, J.F. and Chalmers, J.J.** (1995) The protective effect of specific medium additives with respect to bubble rupture. *Biotechnol Bioeng.* 45:473-480.
- Chen, Z., Ke, Y. and Chen, Y.** (1993) A serum-free medium for hybridoma cell culture. *Cytotechnology.* 11:169-174.
- Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S.C. and Walz, T.** (2004) Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell.* 116:565-576.

- Chenu, S., Gregoire, A., Malykh, Y., Visvikis, A., Monaco, L., Shaw, L., Schauer, R., Marc, A. and Goergen, J.L.** (2003) Reduction of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase activity in engineered Chinese hamster ovary cells using an antisense-RNA strategy. *Biochim Biophys Acta*. 1622:133-144.
- Chiba, Y. and Jigami, Y.** (2007) Production of humanized glycoproteins in bacteria and yeasts. *Curr Opin Chem Biol*. 11:670-676.
- Chirat, F.** (2008) Etude de la structure primaire des protéines et des modifications co- et post traductionnelles: Application à l'étude de la N- et la O-glycosylation des glycoprotéines de patients atteints de mucopolysaccharidoses de type I. HDR, Université des Sciences et Technologies de Lille I, Lille.
- Chisti, Y.** (2000) Animal-cell damage in sparged bioreactors. *Trends Biotechnol*. 18:420-432.
- Chotigeat, W., Watanapokasin, Y., Mahler, S. and Gray, P.P.** (1994) Role of environmental conditions on the expression levels, glycoform pattern and levels of sialyltransferase for hFSH produced by recombinant CHO cells. *Cytotechnology*. 15:217-221.
- Chou, C.P.** (2007) Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 76:521-532.
- Chuan, K.H., Lim, S.F., Martin, L., Yun, C.Y., Loh, S.O., Lasne, F. and Song, Z.** (2006) Caspase activation, sialidase release and changes in sialylation pattern of recombinant human erythropoietin produced by CHO cells in batch and fed-batch cultures. *Cytotechnology*. 51:67-79.
- Cromwell, M.E.M., Hilario, E. and Jacobson, F.** (2006) Protein Aggregation and Bioprocessing. *AAPS J*. 8:E572-E579.
- Crouse, G.F., McEwan, R.N. and Pearson, M.L.** (1983) Expression and amplification of engineered mouse dihydrofolate reductase minigenes. *Mol Cell Biol*. 3:257-266.
- Crowell, C.K., Grampp, G.E., Rogers, G.N., Miller, J. and Scheinman, R.I.** (2007) Amino acid and manganese supplementation modulates the glycosylation state of erythropoietin in a CHO culture system. *Biotechnol Bioeng*. 96:538-549.
- Curling, E.M., Hayter, P.M., Baines, A.J., Bull, A.T., Gull, K., Strange, P.G. and Jenkins, N.** (1990) Recombinant human interferon- γ . Differences in glycosylation and proteolytic processing lead to heterogeneity in batch culture. *Biochem J*. 272:333-337.
- Cuzner, M.L. and Opdenakker, G.** (1999) Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. *J Neuroimmunol*. 94:1-14.
- Dale, C., Allen, A. and Fogarty, S.** (1999) *Pichia pastoris*: a eukaryotic system for the large-scale production of biopharmaceuticals. *BioPharm Int*. 12:36-42.
- Daniel, P.F., Winchester, B. and Warren, C.D.** (1994) Mammalian alpha-mannosidases - multiple forms but a common purpose? *Glycobiology*. 4:551-566.
- David, A.** (2007) Protéomique fonctionnelle dédiée aux Métalloprotéases Matricelles (MMPs) : développement d'une méthode extrêmement sensible permettant la détection des formes

- actives des MMPs dans des protéomes complexes. PhD Thesis, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris (75), Paris.
- Deeds, Z.** (2009) Innovative media products for the 21st century biopharmaceutical industry. 21st meeting of the European Society for Animal Cell Technology, Dublin.
- Demain, A.L. and Vaishnav, P.** (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv.* 27:297-306.
- Dempsey, J., Ruddock, S., Osborne, M., Ridley, A., Sturt, S. and Field, R.** (2003) Improved fermentation processes for NS0 cell lines expressing human antibodies and glutamine synthetase. *Biotechnol Prog.* 19:175-178.
- Dempski, R.E., Jr. and Imperiali, B.** (2002) Oligosaccharyl transferase: gatekeeper to the secretory pathway. *Curr Opin Chem Biol.* 6:844-850.
- Devinoy, E., Thepot, D., Stinnakre, M.G., Fontaine, M.L., Grabowski, H., Puissant, C., Pavirani, A. and Houdebine, L.M.** (1994) High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: The upstream region of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland. *Transgenic Res.* 3:79-89.
- Devos, R., Cheroutre, H., Taya, Y., Degrave, W., Van Heuverswyn, H. and Fiers, W.** (1982) Molecular cloning of human immune interferon cDNA and its expression in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res.* 10:2487-2501.
- Devos, R., Opsomer, C., Scahill, S.J., Van der Heyden, J. and Fiers, W.** (1984) Purification of recombinant glycosylated human gamma interferon expressed in transformed Chinese hamster ovary cells. *J Interferon Res.* 4:461-468.
- Dey, D., Boulton-Stone, J.M., Emery, A.N. and Blake, J.R.** (1997) Experimental comparisons with a numerical model of surfactant effects on the burst of a single bubble. *Chem Eng Sci.* 52:2769-2783.
- deZengotita, V.M., Abston, L.R., Schmelzer, A.E., Shaw, S. and Miller, W.M.** (2002) Selected amino acids protect hybridoma and CHO cells from elevated carbon dioxide and osmolality. *Biotechnol Bioeng.* 78:741-752.
- Dijkmans, R., Heremans, H. and Billiau, A.** (1987) Heterogeneity of Chinese hamster ovary cell-produced recombinant murine interferon-gamma. *J Biol Chem.* 262:2528-2535.
- Dingermann, T.** (2008) Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. *Biotechnol J.* 3:90-97.
- Dobeli, H., Gentz, R., Jucker, W., Garotta, G., Hartmann, D.W. and Hochuli, E.** (1988) Role of the carboxyl-terminal sequence on the biological activity of human immune interferon (IFN- γ). *J Biotechnol.* 7:199-216.
- Donaldson, M.S. and Shuler, M.L.** (1998) Low-cost serum-free medium for the BTI-Tn5B1-4 insect cell line. *Biotechnol Prog.* 14:573-579.
- Duval, D., Demangel, C., Miossec, S. and Geahel, I.** (1992) Role of metabolic waste products in the control of cell proliferation and antibody production by mouse hybridoma cells. *Hybridoma.* 11:311-322.

- Dwek, R.A.** (1998) Biological importance of glycosylation. *Dev Biol Stand.* 96:43-47.
- Dykes, G.A. and Dworaczek, M.** (2002) Influence of interactions between temperature, ferric ammonium citrate and glycine betaine on the growth of *Listeria monocytogenes* in a defined medium. *Lett Appl Microbiol.* 35:538-542.
- Ealick, S.E., Cook, W.J., Vijay-Kumar, S., Carson, M., Nagabhushan, T.L., Trotta, P.P. and Bugg, C.E.** (1991) Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science.* 252:698-702.
- Edmunds, T., Van Patten, S.M., Pollock, J., Hanson, E., Bernasconi, R., Higgins, E., Manavalan, P., Ziomek, C., Meade, H., et al.** (1998) Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin. *Blood.* 91:4561-4571.
- Eibl, R., Werner, S. and Eibl, D.** (2009) Disposable bioreactors for plant liquid cultures at litre-scale. *Eng Life Sci.* 9:156-164.
- Elliott, P., Hohmann, A. and Spanos, J.** (2003) Protease expression in the supernatant of Chinese Hamster Ovary cells grown in serum-free culture. *Biotechnol Lett.* 25:1949-1952.
- Elliott, S., Lorenzini, T., Asher, S., Aoki, K., Brankow, D., Buck, L., Busse, L., Chang, D., Fuller, J., et al.** (2003) Enhancement of therapeutic protein *in vivo* activities through glycoengineering. *Nat Biotechnol.* 21:414-421.
- EMA** (2002) Note for guidance on minimizing the risk of transmitting animal spongiform encephalopathies via human and veterinary medicinal products. EMA/410/01.
- EMA** (2003) Note for guidance on minimizing the risk of transmitting animal spongiform encephalopathies via human and veterinary medicinal products. EMA/410/01-Rev2.
- Emerson, T.E.** (1989) Unique features of albumin: a brief review. *Crit Care Med.* 17:690-694.
- Engstrom, W. and Zetterberg, A.** (1984) The relationship between purines, pyrimidines, nucleosides, and glutamine for fibroblast cell proliferation. *J Cell Physiol.* 120:233-241.
- Eto, N., Yamada, K., Shito, T., Shirahata, S. and Murakami, H.** (1991) Development of a protein-free medium with ferric citrate substituting transferrin for the cultivation of mouse-mouse hybridomas. *Agric Biol Chem.* 55:863-865.
- Farges-Haddani, B.** (2005) Les peptides de colza: une alternative aux protéines animales dans les procédés de culture de cellules de mammifères? PhD Thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL), Nancy.
- Farges, B., Chenu, S., Marc, A. and Goergen, J.L.** (2008) Kinetics of IFN- γ producing CHO cells and other industrially relevant cell lines in rapeseed-supplemented batch cultures. *Process Biochem.* 43:945-953.
- Farrar, M.A. and Schreiber, R.D.** (1993) The Molecular Cell Biology of Interferon-gamma and its Receptor. *Annu Rev Immunol.* 11:571-611.
- FDA** (2003) Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products, "Poloxamer". .

- Fenge, C. and Lüllau, E.** (2006) Cell culture bioreactors. *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell Based Therapies*. Ozturk SS and Hu W-S. New-York, Taylor & Francis.
- Fennie, E.H., Lie, Y.S., Low, M.A., Gribling, P. and Anderson, K.P.** (1988) Reduced mortality in murine cytomegalovirus infected mice following prophylactic murine interferon-gamma treatment. *Antiviral Res.* 10:27-39.
- Ferrari, J., Gunson, J., Lofgren, J., Krummen, L. and Warner, T.G.** (1998) Chinese hamster ovary cells with constitutively expressed sialidase antisense RNA produce recombinant DNase in batch culture with increased sialic acid. *Biotechnol Bioeng.* 60:589-595.
- Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espin, J., Corchero, J.L., Vazquez, E. and Villaverde, A.** (2009) Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb Cell Fact.* 8:17.
- Fidler, I.J., Fogler, W.E., Kleinerman, E.S. and Saiki, I.** (1985) Abrogation of species specificity for activation of tumoricidal properties in macrophages by recombinant mouse or human interferon- γ encapsulated in liposomes. *J Immunol.* 135.
- Field, R.P.** (2003) Animal cell culture. *Lonza Group*. #6593140 (US).
- Firestone, M.A. and Seifert, S.** (2005) Interaction of nonionic PEO-PPO diblock copolymers with lipid bilayers. *Biomacromolecules.* 6:2678-2687.
- Fischer, B., Summer, I. and Goodenough, P.** (1993) Isolation, renaturation and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnol Bioeng.* 41:3-13.
- Fischer, R. and Emans, N.** (2000) Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res.* 9:279-299.
- Fleming, M.D., Romano, M.A., Maureen, A.S.U., Garrick, L.M., Garrick, M.D. and Andrews, N.C.** (1998) Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: Evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:1148-1153.
- Fountoulakis, M. and Gentz, R.** (1992b) Effect of glycosylation on properties of soluble interferon gamma receptors produced in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Nat Biotechnol.* 10:1143-1147.
- Fountoulakis, M., Zulauf, M., Lustig, A. and Garotta, G.** (1992a) Stoichiometry of interaction between interferon- γ and its receptor. *Eur J Biochem.* 208:781-797.
- Franek, F. and Dolnikova, J.** (1991) Hybridoma growth and monoclonal antibody production in iron-rich protein-free medium: effect of nutrient concentration. *Cytotechnology.* 7:33-38.
- Franek, F., Hohenwarter, O. and Katinger, H.** (2000) Plant protein hydrolysates: preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures. *Biotechnol Prog.* 16:688-692.
- Fukuda, A., Osawa, T., Oda, H., Tanaka, T., Toyokuni, S. and Uchida, K.** (1996) Oxydative stress response in iron-induced acute nephrotoxicity: enhanced expression of heat shock protein 90. *Biochem Biophys Res Commun.* 219:76-81.

- Galati, R., Verdina, A., Falasca, G. and Chersi, A.** (2003) Increased Resistance of Peptides to Serum Proteases by Modification of their Amino Groups. *Z. Naturforsch.* 58c:558-561.
- Galbraith, D.N.** (2002) Transmissible spongiform encephalopathies and tissue cell culture. *Cytotechnology.* 39:117-124.
- Gautier-Luneau, I., Bertet, P., Jeunet, A., Serratrice, G. and Pierre, J.L.** (2007) Iron-citrate complexes and free radicals generation: is citric acid an innocent additive in foods and drinks? *Biometals.* 20:793-796.
- Gavel, Y. and von Heijne, G.** (1990) Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.* 3:433-442.
- Gawlitzeck, M., Conradt, H.S. and Wagner, R.** (1995b) Effect of different cell culture conditions on the polypeptide integrity and N-glycosylation of a recombinant model glycoprotein. *Biotechnol Bioeng.* 46:536-544.
- Gawlitzeck, M., Estacio, M., Fürch, T. and Kiss, R.** (2009) Identification of cell culture conditions to control N-glycosylation site-occupancy of recombinant glycoproteins expressed in CHO cells. *Biotechnol Bioeng.* 103:1164-1175.
- Gawlitzeck, M., Valley, U., Nimtz, M., Wagner, R. and Conradt, H.S.** (1995a) Characterization of changes in the glycosylation pattern of recombinant proteins from BHK-21 cells due to different culture conditions. *J Biotechnol.* 42:117-131.
- Geauegy, V., Pascal, F., Engasser, J.M. and Marc, A.** (1990) Influence of the culture oxygenation on the release of LDH by hybridoma cells. *Biotechnol Tech.* 4:257-262.
- Geisow, M.J.** (1992) Glycoprotein glycans - Roles and controls. *Trends Biotechnol.* 10:333-335.
- Gellison, G., Janowicz, Z.A., Weydemann, U., Melber, K., Strasser, A.W.M. and Hollenberg, C.P.** (1992) High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Biotech Adv.* 10:179-189.
- Gelvin, S.B.** (2003) Agrobacterium-mediated plant transformation: The biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol R.* 67:16-37.
- Gigout, A., Buschmann, M.D. and Jolicoeur, M.** (2008) The fate of Pluronic F-68 in chondrocytes and CHO cells. *Biotechnol Bioeng.* 100:975-987.
- Giritch, A., Marillonnet, S., Engler, C., Van Eldik, G., Botterman, J., Klimyuk, V. and Gleba, Y.** (2006) Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 103:14701-14706.
- Godia, F. and Cairo, J.J.** (2006) Cell metabolism. *Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies.* Ozturk SS and Hu W-S. New-York, Taylor & Francis.
- Godoy-Silva, R., Chalmers, J.J., Casnocha, S.A., Bass, L.A. and Ma, N.** (2009) Physiological responses of CHO cells to repetitive hydrodynamic stress. *Biotechnol Bioeng.* 103:1103-1117.
- Goergen, J.L., Marc, A. and Engasser, J.M.** (1992) Comparison of specific rates of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous cultures. *Cytotechnology.* 10:147-155.

- Goergen, J.L., Marc, A. and Engasser, J.M.** (1993) Determination of cell lysis and death kinetics in continuous hybridoma cultures from the measurement of lactate dehydrogenase release. *Cytotechnology*. 11:189-195.
- Goldman, M.H., James, D.C., Ison, A.P. and Bull, A.T.** (1997) Monitoring proteolysis of recombinant human interferon-gamma during batch culture of Chinese hamster ovary cells. *Cytotechnology*. 23:103-111.
- Goldman, M.H., James, D.C., Rendall, M., Ison, A.P., Hoare, M. and Bull, A.T.** (1998) Monitoring recombinant human interferon-gamma N-glycosylation during perfused fluidized-bed and stirred-tank batch culture of CHO cells. *Biotechnol Bioeng*. 60:596-607.
- Gonias, S.L., Swaim, M.W., Massey, M.F. and Pizzo, S.V.** (1988) Cis-dichlorodiammineplatinum (II) as a selective modifier of the oxidation-sensitive reactive-center methionine in alpha 1-antitrypsin. *J Biol Chem*. 263:393-397.
- Goochee, C.F., Gramer, M.J., Andersen, D.C., Bahr, J.B. and Rasmussen, J.R.** (1991) The Oligosaccharides of Glycoproteins: Bioprocess Factors Affecting Oligosaccharide Structure and their Effect on Glycoprotein Properties. *Nat Biotech*. 9:1347-1355.
- Goochee, C.F. and Monica, T.** (1990) Environmental effects on protein glycosylation. *Biotechnology*. 8:421-427.
- Goswami, J., Sinskey, A., Steller, H., Stephanopoulos, G. and Wang, D.** (1999) Apoptosis in batch cultures of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*. 62:632-640.
- Gramer, M.J. and Goochee, C.F.** (1993) Glycosidase activities in Chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant. *Biotechnol Prog*. 9:366-373.
- Gray, P.W., Leung, D.W., Pennica, D., Yelverton, E., Najarian, R., Simonsen, C.C., Derynck, R., Sherwood, P.J., Wallace, D.M., et al.** (1982) Expression of human immune interferon cDNA in E.coli and monkey cells. *Nature*. 295:503-508.
- Gresser, I. and Naficy, K.** (1964) Recovery of an Interferon-Like Substance from Cerebrospinal Fluid. *Proc Soc Exp Biol Med*. 117:285-289.
- Grillberger, L., Kreil, T.R., Nasr, S. and Reiter, M.** (2009) Emerging trends in plasma-free manufacturing of recombinant protein therapeutics expressed in mammalian cells. *Biotechnol J*. 4:186-201.
- Grünewald, S., Matthijs, G. and Jaeken, J.** (2002) Congenital disorders of glycosylation : a review. *Pediatr Res*. 52:618-624.
- Gu, X. and Wang, D.I.** (1998) Improvement of interferon-gamma sialylation in Chinese hamster ovary cell culture by feeding of N-acetylmannosamine. *Biotechnol Bioeng*. 58:642-648.
- Gu, X., Xie, L., Harmon, B.J. and Wang, D.I.C.** (1997) Influence of primatone RL supplementation on sialylation of recombinant human interferon- γ produced by Chinese hamster ovary cell culture using serum-free media. *Biotechnol Bioeng*. 56:353-360.
- Günzler, W.A., Steffens, G.J., Otting, F., Buse, G. and Flohe, L.** (1982) Structural relationship between human high and low molecular mass urokinase. *Hoppe Seyler Z Physiol Chem*. 363:133-141.

- Guilbert, L.J. and Iscove, N.N.** (1976) Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin, and lecithin on Haemopoietic cell culture. *Nature*. 263:594–595.
- Haagmans, B.L., van der Meide, P.H., Stals, F.S., van den Eertwegh, A.J., Claassen, E., Bruggeman, C.A., Horzinek, M.C. and Schijns, V.E.** (1994) Suppression of rat cytomegalovirus replication by antibodies against gamma interferon. *J Virol* 68:2305-2312.
- Hacker, D.L., De Jesus, M. and Wurm, F.M.** (2009) 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells – Where do we go from here? *Biotechnol Adv.* 27:1023-1027.
- Hamilton, S.R., Bobrowicz, P., Bobrowicz, B., Davidson, R.C., Li, H., Mitchell, T., Nett, J.H., Rausch, S., Stadheim, T.A., et al.** (2003) Production of complex human glycoproteins in yeast. *Science*. 301:1244-1246.
- Hamilton, S.R. and Gerngross, T.U.** (2007) Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. *Curr Opin Biotech.* 18:387-392.
- Hamilton, W.G. and Ham, R.G.** (1977) Clonal growth of Chinese hamster ovary cell lines in protein-free media. *In vitro*. 13:537-547.
- Hampton, R.Y.** (2002) ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 14:476-482.
- Handa-Corrigan, A., Emery, A.N. and Spier, R.E.** (1989) Effect of gas-liquid interfaces on the growth of suspended mammalian cells - Mechanisms of cell-damage by bubbles. *Enzyme Microb Technol.* 11:230-235.
- Hansen, H.A. and Emborg, C.** (1994) Influence of ammonium on growth, metabolism, and productivity of a continuous suspension Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol Prog.* 10:121-124.
- Harcum, S.W.** (2006) Protein Glycosylation. *Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies*. Ozturk SS and Hu W-S. New-York, Taylor & Francis.
- Harris, R.J., Kabakoff, B., Macchi, F.D., Shen, F.J., Kwong, M., Andya, J.D., Shire, S.J., Bjork, N., Totpal, K., et al.** (2001) Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 752:233-245.
- Hassell, T., Gleave, S. and Butler, M.** (1991) Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. *Appl Biochem Biotechnol.* 30:29-41.
- Hatsuzawa, K., Nagahama, M., Takahashi, S., Takada, K., Murakami, K. and Nakayama, K.** (1992) Purification and characterization of furin, a kex2-like processing endoprotease, produced in Chinese ovary cells. *J Biol Chem.* 267:16094-16099.
- Hayter, P.M., Curling, E.M., Baines, A.J., Jenkins, N., Salmon, I., Strange, P.G., Tong, J.M. and Bull, A.T.** (1992) Glucose-limited chemostat culture of chinese hamster ovary cells producing recombinant human interferon-gamma. *Biotechnol Bioeng.* 39:327-335.
- Hayter, P.M., Curling, E.M., Gould, M.L., Baines, A.J., Jenkins, N., Salmon, I., Strange, P.G. and Bull, A.T.** (1993) The effect of the dilution rate on CHO cell physiology and recombinant interferon-gamma production in glucose-limited chemostat culture. *Biotechnol Bioeng.* 42:1077-1085.

- Hayter, P.M., Curling, E.M.A., Gould, M.L., Baines, A.J., Jenkins, N., Salmon, I., Strange, P.G. and Bull, A.T.** (1991) Chinese hamster ovary cell growth and interferon production kinetics in stirred batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 34:559-564.
- Heidemann, R., Zhang, C., Qi, H., Rule, J.L., Rozales, C., Park, S., Chuppa, S., Ray, M., Michaels, J., et al.** (2000) The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells. *Cytotechnology.* 32:157-167.
- Helenius, A. and Aebi, M.** (2001) Intracellular Functions of N-Linked Glycans. *Science.* 291:2364-2369.
- Helenius, A. and Aebi, M.** (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual Rev Biochem.* 73:1019-1049.
- Helenius, J. and Aebi, M.** (2002a) Transmembrane movement of dolichol linked carbohydrates during N-glycoprotein biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol.* 13:171-178.
- Helenius, J., Ng, D.T., Marolda, C.L., Walter, P., Valvano, M.A. and Aebi, M.** (2002b) Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature.* 415:447-450.
- Helmy, M.H., Ismail, S.S., Fayed, H. and El-Bassiouni, E.A.** (2000) Effect of selenium supplementation on the activities of glutathione metabolizing enzymes in human hepatoma Hep G2 cell line. *Toxicology.* 144:57-61.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U. and Andrews, N.C.** (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell.* 117:285-297.
- Hernandez-Barrantes, S., Toth, M., Bernardo, M.M., Yurkova, M., Gervasi, D.C., Raz, Y., Sang, Q.A. and Fridman, R.** (2000) Binding of Active (57 kDa) Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) to Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)-2 Regulates MT1-MMP Processing and Pro-MMP-2 Activation. *J Biol Chem.* 275:12080-12089.
- Hernandez, G. and Fisher, R.W.** (2007) Serum-free culturing of mammalian cells adaptation to and cryopreservation in fully defined media. *ALTEX.* 24:110-116.
- Hewlett, G.** (1991) Strategies for optimizing serum-free media. *Cytotechnology.* 5:3-14.
- Hiller, G.W., Clark, D.S. and Blanch, H.W.** (1994) Transient responses of hybridoma cells in continuous culture to step changes in amino acid and vitamin concentrations. *Biotechnol Bioeng.* 44:303-321.
- Hiller, M.M., Finger, A., Schweiger, M. and Wolf, D.H.** (1996) ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science.* 273:1725-1728.
- Hirschberg, C.B. and Snider, M.D.** (1987) Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem.* 56:63-87.
- Hooker, A.D., Goldman, M.H., Markham, N.H., James, D.C., Ison, A.P., Bull, A.T., Strange, P.G., Salmon, I., Baines, A.J., et al.** (1995) N-glycans of recombinant human interferon- γ change during batch culture of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng.* 48:639-648.

- Hossler, P., Khattak, S.F. and Li, Z.J.** (2009) Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology*. 19:936-949.
- Hossler, P., Mulukutla, B.C. and Hu, W.-S.** (2007) Systems analysis of N-glycan processing in mammalian cells. *PLoS One*. 2:e713.
- Houdebine, L.M.** (2009) Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microb*. 32:107-121.
- Hu, W., Rathman, J.J. and Chalmers, J.J.** (2008) An investigation of small-molecule surfactants to potentially replace pluronic F-68 for reducing bubble-associated cell damage. *Biotechnol Bioeng*. 101:119-127.
- Huang, E.P., Marquis, C.P. and Gray, P.** (2007) Development of Super-CHO protein-free medium based on a statistical design. *J Chem Technol Biotechnol*. 82:431-441.
- James, D.C., Freedman, R.B., Hoare, M., Ogonah, O.W., Rooney, B.C., Larionov, O.A., Dobrovolsky, V.N., Lagutin, O.V. and Jenkins, N.** (1995) N-Glycosylation of Recombinant Human Interferon-[gamma] Produced in Different Animal Expression Systems. *Biotechnology*. 13:592-596.
- James, D.C., Goldman, M.H., Hoare, M., Jenkins, N., Oliver, R.W.A., Green, B.N. and Freedman, R.B.** (1996) Posttranslational processing of recombinant human interferon-[gamma] in animal expression systems. *Protein Sci*. 5:331-340.
- Jayme, D.W.** (1991) Nutrient optimization for high density biological production applications. *Cytotechnology*. 5:15-30.
- Jenkins, N., Castro, P., Menon, S., Ison, A. and Bull, A.** (1994) Effect of lipid supplements on the production and glycosylation of recombinant interferon- γ expressed in CHO cells. *Cytotechnology*. 15:209-215.
- Jenkins, N. and Curling, E.M.** (1994) Glycosylation of recombinant proteins: Problems and prospects. *Enzyme Microb Tech*. 16:354-364.
- Jenkins, N., Meleady, P., Tyther, R. and Murphy, L.** (2009) Strategies for analysing and improving the expression and quality of recombinant proteins made in mammalian cells. *Biotechnol Appl Bioc*. 53 73-83.
- Jenkins, N., Parekh, R.B. and James, D.C.** (1996) Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. *Nat Biotechnol*. 14:975-981.
- Jentoft, N.** (1990) Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci*. 15:291-294.
- Jett, J.R., Maksymiuk, A.W., Su, J.Q., Mailliard, J.A., Krook, J.E., Tschetter, L.K., Kardinal, C.G., Twito, D.I., Levitt, R., et al.** (1994) Phase III trial of recombinant interferon gamma in complete responders with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 12:2321-2326.
- Jones, M.C. and Leroux, J.C.** (1999) Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers. *Eur J Pharm Biopharm*. 48:101-111.
- Jordan, I. and Kaplan, J.** (1994) The mammalian transferrin-independent iron transport system may involve a surface ferrireductase activity. *Biochem J*. 302:875-879.

- Jordan, M., Sucker, H., Einsele, A., Widmer, F. and Eppenberger, H.M.** (1994) Interactions between animal cells and gas-bubbles-The influence of serum and Pluronic F-68 on the physical properties of the bubble surface. *Biotechnol Bioeng.* 43:454.
- Ju, H.K., Hwang, S.-J., Jeon, C.-J., Lee, G.M. and Yoon, S.K.** (2009) Use of NaCl prevents aggregation of recombinant COMP-Angiopoietin-1 in Chinese hamster ovary cells. *J Biotechnol.* 143:145-150.
- Julenius, K.** (2007) NetCGlyc 1.0: prediction of mammalian C-mannosylation sites. *Glycobiology.* 17:868-876.
- Kabanov, A.V. and Alakhov, V.Y.** (2002) Pluronic Block Copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 19:1-72.
- Kagaya, K., Watanabe, K. and Fukazawa, Y.** (1989) Capacity of recombinant gamma interferon to activate macrophages for Salmonella-killing activity. *Infect Immun.* 57:609-615.
- Kane, J.F. and Hartley, D.L.** (1988) Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 6:95-101.
- Karaoglu, D., Kelleher, D.J. and Gilmore, R.** (1995) Functional characterization of Ost3p. Loss of the 34-kD subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase results in biased underglycosylation of acceptor substrates. *J Cell Biol.* 130:567-577.
- Karl, D.W., Donovan, M. and Flickinger, M.C.** (1990) A novel acid proteinase released by hybridoma cells. *Cytotechnology.* 3:157-169.
- Kaufman, R.J.** (1990) Selection and coamplification of heterologous genes in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 185:537-566.
- Kaufman, R.J., Swaroop, M. and Murtha-Riel, P.** (1994) Depletion of manganese within the secretory pathway inhibits O-linked glycosylation in mammalian cells. *Biochemistry.* 33:9813-9819.
- Kawabata, H., Yang, R., Hiram, T., Vuong, P.T., Kawano, S., Gombart, A.F. and Koeffler, H.P.** (1999) Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem.* 274:20826-20832.
- Kean, E.L.** (1991) Sialic acid activation. *Glycobiology.* 1:441-447.
- Keck, R.G.** (1996) The use of t-butyl hydroperoxide as a probe for methionine oxidation in proteins. *Anal Biochem.* 236:56-62.
- Keen, M.J. and Rapson, N.T.** (1995) Development of a serum-free culture medium for the large scale production of recombinant protein from a Chinese hamster ovary cell line. *Cytotechnology.* 17:153-163.
- Kehoe, J.W. and Bertozzi, C.R.** (2000) Tyrosine sulfation: a modulator of extracellular protein-protein interactions. *Chem Biol.* 7:R57-61.
- Kelleher, D.J., Karaoglu, D., Mandon, E.C. and Gilmore, R.** (2003) Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties. *Mol Cell.* 12:101-111.

- Kikuchi, K., Kadono, T., Furue, M. and Tamaki, K.** (1997) Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) may be an autocrine growth factor in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 108:281-284.
- Kim, D.Y., Lee, J.C., Chang, H.N. and Oh, D.J.** (2005) Effects of supplementation of various medium components on Chinese hamster ovary cell cultures producing recombinant antibody. *Cytotechnology.* 47:37-49.
- Kim, D.Y., Lee, J.C., Chang, H.N. and Oh, D.J.** (2006) Development of serum-free media for a recombinant CHO cell line producing recombinant antibody. *Enzyme Microb Tech.* 39:426-433.
- Kim, S.H. and Lee, G.M.** (2009) Development of serum-free medium supplemented with hydrolysates for the production of therapeutic antibodies in CHO cell cultures using design of experiments. *Appl Microbiol Biotechnol.* 83:639-648.
- Kisiday, J.D., Kurz, B., DiMicco, M.A. and Grodzinsky, A.J.** (2005) Evaluation of medium supplemented with insulin-transferrin-selenium for culture of primary bovine calf chondrocyte in three-dimensional hydrogel scaffolds. *Tissue Eng.* 11:141-151.
- Kling, J.** (2009) First US approval for a transgenic animal drug. *Nat Biotechnol.* 27:302-304.
- Knauer, R. and Lehle, L.** (1999) The oligosaccharyltransferase complex from yeast. *Biochim Biophys Acta.* 1426:259-73.
- Koc, M., Nad'ová, Z. and Ková, J.** (2006) Sensitivity of cells to apoptosis induced by iron deprivation can be reversibly changed by iron availability. *Cell Prolif.* 39:551-561.
- Kochanowski, N.** (2005) Influence des précurseurs de la glycosylation sur la macrohétérogénéité de l'IFN- γ produit en bioréacteur par des cellules CHO. PhD Thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL), Nancy.
- Kochanowski, N., Blanchard, F., Cacan, R., Chirat, F., Guedon, E., Marc, A. and Goergen, J.-L.** (2006) Intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents of cultured CHO cells determined by a fast, sensitive, and high-resolution ion-pair RP-HPLC. *Anal Biochem.* 348:243-251.
- Kochanowski, N., Blanchard, F., Cacan, R., Chirat, F., Guedon, E., Marc, A. and Goergen, J.-L.** (2007) IFN- γ glycosylation and macroheterogeneity, energetic cell status and medium composition during CHO cell cultures. *20st meeting of the European Society for Animal Cell Technology*, Dresden.
- Kochanowski, N., Blanchard, F., Cacan, R., Chirat, F., Guedon, E., Marc, A. and Goergen, J.-L.** (2008) Influence of Intracellular Nucleotide and Nucleotide Sugar Contents on Recombinant Interferon- γ Glycosylation During Batch and Fed-Batch Cultures of CHO Cells. *Biotechnol Bioeng.* 100:721-733.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S.** (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* 54:631-664.
- Kovar, J.** (1988) Growth-stimulating effect of ferric citrate on hybridoma cells: characterization and relation to transferrin function. *Hybridoma.* 7:255-263.
- Kovar, J. and Franek, F.** (1987) Iron compounds at high concentrations enable hybridoma growth in a protein-free medium. *Biotechnol Lett.* 9:259-264.

- Kovar, J., Valenta, T. and Stybrova, H.** (2001) Differing sensitivity of tumor cells to apoptosis induced by iron deprivation *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 37:450-458.
- Kratje, R.B., Lind, W. and Wagner, R.** (1994) Evaluation of the proteolytic potential of *in vitro*-cultivated hybridoma and recombinant mammalian cells. *J Biotechnol.* 32:107-125.
- Kunkel, J.P., Jan, D.C., Jamieson, J.C. and Butler, M.** (1998) Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *J Biotechnol.* 62:55-71.
- Kurano, N., Leist, C., Messi, F., Kurano, S. and Fiechter, A.** (1990b) Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor. 2. Effects of medium components and waste products. *J Biotechnol.* 15:113-128.
- Kurano, S., Kurano, N., Leist, C. and Fiechter, A.** (1990a) Utilization and stability of vitamins in serum-containing and serum-free media in CHO cell culture. *Cytotechnology.* 4:243-250.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lambrecht, B., Gonze, M., Morales, D., Meulemans, G. and Van Den Berg, T.P.** (1999) Comparison of biological activities of natural and recombinant chicken interferon-gamma. *Vet Immunol Immunop.* 70:257-267.
- Lamotte, D.** (1997) Production et glycosylation de l'interféron-gamma humain par des cellules CHO cultivées en bioréacteurs discontinus et perfusés. Influence des conditions opératoires et du potentiel de glycosylation des cellules. PhD Thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL), Nancy.
- Lantz, M.S. and Ciborowski, P.** (1994) Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. *Methods Enzymol.* 235:563-594.
- Lao, M.-S. and Toth, D.** (1997) Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant CHO cell culture. *Biotechnol Prog.* 13:688-691.
- Lee, E.U., Roth, J. and Paulson, J.C.** (1989) Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. *J Biol Chem.* 264:13848-13855.
- Legrand, C., Bour, J.M., Jacob, C., Capiamont, J., Martial, A., Marc, A., Wudtke, M., Kretzmer, G., Demangel, C., et al.** (1992) Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker. *J Biotechnol.* 25:231-243.
- Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Laine, A.C., Gomord, V. and Faye, L.** (1998) N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol Biol.* 38:31-48.
- Levine, R.L., Mosoni, L., Berlett, B.S. and Stadtman, E.R.** (1996) Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:15036-15040.
- Lewis, D.B. and Wilson, C.B.** (1990) Gamma-interferon: an immunoregulatory lymphokine with immunotherapeutic potential. *Pediatr Infect Dis J.* 9:642-651.

- Lijnen, H.R., Bachmann, F., Collen, D., Ellis, V., Pannekoek, H., Rijken, D.C. and Thorsen, S.** (1994) Mechanisms of plasminogen activation. *J Intern Med.* 236:415-424.
- Lillico, S.G., Sherman, A., McGrew, M.J., Robertson, C.D., Smith, J. and Haslam, C.e.a.** (2007) Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 104:1771-1776.
- Lin, A.A., Kimura, R. and Miller, W.M.** (1993) Production of tPA in recombinant CHO cells under oxygen-limited conditions. *Biotechnol Bioeng.* 42:339-350.
- Linz, M., Zeng, A.P., Wagner, R. and Deckwer, W.D.** (1997) Stoichiometry, kinetics, and regulation of glucose and amino acid metabolism of a recombinant BHK cell line in batch and continuous cultures. *Biotechnol Prog.* 13:453-463.
- Lipscomb, M.L., Palomares, L.A., Hernandez, V., Ramirez, O.T. and Kompala, D.S.** (2005) Effect of production method and gene amplification on the glycosylation pattern of a secreted reporter protein in CHO cells. *Biotechnol Prog.* 21:40-49.
- Lis, H. and Sharon, N.** (1993) Protein glycosylation: Structural and functional aspects. *Eur J Biochem.* 218:1-27.
- Liu, D.T.** (1992) Glycoprotein pharmaceuticals: scientific and regulatory considerations, and the US Orphan Drug Act. *Trends Biotechnol.* 10 114-120.
- Lockshin, R.A. and Williams, C.M.** (1965) Programmed Cell Death--I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkworm. *J Insect Physiol.* 11:123-133.
- Lucas, D.M., Lokuta, M.A., McDowell, M.A., Doan, Y.E.S. and Paulnock, D.M.** (1998) Analysis of the IFN- γ -Signaling Pathway in Macrophages at Different Stages of Maturation. *J Immunol.* 160:4337-4342.
- Lucchiari, M.A., Martin, J.P., Modolell, M. and Pereira, C.A.** (1991) Acquired immunity of A/J mice to mouse hepatitis virus 3 infection: Dependence on interferon- γ synthesis and macrophage sensitivity to interferon- γ . *J Gen Virol.* 72:1317-1322.
- Lundell, D., Lunn, C., Dalgarno, D., Fossetta, J., Greenberg, R., Reim, R., Grace, M. and Narula, S.** (1991) The carboxyl-terminal region of human interferon {gamma} is important for biological activity: mutagenic and NMR analysis. *Protein Eng.* 4:335-341.
- Lundell, D.L. and Narula, S.K.** (1994) Structural elements required for receptor recognition of human interferon-gamma. *Pharmacol Ther.* 64:1-21.
- Lustbader, J.W., Birken, S., Pollak, S., Pound, A., Chait, B.T., Mirza, U.A., Ramnarain, S., Canfield, R.E. and Brown, J.M.** (1996) Expression of human chorionic gonadotropin uniformly labeled with NMR isotopes in Chinese hamster ovary cells: An advance toward rapid determination of glycoprotein structures. *J Biomol NMR.* 7:295-304.
- Maldonado, L.M.T.P., Hernández, V.E.B., Rivero, E.M., Barba de la Rosa, A.P., Flores, J.L.F., Acevedo, L.G.O. and De León Rodríguez, A.** (2007) Optimization of culture conditions for a synthetic gene expression in *Escherichia coli* using response surface methodology: the case of human interferon beta. *Biomol Eng.* 24:217-222.

- Marc, A., Goergen, J.-L. and Farges-Haddani, B.** (2006) Peptide fractions promoting growth and synthesis of desired product(s) into cell and/or tissue culture. WO/2006/064020 (all except US).
- Marchal, I., Jarvis, D.L., Cacan, R. and Verbert, A.** (2001) Glycoproteins from insect cells: Sialylated or not? *Biol Chem.* 382:151-159.
- Marquardt, T. and Denecke, J.** (2003) Congenital isorders of glycosylation : review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies. *Eur J Pediatr.* 162:359-379.
- Martinelle, K. and Haggstrom, L.** (1993) Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: transport across cell membranes. *J Biotechnol.* 30:339-350.
- Massoud, M., Attal, J., Thépot, D., Pointu, H., Stinnakre, M.G., Théron, M.C., Lopez, C. and Houdebine, L.M.** (1996) The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reprod Nutr Dev.* 36:555-563.
- Matasci, M., Hacker, D.L., Baldi, L. and Wurm, F.M.** (2009) Recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: current status and future prospects. *Drug Discov Today: Technologies.* 5:37-42.
- McCawley, L.J. and Matrisian, L.M.** (2000) Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today.* 6:149-156.
- McDonald, J.K. and Barrett, A.J.** (1986) In: Exopeptidase, in mammalian proteases: a glossary and bibliography *Academic Press, New York 2.*
- McGrath, B.** (2006) Factor IX (protease zymogen). *Directory of Therapeutic Enzymes.* McGrath BW, G. Boca Raton, FL, CRC Press
- McKie, A.T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T.J., et al.** (2000) A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell.* 5:299-309.
- McLimans, W., Blumenson, L., Repasky, E. and Ito, M.** (1991) Ammonia loading in cell culture systems. *Cell Biol Int.* 5:653-660.
- Meager, A. and Leist, T.** (1986) Antigenic characteristics of glycosylated natural and unglycosylated recombinant human gamma-interferon. *J Interferon Res.* 6:225-232.
- Meier, S.J., Hatton, T.A. and Wang, D.I.C.** (1999) Cell death from bursting bubbles: Role of cell attachment to rising bubbles in sparged reactors. *Biotechnol Bioeng.* 62:468-478.
- Mendonça, R.Z., De Oliveira, E.C., Pereira, C.A. and Lebrun, I.** (2007) Effect of bioactive peptides isolated from yeastolate, lactalbumin and NZCase in the insect cell growth. *Bioprocess Biosyst Eng.* 30:157-164
- Mercille, S., Johnson, M., Lanthier, S., Kamen, A.A. and Massie, B.** (2000) Understanding factors that limit the productivity of suspension-based perfusion cultures operated at high medium renewal rates. *Biotechnol Bioeng.* 67:435-450.
- Mercille, S. and Massie, B.** (1994) Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnol Bioeng.* 44:1140-1154.

- Mergulhao, F.J.M., Summers, D.K. and Monteiro, G.A.** (2005) Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv.* 23:177-202.
- Merten, O.W.** (2002) Virus contaminations of cell cultures - a biotechnological view. *Cytotechnology.* 39:91-116.
- Metcalfe, H., Field, R.P., Froud, S.J. and Spier, R.E.** (1994) The use of 2-hydroxy-2,4,6-cycloheptarin-1-one (tropolone) as a replacement for transferrin. Woburn, MA, Butterworth-Heinemann
- Michaels, J.D., Nowak, J.E., Mallik, A.K., Koczo, K., Wasan, D.T. and Papoutsakis, E.T.** (1995) Analysis of cell-to-bubble attachment in sparged bioreactors in the presence of cell-protecting additives. *Biotechnol Bioeng.* 47:407-419.
- Michaels, J.D., Petersen, J.F., McLintire, L.V. and Papoutsakis, E.T.** (1991) Protection mechanisms of freely suspended animal cells (CRL 8018) from fluid-mechanical injury. Viscometric and bioreactor studies using serum, pluronic F68 and polyethylene glycol. *Biotechnol Bioeng.* 38:169-180.
- Miller, W.M., Wilke, C.R. and Blanch, H.W.** (1987) Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture. *J Cell Physiol.* 132:524-30.
- Mizrahi, A.** (1975) Pluronic polyols in human lymphocyte cell line cultures. *J Clin Microbiol.* 2:11-13.
- Mizrahi, A. and Lazar, A.** (1988) Media for cultivation of animal cells: an overview. *Cytotechnology.* 1:199-214.
- Mols, J.** (2004) Cultivation of Chinese hamster ovary (CHO) cells in protein-free media supplemented with plant peptones is sufficient to prevent proteolysis of secreted recombinant glycoproteins. PhD thesis, Université catholique de Louvain, Louvain.
- Mols, J., Burteau, C.C., Verhoeve, F.R., Ballez, J.S., Agathos, S.N. and Schneider, Y.J.** (2003) Fortification of a protein-free cell culture medium with plant peptones improves cultivation and productivity of an interferon-g producing CHO cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 39:291-296.
- Mols, J., Peeters-Joris, C., Wattiez, R., Agathos, S.N. and Schneider, Y.-J.** (2005) Recombinant interferon- γ secreted by Chinese hamster ovary-320 cells cultivated in suspension in protein-free media is protected against extracellular proteolysis by the expression of natural protease inhibitors and by the addition of plant protein hydrolysates to the culture medium. *In Vitro Cell Dev- An.* 41:83-91.
- Mols, J., Peeters-Joris, C., Wattiez, R., Agathos, S.N. and Schneider, Y.J.** (2005) Recombinant interferon-gamma secreted by Chinese hamster ovary-320 cells cultivated in suspension in protein-free media is protected against extracellular proteolysis by the expression of natural protease inhibitors and by the addition of plant protein hydrolysates to the culture medium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 41:83-91.
- Monaco, L., Marc, A., Eon-Duval, A., Acerbis, G., Distefano, G., Lamotte, D., Engasser, J.-M., Soria, M. and Jenkins, N.** (1996) Genetic engineering of α 2,6-sialyltransferase in recombinant CHO cells and its effects on the sialylation of recombinant interferon- γ . *Cytotechnology.* 22:197-203.

- Morell, A.G., Irvine, R.A., Sternlieb, I., Scheinberg, I.H. and Ashwell, G.** (1968) Physical and chemical studies on ceruloplasmin. V. Metabolic studies on sialic acid-free ceruloplasmin *in vivo*. *J Biol Chem.* 243:155-159.
- Morelle, W., Canis, K., Chirat, F., Faid, V. and Michalski, J.C.** (2006) The use of mass spectrometry for the proteomic analysis of glycosylation. *Proteomics.* 6:3993-4015.
- Mori, K., Iida, S., Yamane-Ohnuki, N., Kanda, Y., Kuni-Kamochi, R., Nakano, R., Imai-Nishiya, H., Okazaki, A., Shinkawa, T., et al.** (2007) Non-fucosylated therapeutic antibodies: the next generation of therapeutic antibodies. *Cytotechnology.* 55:109-114.
- Mori, K., Kuni-Kamochi, R., Yamane-Ohnuki, N., Wakitani, M., Yamano, K., Imai, H., Kanda, Y., Niwa, R., Iida, S., et al.** (2004) Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize effector function of produced antibodies using FUT8 siRNA. *Biotechnol Bioeng.* 88:901-908.
- Morrow Jr., K.J.** (2007) Improving protein production processes. *Gen Eng News.* 27:44-47.
- Mortellaro, S. and Devine, M.** (2007) Advances in Animal-Free Manufacturing of Biopharmaceuticals. *BioPharm Int.* 20:30-37.
- Murakami, H., Masui, H., Sato, G.H., Sueoka, N., Chow, T.P. and Kano-Sueoka, T.** (1982) Growth of hybridoma cells in serum-free medium: ethanolamine is an essential component. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:1158-1162.
- Murhammer, D.W. and Goochee, C.F.** (1990) Structural features of nonionic polyglycol polymer molecules responsible for the protective effect in sparged animal cell bioreactors. *Biotechnol Progr.* 6:142-148.
- Muthing, J., Kemminer, S.E., Conratt, H.S., Sagi, D., Nimtz, M., Karst, U. and Peter-Katalinic, J.** (2003) Effects of buffering conditions and culture pH on production rates and glycosylation of clinical phase I anti-melanoma mouse IgG3 monoclonal antibody R24. *Biotechnol Bioeng.* 83:321-334.
- Nacheva, G., Todorova, K., Boyanova, M., Berzal-Herranz, A., Karshikoff, A. and Ivanov, I.** (2003) Human interferon gamma: Significance of the C-terminal flexible domain for its biological activity. *Arch Biochem Biophys.* 413:91-98.
- Nagase, H. and Woessner, J.F.** (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 274:21491-21494.
- Nagira, K., Hara, T., Hayashida, M., Osada, K., Shiga, M., Sasamoto, K., Kina, K. and Murakami, H.** (1995) Development of a protein-free medium with iron salts replacing transferrin for a human-human hybridoma. *Biosci Biotechnol Biochem.* 59:743-745.
- Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E. and Rubin, B.Y.** (1983) Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med.* 158:670-689.
- Neermann, J. and Wagner, R.** (1996) Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *J Cell Physiol.* 166:152-169.
- Negrouk, V., Eisner, G., Lee, H.-I., Han, K., Taylor, D. and Wong, H.C.** (2005) Highly efficient transient expression of functional recombinant antibodies in lettuce. *Plant Sci.* 169:433-438.

- Netzel-Arnett, S., Sang, Q.X., Moore, W.G., Navre, M., Birkedal-Hansen, H. and Van Wart, H.E.** (1993) Comparative sequence specificities of human 72- and 92-kDa gelatinases (type IV collagenases) and PUMP (matrilysin). *Biochemistry*. 32:6427-6432.
- Nielsen, L.K., Smythl, G.K. and Greenfield, P.F.** (1991) Hemacytometer Cell Count Distributions: Implications of Non-Poisson Behavior. *Biotechnol. Prog.* 7:560-563.
- Noguchi, A., Mukuria, C.J., Suzuki, E. and Naiki, M.** (1995) Immunogenicity of N-glycolylneuraminic acid-containing carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biochem.* 117:59-62.
- Nyberg, G.B., Balcarcel, R.R., Follstad, B.D., Stephanopoulos, G. and Wang, D.I.C.** (1999) Metabolic effects on recombinant interferon- γ glycosylation in continuous culture of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng.* 62:336-347.
- O'Connell, B., Tabak, L.A. and Ramasubbu, N.** (1991) The influence of flanking sequences on O-glycosylation. *Biochem Bioph Res Co.* 180:1024-1030
- Ozturk, S.S. and Hu, W.-S.** (2005) *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell Based Therapies*, Taylor & Francis, Incorporated
- Ozturk, S.S. and Palsson, B.O.** (1990) Chemical decomposition of glutamine in cell culture media: effect of media type, pH, and serum concentration. *Biotechnol Prog.* 6:121-128.
- Page, M.A., Baker, E. and Morgan, E.H.** (1984) Transferrin and iron uptake by rat hepatocytes in culture. *Am J Physiol* 246:G26-33.
- Papoutsakis, E.T.** (1991) Media additives for protecting freely suspended animal cells against agitation and aeration damage. *Trends Biotechnol.* 9:316-324.
- Parekh, R.B.** (1991) Mammalian cell gene expression: protein glycosylation. *Curr Opin Biotechnol.* 2:730-734.
- Park, H., An, S. and Choe, T.** (2006) Change of insulin-like growth factor gene expression in Chinese hamster ovary cells cultured in serum-free media. *Biotechnol Bioproc Eng.* 11:319-324.
- Patrick, L.** (2004) Selenium biochemistry and cancer: A review of the literature. *Alt Med Rev.* 9:239-258.
- Peck, R.** (1989) Gamma interferon induces monocyte killing of *Listeria monocytogenes* by an oxygen-dependent pathway; alpha- or beta-interferons by oxygen-independent pathways. *J Leukoc Biol.* 46:434-440.
- Peng, R.W., Guetg, C., Tigges, M. and Fussenegger, M.** (2010) The vesicle-trafficking protein munc18b increases the secretory capacity of mammalian cells. *Metab Eng.* 12:18-25.
- Pennica, D., Holmes, W.E., Kohr, W.J., Harkins, R.N., Vehar, G.A., Ward, C.A., Bennett, W.F., Yelverton, E., Seeburg, P.H., et al.** (1983) Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature.* 301:214-221.
- Perlman, S., van den Hazel, B., Christiansen, J., Gram-Nielsen, S., Jeppesen, C.B., Andersen, K.V., Halkier, T., Okkels, S. and Schambye, H.T.** (2003) Glycosylation of an N-terminal extension prolongs the half-life and increases the *in vivo* activity of follicle stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:3227-3235.

- Peshwa, M.V., Kyung, Y.S., McClure, D.B. and Hu, W.S.** (1993) Cultivation of mammalian cells as aggregates in bioreactors: Effect of calcium concentration of spatial distribution of viability. *Biotechnol Bioeng.* 41:179-187.
- Petch, D. and Butler, M.** (1994) Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: glucose and glutamine utilization. *J Cell Physiol.* 161:71-76.
- Peter-Katalinić, J.** (2005) Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins. *Methods Enzymol.* 405.
- Petrescu, A.J., Milac, A.L., Petrescu, S.M., Dwek, R.A. and Wormald, M.R.** (2004) Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology.* 14:103-114.
- PhRMA** (2008) Biotechnology Research Continues to Bolster Arsenal Against Disease with 633 Medicines in Development *Biotechnology medicines in development.*
- Pless, D.D. and Lennarz, W.J.** (1977) Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:134-138.
- Porter, J.F., Shen, S. and Denhardt, D.T.** (2004) Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 stimulates proliferation of human cancer cells by inhibiting a metalloproteinase. *Mol Cell Pathol.* 90:463-470.
- Portillo, G., Turner, M., Chantry, D. and Feldmann, M.** (1989) Effect of cytokines on HLA-DR and IL-1 production by a monocytic tumour, THP-1. *Immunology.* 66:170-175.
- Potvin, B., Kumar, R., Howard, D.R. and Stanley, P.** (1990) Transfection of a human alpha-(1,3)fucosyltransferase gene into Chinese hamster ovary cells. Complications arise from activation of endogenous alpha-(1,3)fucosyltransferases. *J Biol Chem.* 265:1615-1622.
- Premaratne, R.J., Lin, W.J. and Johnson, E.A.** (1991) Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 57:3046-3048.
- Puck, T.T., Cieciura, S.J. and Robinson, A.** (1958) Genetics of somatic mammalian cells: III. Lon-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J exp Med.* 108:945-956.
- Racher, A.J., Looby, D. and Griffiths, J.B.** (1990) Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability. *Cytotechnology.* 3:301-307.
- Rademacher, T.W., Parekh, R.B. and Dwek, R.A.** (1988) Glycobiology. *Annu Rev Biochem.* 57:785-838.
- Rahway, N.J.** (1983) The Merck Index.
- Raju, T.S., Briggs, J.B., Borge, S.M. and Jones, A.J.** (2000) Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology.* 10:477-486.
- Rakba, N., Loyer, P., Gilot, D., Delcros, J.G., Glaise, D., Baret, P., Pierre, J.L., Brissot, P. and Lescoat, G.** (2000) Antiproliferative and apoptotic effects of O-Trensox, a new synthetic iron chelator, on differentiated human hepatoma cell lines. *Carcinogenesis.* 21:943-951.
- Ramirez, O.T. and Mutharasan, R.** (1990) The role of the plasma membrane fluidity on the shear sensitivity of hybridomas grown under hydrodynamic stress. *Biotechnol Bioeng.* 36:911-920.

- Rannou, F., François, M., Corvol, M.T. and Berenbaum, F.** (2005) Dégradation du cartilage et polyarthrite rhumatoïde. *Revue du Rhumatisme (Edition Française)*. 72:322-330.
- Rapoport, N., Marin, A., Luo, Y., Prestwich, G.D. and Muniruzzaman, M.D.** (2002) Intracellular uptake and trafficking of Pluronic micelles in drug-sensitive and MDR cells: Effect on the intracellular drug localization. *J Pharm Sci*. 91:157-170.
- Rathore, A.S. and Winkle, H.** (2009) Quality by design for biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol*. 27:26-34.
- Reitzer, L.J., Wice, B.M. and Kennell, D.** (1979) Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem*. 254:2669-2676.
- Restelli, V. and Butler, M.** (2002) The effect of cell culture parameters on protein glycosylation. *Glycosylation*. (ed.) A-RM. Kluwer, Dordrecht.
- Reuter, G. and Gabius, H.J.** (1999) Eukaryotic glycosylation: whim of nature or multipurpose tool? *Cell Mol Life Sci*. 55:368-422.
- Richardson, D.R. and Ponka, P.** (1997) The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta*. 1331:1-40.
- Rinderknecht, E., O'Connor, B.H. and Rodriguez, H.** (1984) Natural human interferon-gamma. Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation. *J Biol Chem*. 259:6790-6797.
- Robert, F., Bierau, H., Rossi, M., Agugiaro, D., Soranzo, T., Broly, H. and Mitchell-Logean, C.** (2009) Degradation of an Fc-fusion recombinant protein by host cell proteases: Identification of a CHO cathepsin D protease. *Biotechnol Bioeng*. 104:1132-1141.
- Robinson, A.B. and Rudd, C.J.** (1974) Deamidation of glutaminy and asparaginy residues in peptides and proteins. *Curr Top Cell Regul*. 8:247-295.
- Rodriguez, J., Spearman, M., Huzel, N. and Butler, M.** (2005) Enhanced production of monomeric interferon-beta by CHO cells through the control of culture conditions. *Biotechnol Prog*. 21:22-30.
- Rutkowski, D.T. and Kaufman, R.J.** (2004) A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol*. 14:20-28.
- Ryff, J.-C. and Schellekens, H.** (2002) Immunogenicity of rDNA-derived pharmaceuticals. *Trends Pharmacol Sci*. 23 254-256.
- Sanceau, J., Sondermeyer, P., Béranger, F., Falcoff, R. and Vaquero, C.** (1987) Intracellular human gamma-interferon triggers an antiviral state in transformed murine L cells. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 84:2906-2910.
- Sandberg, H., Lutkemeyer, D., Kuprin, S., Wrangel, M., Almstedt, A., Persson, P., Ek, V. and Mikaelsson, M.** (2006) Mapping and partial characterization of proteases expressed by a CHO production cell line. *Biotechnol Bioeng*. 95:961-971.
- Sanfeliu, A. and Stephanopoulos, G.** (1999) Effect of glutamine limitation on the death of attached Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*. 64:46-53.

- Sareneva, T., Cantell, K., Pyhälä, L., Pirhonen, J. and Julkunen, I.** (1993) Effects of carbohydrates on the pharmacokinetics of human interferon- γ . *J Interferon Res.* 13:267-269.
- Sareneva, T., Pirhonen, J., Cantell, K. and Julkunen, I.** (1995) N-glycosylation of human interferon-gamma : glycans at Asn-25 are critical for protease resistance. *Biochem. J.* 308:9-14.
- Sareneva, T., Pirhonen, J., Cantell, K., Kalkkinen, N. and Julkunen, I.** (1994) Role of N-glycosylation in the synthesis, dimerization and secretion of human interferon-gamma. *Biochem J.* 303:831-840.
- Sarrazin, S.** (2007) Caractérisation des interactions glycosaminoglycannes/protéines dans le but de développer des molécules d'intérêt thérapeutique: exemples de l'endocan et de l'IFN- γ PhD Thesis, Université Joseph Fourier Grenoble I, Grenoble.
- Sato, J.D., Kawamoto, T., McClure, D.B. and Sato, G.H.** (1984) Cholesterol requirement of NS-1 mouse myeloma cells for growth in serum-free medium. *Mol Biol Med.* 2:121-134.
- Satoh, M., Hosoi, S. and Sato, S.** (1990) Chinese hamster ovary cells continuously secrete a cysteine endopeptidase. *In Vitro Cell Dev Biol.* 26:1101-1104.
- Sauerwald, T.M., Oyler, G.A. and Betenbaugh, M.J.** (2003) Study of caspase inhibitors for limiting death in mammalian cell culture. *Biotechnol Bioeng.* 81:329-340.
- Schlaeger, E.J.** (1996) The protein hydrolysate, Primatone RL, is a cost-effective multiple growth promoter of mammalian cell culture in serum-containing and serum-free media and displays anti-apoptosis properties. *J Immunol Methods.* 194:191-199.
- Schmelzer, A.E. and Miller, W.M.** (2002) Effects of osmoprotectant compounds on NCAM polysialylation under hyperosmotic stress and elevated pCO₂. *Biotechnol Bioeng.* 77:359-368.
- Schneider, M., Marison, I.W. and von Stockar, U.** (1996) The importance of ammonia in mammalian cell culture. *J Biotechnol.* 46:161-185.
- Schneider, Y.-J.** (1989) Optimization of hybridoma cell growth and monoclonal antibody secretion in chemically defined serum- and protein-free medium. *J Immunol Methods.* 116:67-77.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T. and Hume, D.A.** (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 75:163-189.
- Schroder, M. and Kaufman, R.J.** (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res.* 569:29-63.
- Schröder, M., Matischak, K. and Fried, P.** (2004) Serum- and protein-free media formulations for the Chinese hamster ovary cell line DUKXB11. *J Biotechnol.* 108:279-292.
- Schubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W. and Bennink, J.R.** (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature.* 404:770-774.
- Senger, R.S. and Karim, M.N.** (2003) Effect of shear stress on intrinsic CHO culture state and glycosylation of recombinant tissue-type plasminogen activator protein. *Biotechnol Prog.* 19:1199-1209.

- Serrato, J.A., Palomares, L.A., Meneses-Acosta, A. and Ramírez, O.T.** (2004) Heterogeneous conditions in dissolved oxygen affect N-glycosylation but not productivity of a monoclonal antibody in hybridoma cultures. *Biotechnol Bioeng.* 88:176-188.
- Sharfstein, S.T., Tucker, S.N., Mancuso, A., Blanch, H.W. and Clark, D.S.** (1994) Quantitative *in vivo* nuclear magnetic resonance studies of hybridoma metabolism. *Biotechnol Bioeng.* 43:1059-1074.
- Shen, C.F., Kiyota, T., Jardin, B., Konishi, Y. and Kamen, A.** (2007) Characterization of yeastolate fractions that promote insect cell growth and recombinant protein production. *Cytotechnology.* 54:25-34.
- Shen, M.-H., Wang, Q.-C. and Mu, X.-P.** (2008) Expression and identification of recombinant human β -amyloid protein 1-42 in *Pichia pastoris*. *Journal of Jilin University Medicine Edition.* 34:1083-1085.
- Shental-Bechor, D. and Levy, Y.** (2008) Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 105:8256-8261
- Shiao, Y.J. and Vance, J.E.** (1995) Evidence for an ethanolamine cycle: differential recycling of the ethanolamine moiety of phosphatidylethanolamine derived from phosphatidylserine and ethanolamine. *Biochem J.* 310 (Pt 2):673-679.
- Shields, R., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L., Hong, K., Meng, Y., Weikert, S. and Presta, L.** (2002) Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc γ RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem.* 277:26733-26740.
- Shiloach, J. and Fass, R.** (2005) Growing *E. coli* to a high cell density — a historical perspective on method development. *Biotechnol Adv.* 23:345-357.
- Simonart, T., Boelaert, J.R. and Mosselmans, R.** (2002) Antiproliferative and apoptotic effect of iron chelators on human cervical carcinoma cells. *Gynecol Oncol.* 85.
- Singh, V.** (1999) Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnology.* 30:149-158.
- Sjoblom, T., Jones, S., Wood, L.D., Parsons, D.W., Lin, J., Barber, T.D., Mandelker, D., Leary, R.J., Ptak, J., et al.** (2006) The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science.* 314:268-274.
- Smeekens, S.P.** (1993) Processing of protein precursors in by a novel family of subtilisin-related mammalian endoproteases. *BioTechnology.* 11:182-186.
- Smith, M.F., Ricke, W.A., Bakke, L.J., Dow, M.P.D. and Smith, G.W.** (2002) Ovarian tissue remodeling: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Mol Cell Endocrinol.* 191:45-56.
- Snoek-van Beurden, P.A.M. and Von den Hoff, J.W.** (2005) Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques.* 38:73-83.
- Sola, R.J. and Griebenow, K.** (2009) Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *J Pharm Sci.* 98:1223-1245.

- Sola, R.J. and Griebenow, K.** (2010) Glycosylation of therapeutic proteins: an effective strategy to optimize efficacy. *BioDrugs*. 24:9-21.
- Spearman, M., Rodriguez, J., Huzel, N., Sunley, K. and Butler, M.** (2007) Effect of culture conditions on glycosylation of recombinant beta-interferon in CHO cells., Springer.
- Spens, E. and Haggstrom, L.** (2005) Protease activity in protein-free NS0 myeloma cell cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 41:330-336.
- Spiro, M.J., Spiro, R.G. and Bhojroo, V.D.** (1979) Glycosylation of proteins by oligosaccharide-lipids. Studies on a thyroid enzyme involved in oligosaccharide transfer and the role of glucose in this reaction. *J Biol Chem*. 254:7668-7674.
- Stanley, P., Raju, T.S. and Bhaumik, M.** (1996) CHO cells provide access to novel N-glycans and developmentally regulated glycosyltransferases. *Glycobiology*. 6:695-699.
- Stettler, M.** (2007) Bioreactor processes based on disposable materials for the production of recombinant proteins from mammalian cells. PhD Thesis, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne.
- Stork, R., Zettlitz, K.A., Muller, D., Rether, M., Hanisch, F.G. and Kontermann, R.E.** (2008) N-glycosylation as novel strategy to improve pharmacokinetic properties of bispecific single-chain diabodies. *J Biol Chem*. 283:7804-7812.
- Strongin, A.Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B.L., Grant, G.A. and Goldberg, G.** (1995) Mechanism Of Cell Surface Activation Of 72-kDa Type IV Collagenase. *J Biol Chem*. 270:5331-5338.
- Sturrock, A., Alexander, J., Lamb, J., Craven, C.M. and Kaplan, J.** (1990) Characterization of a transferrin-independent uptake system for iron in HeLa cells. *J Biol Chem*. 265:3139-3145.
- Sun, O.H. and Lee, G.M.** (2008) Nutrient deprivation induces autophagy as well as apoptosis in Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol Bioeng*. 99:678-685.
- Sung, Y.H., Lim, S.W., Chung, J.Y. and Lee, G.M.** (2004) Yeast hydrolysate as a low-cost additive to serum-free medium for the production of human thrombopoietin in suspension cultures of Chinese hamster ovary cells. *Appl Microbiol Biotechnol*. 63:527-36.
- Sung, Y.H., Song, Y.J., Lim, S.W., Chung, J.Y. and Lee, G.M.** (2004) Effect of sodium butyrate on the production, heterogeneity and biological activity of human thrombopoietin by recombinant Chinese hamster ovary cells. *J Biotechnol*. 112:323-35.
- Sunstrom, N.A., Gay, R.D., Wong, D.C., Kitchen, N.A., DeBoer, L. and Gray, P.P.** (2000) Insulin-like growth factor-I and transferrin mediate growth and survival of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Prog*. 16:698-702.
- Swartz, J.** (2001) Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol Bioeng*. 12:195-201.
- Teige, M., Weidemann, R. and Kretzmer, G.** (1994) Problems with serum-free production of antithrombin III regarding proteolytic activity and product quality. *J Biotechnol*. 34:101-105.

- Tharmalingam, T., Ghebeh, H., Wuerz, T. and Butler, M.** (2008) Pluronic Enhances the Robustness and Reduces the Cell Attachment of Mammalian Cells. *Mol Biotechnol.* 39:167-177.
- Thiel, D.J., Le Du, M.-H., Walter, R.L., D'Arcy, A., Chène, C., Fountoulakis, M., Garotta, G., Winkler, F.K. and Ealick, S.E.** (2000) Observation of an unexpected third receptor-molecule in the crystal structure of human interferon- γ receptor complex. *Structure.* 8:927-936.
- Tomlinson, N.** (1991) The effect of growth factors and the transferrin receptor on the productivity of recombinant mammalian cells. PhD Thesis, University of Kent Canterbury.
- Tran-Moseman, A., Schauer, N. and De Bernardez Clark, E.** (1999) Renaturation of Escherichia coli-derived recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Protein Express Purif.* 16:181-189.
- Trinchieri, G. and Perussia, B.** (1985) Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol Today.* 6:131-136.
- Trummer, E., Fauland, K., Seidinger, S., Schriebl, K., Lattenmayer, C., Kunert, R., Vorauer-Uhl, K., Weik, R., Borth, N., et al.** (2006b) Process parameter shifting: Part II. Biphasic cultivation-A tool for enhancing the volumetric productivity of batch processes using EPO-Fc expressing CHO cells. *Biotechnol Bioeng.* 94:1045-1052.
- Umana, P., Jean-Mairet, J., Moudry, R., Amstutz, H. and Bailey, J.E.** (1999) Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat Biotechnol.* 17:176-180.
- Van Corven, E.J., Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T. and Moolenaar, W.H.** (1989) Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell.* 59:45-54.
- Van Erp, R., Adorf, M., Van Sommeren, A.P.G. and Gribnau, T.C.J.** (1991) Monitoring of the production of monoclonal antibodies by hybridomas. Part II: Characterization and purification of acid proteases present in cell culture supernatant. *J Biotechnol.* 20:249-261.
- Van Loon, A.P., Ozmen, L., Fountoulakis, M., Kania, M., Haiker, M. and Garotta, G.** (1991) High-affinity receptor for interferon-gamma (IFN-gamma), a ubiquitous protein occurring in different molecular forms on human cells: blood monocytes and eleven different cell lines have the same IFN-gamma receptor protein. *J Leukocyte Biol.* 49:462-473.
- Van Wart, H.E. and Birkedal-Hansen, H.** (1990) The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 87:5578-5582.
- Verbert, A. and Montreuil, J.** (1997) Analyse des glucides et des glycoprotéines *Techniques de l'Ingénieur* P3320:1-28.
- Vilcek, J. and Feldmann, M.** (2004) Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends Pharmacol Sci.* 25:201-209.
- Vogt, W.** (1995) Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med.* 18:93-105.

- Wacker, M., Linton, D., Hitchen, P.G., Nita-Lazar, M., Haslam, S.M., North, S.J., Panico, M., Morris, H.R., Dell, A., *et al.* (2002) N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E.coli*. *Science*. 298:1790-1793.
- Wagner, A., Marc, A., Engasser, J.M. and Einsele, A. (1991) Growth and metabolism of human tumor kidney cells on galactose and glucose. *Cytotechnology*. 7:7-13.
- Walsh, G. and Jefferis, R. (2006) Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotechnol*. 24:1241-1252.
- Wang, Y., Liang, Z.-H., Zhang, Y.-S., Yao, S.-Y., Xu, Y.-G., Tang, Y.-H., Zhu, S.-Q., Cui, D.-F. and Feng, Y.-M. (2001) Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnol Bioeng*. 73:74-79.
- Watanabe, T., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Nagahama, M., Murakami, K. and Nakayama, K. (1992) Sequence requirements for precursor cleavage within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem*. 267:8270-8274.
- Wentz, D. and Schugerl, K. (1992) Influence of lactate, ammonia, and osmotic stress on adherent and suspension BHK cells. *Enzyme Microb Technol*. 14:68-75.
- Wheelock, E.F. (1965) Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science*. 149:310-311.
- Wilmann, M., Gautel, M. and Mayans, O. (2000) Activation of calcium/calmodulin regulated kinases. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 46:883-894.
- Wong, C.-H. (2005) Protein Glycosylation: New Challenges and Opportunity. *J Org Chem*. 70:4219-4225.
- Wong, D.C.F., Wong, K.T.K., Heng, C.K. and Yap, M.G.S. (2005) Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnol Bioeng*. 89:164-177.
- Wong, M.S., Wu, S., Causey, T.B., Bennett, G.N. and San, K.-Y. (2008) Reduction of acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures for increased recombinant protein production. *Metab Eng*. 10:97-108.
- Woo, S.A., Jeon, J.-J., Jeong, Y.-R., Seung, J.L. and Sung, K.Y. (2008) Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. *Biotechnol Bioeng*. 101:1234-1244.
- Woolley, J.F. and Al-Rubeai, M. (2009) The isolation and identification of a secreted biomarker associated with cell stress in serum-free CHO cell culture. *Biotechnol Bioeng*. 104:590-600.
- Wurm, F.M. (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotech*. 22:1393-1398.
- Xie, L., Nyberg, G., Gu, X., Li, H., Mo llborn, F. and Wang, D.I.C. (1997) Gamma-interferon production and quality in stoichiometric fed-batch cultures of Chinese hamster ovary (CHO) cells under serum-free conditions. *Biotechnol Bioeng*. 56:577-582.

- Yan, Q. and Lennarz, W.J.** (1999) Oligosaccharyltransferase: a complex multisubunit enzyme of the endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun.* 266:684-689.
- Yang, M. and Butler, M.** (2000a) Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation. *Biotechnol Bioeng.* 68:370-80.
- Yang, M. and Butler, M.** (2000b) Enhanced erythropoietin heterogeneity in a CHO culture is caused by proteolytic degradation and can be eliminated by a high glutamine level. *Cytotechnology.* 34:83-99.
- Yang, M. and Butler, M.** (2002) Effects of Ammonia and Glucosamine on the Heterogeneity of Erythropoietin Glycoforms. *Biotechnol Prog.* 18:129-138.
- Yoshiro, S., Yasukazu, Y., Takashi, A., Kazuhiko, T. and Etsuo, N.** (2003) Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *J Biol Chem.* 278:39428-39434.
- Yuk, I.H.Y. and Wang, D.I.C.** (2002) Glycosylation by Chinese hamster ovary cells in dolichol phosphate-supplemented cultures. *Biotechnol Appl Biochem.* 36:141-147.
- Zanghi, J.A., Fussenegger, M. and Bailey, J.E.** (1999a) Serum protects protein-free competent chinese hamster ovary cells against apoptosis induced by nutrient deprivation in batch culture *Biotechnol Bioeng.* 64:108-119.
- Zanghi, J.A., Renner, W.A., Bailey, J.E. and Fussenegger, M.** (2000) The growth factor inhibitor suramin reduces apoptosis and cell aggregation in protein-free CHO cell batch cultures. *Biotechnol Prog.* 16:319-325.
- Zanghi, J.A., Schmelzer, A.E., Mendoza, T.P., Knop, R.H. and Miller, W.M.** (1999b) Bicarbonate concentration and osmolality are key determinants in the inhibition of CHO cell polysialylation under elevated pCO₂ or pH. *Biotechnol Bioeng.* 65:182-191.
- Zhang, J., Robinson, D. and Salmon, P.** (2006) A novel function for selenium in biological system: Selenite as a highly effective iron carrier for Chinese hamster ovary cell growth and monoclonal antibody production. *Biotechnol Bioeng.* 95:1188-1197.
- Zhang, J. and Robinson, D.K.** (2005) Development of animal-free, protein-free and chemically-defined media for NS0 cell culture. *Cytotechnology.* 48:59-74.
- Zhang, K. and Kaufman, R.J.** (2006) The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology.* 66:S102-109.
- Zhu, L., Van de Lavoie, M.C., Albanese, J., Beenhouwer, D.O., Cardarelli, P.M. and Cuisin, S.e.a.** (2005) Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat Biotechnol.* 23:1159-1169.
- Zoon, K.** (2003) To manufacturers of biological products. Center for Biologics Evaluation and Research.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Madame Véronique CHOTTEAU, Directeur de Recherche, Albanova University Center,
Stockholm, Suède**

Monsieur Jean-Jacques SCHNEIDER, Professeur, UCLouvain, Louvain la Neuve, Belgique

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame CLINCKE Marie-Françoise

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Influence des conditions de culture sur la quantité et la qualité de l'IFN- γ recombinant
produit par les cellules CHO au cours de procédés discontinus"**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés Biotechnologiques et Alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 28 juin 2010

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE SUR LA QUANTITE ET LA QUALITE DE L'IFN- γ RECOMBINANT PRODUIT PAR DES CELLULES CHO AU COURS DE PROCÉDES DISCONTINUS

Au cours de cette étude, nous avons approfondi nos connaissances concernant l'effet des conditions de culture sur la quantité et la qualité d'une protéine recombinante produite par des cellules CHO. En particulier, nous avons étudié l'influence de 3 composés (citrate de fer, pluronic F-68 et éthanolamine) présents dans le milieu BDM mais absent du milieu RPMI avec sérum (FCS-RPMI) sur la croissance des cellules CHO, la production de l'interféron-gamma humain recombinant (IFN- γ) ainsi que sa qualité.

L'ajout de pluronic F-68 (0,1%) et de citrate de fer (500 μ M) dans le milieu RPMI sans sérum a permis d'obtenir une croissance cellulaire comparable à celle obtenue avec le milieu FCS-RPMI. Par ailleurs, dans ces conditions de culture, la production de l'IFN- γ est également augmentée. L'ajout de citrate de fer dans le milieu FCS-RPMI permet non seulement d'améliorer la croissance des cellules CHO mais également la production de l'IFN- γ . Avec le milieu FCS-RPMI, la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ change au cours du procédé discontinu, cette dernière est maintenue constante uniquement lorsque du citrate de fer est ajouté à ce même milieu de culture. En outre, des activités gélatinase et caséinase appartenant aux familles des métalloprotéases et des protéases à sérine ont été mises en évidence au cours des cultures de cellules CHO. Quel que soit le milieu utilisé (RPMI, BDM avec ou sans sérum), l'ajout de citrate de fer permet de maîtriser et d'éviter la protéolyse de l'IFN- γ . Enfin, la relation entre le degré de glycosylation macroscopique de l'IFN- γ et son activité biologique (immunomodulatrice) *in-vitro* a été établie.

Mots-clés : cellules CHO, milieux de culture, citrate de fer, pluronic F-68, éthanolamine, IFN- γ , glycosylation.

EFFECT OF CULTURE CONDITIONS ON THE QUANTITY AND THE QUALITY OF RECOMBINANT IFN- γ PRODUCED BY CHO CELLS DURING BATCH PROCESSES

In this study, we characterized the effect of culture conditions on the quantity and the quality of a recombinant protein, IFN- γ , produced by CHO cells. In particular, we studied the effect of 3 components (iron citrate, pluronic F-68 and ethanolamine) that are present in the BDM medium, but completely lacking in RPMI serum medium (FCS-RPMI) on CHO cell growth, as well as the production and quality of recombinant IFN- γ .

The addition of Pluronic F-68 (0.1%) and iron citrate (500 μ M) in RPMI without serum resulted in growth kinetic performances similar to those observed in FCS-RPMI. Furthermore, in these culture conditions, IFN- γ production was improved. Addition of iron citrate in FCS-RPMI improved cell growth, as well as IFN- γ production. Whereas the glycosylation pattern of recombinant IFN- γ produced by CHO cells was not constant when the culture was performed in FCS-RPMI, the glycosylation pattern of IFN- γ remained constant when iron citrate was added in the medium. In addition, gelatinase and caseinase enzymatic activities in CHO batch cultures were detected, due most likely to enzymes of the metalloproteases and serine protease families. Despite the type of medium used (RPMI, BDM with or without serum), addition of iron citrate minimized IFN- γ proteolysis. Finally, the relationship between the macroglycosylation pattern of IFN- γ and its *in-vitro* biological (immunomodulatory) activity was demonstrated.

Key words : CHO cells, culture medium, iron citrate, pluronic F-68, ethanolamine, IFN- γ , glycosylation.