



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>

UNIVERSITE DE LORRAINE (UdL)

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA)

Ecole doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP)

THESE

Présentée à l'Université de Lorraine par

Mathilde MOSSER

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

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

**INTERET DES HYDROLYSATS DE LEVURE DANS LES PROCEDES DE
CULTURE DE CELLULES CHO PRODUCTRICES D'ANTICORPS : ANALYSE
CINETIQUE, FRACTIONNEMENTS ET CARACTERISATION DES COMPOSES
ACTIFS**

Soutenue publiquement le 1^{er} Octobre 2012 devant la commission d'examen

Membres du jury

Président du jury :	Francine FAYOLLE	Professeur, ONIRIS, GEPEA, Nantes
Rapporteurs :	Yves-Jacques SCHNEIDER	Professeur, UCL, Louvain-la-Neuve
	Jean-Luc SIMON	Directeur R&D, Ingredia Group, Arras
Examineurs :	Annie MARC	Directeur de recherche, CNRS, LRGP, Nancy
	Isabelle CHEVALOT	Professeur, UdL, LRGP, Nancy
	Romain KAPEL	Maître de conférences, UdL, LRGP, Nancy
Invités :	Eric ORIOL	Directeur R&D, Bio Springer, Maisons Alfort
	Eric OLMOS	Maître de conférences, UdL, LRGP, Nancy
	Ivan MARC	Directeur de recherche, CNRS, LRGP, Nancy

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je remercie M. Gabriel WILD, directeur du Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP, *Nancy*), ainsi que M. Michel SARDIN ancien directeur, pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire. De même, j'adresse toute ma gratitude aux nombreuses personnes de l'équipe Bioprocédés – Biomolécules du LRGP et de l'entreprise Bio Springer (*Maisons Alfort*) qui ont contribué à l'élaboration de mon projet de thèse CIFRE et qui m'ont fait confiance pour le mener à bien.

Plus particulièrement, je remercie ma directrice de thèse, Mme. Annie MARC (LRGP), de m'avoir encadrée et inculqué sa rigueur scientifique. De même, je remercie mes co-directeurs de thèse : M. Ivan MARC (LRGP) pour son intransigeance et Mme. Isabelle CHEVALOT (LRGP) pour ses conseils scientifiques, sa disponibilité et son professionnalisme qui m'ont guidée durant toute ma thèse. Je remercie également M. Romain KAPEL (LRGP) pour son implication scientifique et technique, mais aussi pour m'avoir aidée à poursuivre ma formation à la recherche par un ATER. Enfin, je remercie M. Eric OMLOS (LRGP) pour son encadrement au quotidien, ses conseils humains et scientifiques, sa réactivité et son soutien.

D'autre part, je remercie M. Eric ORIOL (Bio Springer) d'avoir suivi mes travaux de thèse, ainsi que Mme. Iris BESANCON (Bio Springer) et Mme. Dominique DRUAUX (Bio Springer). Un merci particulier à M. Michel BONANNO (Bio Springer) pour m'avoir initiée aux différentes techniques analytiques permettant de percer les secrets des hydrolysats de levure, mais surtout pour m'avoir communiqué son enthousiasme de la science.

Plus généralement, je remercie mes différents collègues qui ont participé à ma formation à la recherche : Fabrice, Xavier, Christelle et Cédric. Un merci particulier à Arnaud pour son investissement dans la partie fractionnement de mes travaux de thèse, sa réactivité, mais surtout sa gentillesse si constante. De même, j'exprime ma reconnaissance à mon stagiaire Paul pour sa motivation, son ingéniosité et le travail efficace qu'il a fourni durant son stage. Je remercie mes collègues de culture de cellules animales : Emma, Frédérique, Marie-Françoise, Caroline et Amal, la dernière recrue. Au quotidien, j'ai apprécié nos échanges scientifiques (si, si, il y en a eu quelques uns en y réfléchissant), mais surtout humains qui ont été un réel socle de ma vie nancéienne et m'ont permis

d'exorciser bien des démons... Une pensée particulière également à Françoise, Claudia, Laial, Bambou, Budur, Florent, Nidal, Floriant et Karim, je vous remercie pour tous ces bons moments partagés qui m'ont donné du "pepse" au quotidien.

Mes pensées vont aussi vers mes amis proches, qui m'ont accompagnée et soutenue durant tout ce périple. Je pense à mes amies nancéiennes : Julie et nos échappées gastronomiques et sensibles ; Natalia et nos petits apéros ; Fanfan, M-F, Guillaume, Eléonore et nos sorties culturelles, mais pas trop... Je pense à mes amis strasbourgeois : Marjo, Pauline, Julien, Guillaume et nos resto, nos virées en ville, à la campagne, à la mer (il nous manque la montagne...), mais aussi à toute la "team" des amis du cuir (Ben, Marie, Enver...) pour les soirées endiablées sur le "dancefloor". Je pense à mes amis UTCéens : Tomtom, Alex, Ludo, Soline, Tibo et nos fous rires à Lille ou Reims qui me rappellent ma folle jeunesse étudiante. Je pense à mes amis lyonnais : Véro, Michaëla, Sabine, Christophe et mes escapades ensoleillées et créatives. Tous, je vous remercie pour votre présence, votre générosité pour me soutenir (supporter) dans mes moments de doute et partager tous ces petits instants de joie. Je pense aussi à ceux que j'ai perdus de vue à cause des aléas de la vie (Coralie, Joséphine, Wenyan, Delphine, Joul, Tatiana, Lazare...), j'espère que je vous recroiserai vite !

Mes pensées vont vers ma famille : mes tantes, mes oncles, mes cousins, mes cousines, pépère, Papachine et Noun. Une pensée particulière pour Benoit et Marie, mes cousins qui nourrissent mes idées avec tellement de bienveillance. Un merci incommensurable pour mon papa : ton soutien, ton écoute, ta disponibilité, tes conseils, ta bienveillance me remplissent d'énergie, de courage et m'accompagnent dans toutes les épreuves de la vie. De même, je te remercie maman, pour toute ton énergie, ta présence, ton aide et ton originalité ; merci pour cet énorme soutien que tu m'as apporté dans les moments difficiles. Enfin, je remercie ma petite sœur d'être aussi géniale ! Douce, sensible, forte et gaie, tu es mon petit rayon de soleil.

Pour finir, mes pensées vont vers Thomas qui m'a accompagnée tout au long de ma thèse. Je te dédie ce travail en témoignage de cette période riche en émotion.

SOMMAIRE GENERAL

INTRODUCTION GENERALE	1
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
1- PROCEDES DE CULTURE DE CELLULES DE MAMMIFERES POUR LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX RECOMBINANTS.....	13
2- STRATEGIES DE CONDUITE DES PROCEDES DE CULTURE POUR AMELIORER LES PERFORMANCES CELLULAIRES	35
3- INFLUENCE DES HYDROLYSATS SUR LES PERFORMANCES DU PROCEDE DE CULTURE DE CELLULES ANIMALES.....	55
4- FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS ET CARACTERISATION DES MOLECULES D'INTERET.....	70
MATERIEL ET METHODES	87
1- CULTURE DES CELLULES	90
2- PROCEDES DE FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT DE LEVURE	107
3- CARACTERISATION DES HYDROLYSATS DE LEVURE ET DES FRACTIONS	115
RESULTATS ET DISCUSSION	119
CHAPITRE 1: COMPARAISON DE L'INFLUENCE DE DIVERS HYDROLYSATS DE LEVURE SUR LA CULTURE DE CELLULES CHO PRODUCTRICES D'ANTICORPS	121
1- INTRODUCTION	124
2- INFLUENCE DE LA COMPOSITION ET DE LA CONCENTRATION DES HYDROLYSATS DE LEVURE EN FIOLE D'ERLENMEYER.....	125
3- INFLUENCE DE L'AJOUT DE GLUCOSE, DE GLUTAMINE OU DE MELANGES D'HYDROLYSATS EN COURS DE CULTURE EN FIOLE D'ERLENMEYER.....	141
4- INFLUENCE DE L'AJOUT DE MELANGES D'HYDROLYSATS DE LEVURE : COMPARAISONS ENTRE FIOLE ET REACTEUR CONTROLE.....	148
5- CONCLUSION DU CHAPITRE 1	168
CHAPITRE 2: NATURE BIOCHIMIQUE DES COMPOSES ACTIFS DE L'EXTRAIT DE LEVURE FRACTIONNE PAR NANOFILTRATION	171
1- INTRODUCTION	174
2- COMPOSES DE L'EXL IMPLIQUES DANS LA REPONSE DE CELLULES CHO RECOMBINANTES	175
3- SYNERGIE DES MOLECULES DE FAIBLES ET HAUTS POIDS MOLECULAIRES CONTENUES DANS L'EXL.....	194
4- CONCLUSION DU CHAPITRE 2	199
CHAPITRE 3: FRACTIONNEMENTS CHROMATOGRAPHIQUES POUR LA CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES COMPOSES ACTIFS DE L'EXTRAIT DE LEVURE.....	201
1- INTRODUCTION	204

2- FRACTIONNEMENTS CHROMATOGRAPHIQUES DE L'EXTRAIT DE LEVURE: UNE STRATEGIE POUR IDENTIFIER LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES COMPOSES FAVORISANT LA CULTURE DE CELLULES CHO	205
3- VALIDATION DE L'ACTIVITE DE LA FRACTION SELECTIONNEE EN CULTURE AGITEE 228	
4- CONCLUSION DU <i>CHAPITRE 3</i>	230
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	233
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	245

ABREVIATIONS

α -KG	α -cétoglutarate
AcM	Anticorps monoclonaux
ADN	Acide désoxyribonucléique
AEC	Anion exchange chromatography
Ala	Alanine
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BDM	Milieu de culture chimiquement défini et sans protéine
CDR	Complementary Determining Regions
CLBP	Chromatographie liquide basse pression
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
DHFR	Dihydrofolate réductase
EI	Echange d'ions
EMA	Agence européenne de médicaments
EXL	Extrait de levure
FDA	Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux
G-6-P-DH	Glucose-6-Phosphate déshydrogénase
Glc	Glucose
Gln	Glutamine
Gly	Glycine
GMP	Guanosine monophosphate
GS	Glutamine synthétase
HEK-293	Lignée cellulaire issue de rein d'embryon humain
HIC	Hydrophobic interaction chromatography
His	Histidine
HK	Hexokinase
IgG	Immunoglobuline G
IH	Interactions hydrophobes
Lac	Lactate

LDH	Lactate déshydrogénase
LRGP	Laboratoire de réactions et génie des procédés
Lys	Lysine
MDH	Malate déshydrogénase
MM	Masse molaire
MRC-5	Lignée cellulaire de fibroblaste embryonnaire humain
MSX	Méthionine sulfoximide
MTX	Méthotrexate
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADP ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NH ₄	Ions ammonium
NSO	Myélome de souris
nYE	Nanofiltrated yeast extract
OAA	Oxaloacétate
P.A	Peptone A
P.B	Peptone B
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PDK	Pyruvate déshydrogénase kinase
PEP	Phosphoénol pyruvate
PER-C6	Lignée cellulaire issue de rétine d'embryon humain
Phe	Phénylalanine
PM	Poids moléculaire
PPP	Voie des pentoses phosphates
PI	Phase inverse
Q	Quaternary ammonium
RPMI 1640	Milieu de culture « Roswell park memorial institute »
S	Méthyl sulphonate
SEC	Size exclusion chromatography
Ser	Sérine
SP	Sulphopropyl
Sp2/0	Myélome de souris

SVF	Sérum de veau fœtal
TCA	Cycle des acides tricarboxyliques
TFA	Acide trifluoroacétique
Tyr	Tyrosine
Thr	Thréonine
YE	Yeast extract

NOMENCLATURE

π_{IgG}	Vitesse spécifique de production d'IgG	$\mu\text{g}/10^6 \text{ cellules/h}$
μ	Vitesse spécifique de croissance	h^{-1}
IgG_{max}	Concentration maximale d'IgG	mg/L
ICV	Intégrale des cellules viables	$10^8 \text{ cellules.h/mL}$
q_{Glc}	Vitesse spécifique de consommation de glucose	$\mu\text{mol}/10^6 \text{ cellules/h}$
q_{Gln}	Vitesse spécifique de consommation de glutamine	$\mu\text{mol}/10^6 \text{ cellules/h}$
q_{Lac}	Vitesse spécifique de production de lactate	$\mu\text{mol}/10^6 \text{ cellules/h}$
q_{NH_4}	Vitesse spécifique de production d'ions ammonium	$\mu\text{mol}/10^6 \text{ cellules/h}$
X_{max}	Concentration maximale de cellules viables	10^6 cellules/mL
$Y_{\text{Cellule/Glc}}$	Rendement en cellules par rapport au glucose	$\text{cellules}/\mu\text{mol}$
$Y_{\text{Cellule/Gln}}$	Rendement en cellules par rapport à la glutamine	$\text{cellules}/\mu\text{mol}$
$Y_{\text{Lac/Glc}}$	Rendement en lactate par rapport au glucose	mol/mol
$Y_{\text{NH}_4/\text{Gln}}$	Rendement en ammonium par rapport à la glutamine	mol/mol
$Y_{\text{IgG/cellule}}$	Rendement en IgG par rapport aux cellules viables	pg/cellule

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Le développement rapide des biotechnologies a considérablement fait évoluer l'industrie pharmaceutique vers les biopharmacies pour la production de molécules thérapeutiques par voie biologique. En effet, celles-ci représentaient déjà 16 % des bénéfices de l'industrie pharmaceutique en générant 94 milliards de dollars en 2007, et, aujourd'hui, plus de 200 produits biopharmaceutiques ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (Walsh, 2010). Ces médicaments sont principalement des protéines recombinantes impliquées dans les traitements du cancer, du diabète, de la déficience de croissance, de l'hémophilie, des hépatites et autres maladies auto-immunes. Parmi ces protéines recombinantes, la spécificité, la sélectivité et l'activité biologique des anticorps monoclonaux (AcM) en ont fait des cibles thérapeutiques de choix. Ainsi, avec près de 25 AcM disponibles sur le marché, ils représentent environ 40 % des bénéfices issus des biopharmacies (Walsh, 2010). D'après les prévisions, leur part de marché devrait continuer à croître et atteindre un chiffre d'affaire de 70 milliards de dollars en 2015 (Chon & Zarbis-Papastoitsis, 2011). Cependant, afin de pérenniser l'usage thérapeutique des AcM, le développement de procédés mieux maîtrisés et optimisés représente l'un des défis majeurs de l'industrie biopharmaceutique.

De nos jours, les cellules CHO sont les plus couramment utilisées pour la production des AcM recombinants (de Jesus & Wurm, 2011). Capables d'effectuer les maturations post-traductionnelles nécessaires à leur activité biologique, les cellules CHO présentent aussi l'avantage d'être adaptées à la culture en suspension et d'être relativement robuste pour supporter les conditions de culture dans des bioréacteurs agités à grande échelle. Initialement ces cellules étaient cultivées en présence de fractions plasmatiques, de sérum ou d'extraits de tissus animaux. Mais, du fait de la grande variabilité lot-à-lot, le développement de milieux de culture de base chimiquement définis s'est accru pour réduire la quantité de sérum et ainsi standardiser les conditions de culture. Cependant, depuis les années 1990, il a été montré que toute substance d'origine animale peut être la source de contamination par des virus, prions ou mycoplasmes potentiellement transmissibles à l'homme (Grillberger et *al.*, 2009). Depuis, la formulation de milieux de culture sans molécules d'origine animale est fortement recommandée par les autorités réglementaires.

De nombreuses études ont montré le potentiel d'hydrolysats d'origine végétale ou levurienne pour améliorer les performances de cultures de cellules animales (Burteau et *al.*, 2003 ; Farges et *al.*, 2008 ; Franek & Katinger, 2002 ; Sung et *al.*, 2004). Néanmoins, ce potentiel varie selon les systèmes de culture mis en œuvre, la composition des hydrolysats et leurs conditions de supplémentation. Il est donc difficile de prédire, a priori, le bénéfice des hydrolysats sur un procédé de culture. De plus, issus de l'hydrolyse de matière biologique, ces additifs sont complexes, incomplètement définis et variables de lot-à-lot. Leur ajout dans le milieu de culture peut ainsi mettre en cause la reproductibilité et la fiabilité des procédés de culture. La tendance actuelle est donc d'envisager des suppléments de culture de mieux en mieux caractérisés, voire totalement définis et sans protéines. Il serait donc intéressant de mieux caractériser les molécules d'intérêt contenues dans ces hydrolysats, afin de mieux comprendre leur rôle dans le procédé de culture et de pouvoir développer des suppléments simplifiés. Nos travaux de thèses s'inscrivent dans ces problématiques.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés dans le cadre d'une convention CIFRE entre le laboratoire de réactions et génie des procédés, laboratoire CNRS, et l'entreprise Bio Springer, leader mondial de la production d'hydrolysats de levure. L'objectif général était d'améliorer notre connaissance et mieux comprendre l'intérêt des hydrolysats de levure dans les procédés de culture de cellules CHO productrices d'AcM.

Dans ce contexte, différentes questions scientifiques ont motivé notre démarche :

- *Les hydrolysats de levure présentent-ils des effets dépendants de leurs conditions d'utilisation ?*
- *Quelles sont les principales influences des hydrolysats de levure sur les cinétiques d'un procédé de culture ?*
- *Est-il possible de mieux déterminer la nature biochimique et le rôle des composés actifs des hydrolysats de levure ?*
- *Comment caractériser les propriétés physico-chimiques des composés actifs d'hydrolysats de levure par fractionnements chromatographiques ?*

Pour répondre à ces questions, la démarche globale développée au cours de la thèse peut être résumée par la Figure 1. Elle intègre des études cinétiques conduites dans différents systèmes de culture, diverses stratégies de fractionnement et de la caractérisation biochimique des hydrolysats et de leurs fractions.

- L'étude de l'influence des mélanges de molécules (hydrolysats de levure ou fractions) a d'abord été réalisée sur les performances de culture (concentrations maximales de cellules et d'AcM) pour caractériser et comparer les effets. Puis, ces effets ont été approfondis avec des études cinétiques détaillées des cultures (production d'AcM, croissance, mort et métabolisme cellulaire).
- Un hydrolysat de levure a été fractionné par des procédés de séparation membranaire ou chromatographiques pour isoler de manière sélective des mélanges de molécules selon leurs principales propriétés physico-chimiques : taille, charge électrique et hydrophobie.
- L'analyse biochimique des mélanges de molécules a permis de préciser leur contenu en acides aminés, peptides, mono et disaccharides, bases azotés et vitamines. De plus, les macromolécules ont été hydrolysées pour analyser la répartition de la matière protéique, glucidique et nucléique contenue dans les hydrolysats levuriens.

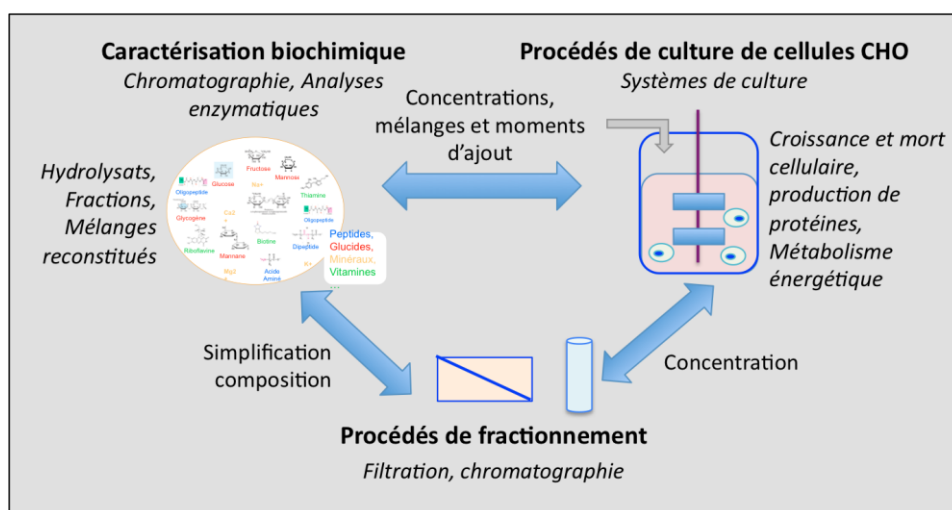


Figure 1. Stratégie globale développée au cours de la thèse.

Ce manuscrit de thèse est construit en cinq principales parties: une analyse bibliographique, les matériels et méthodes et les trois chapitres de résultats. Une conclusion générale et des perspectives sont proposées en fin de document.

Dans la première partie, une analyse bibliographique, positionne les travaux de la thèse. Dans un premier chapitre, les procédés de culture de cellules animales, leurs principaux défis et, plus particulièrement ceux liés à la formulation des milieux de culture, sont

présentés. Dans un deuxième chapitre, l'interaction entre la composition du milieu de culture et la réponse cellulaire est abordée afin de mieux appréhender le rôle des molécules qui composent les milieux de culture de base. Puis, dans un troisième chapitre, les différents travaux mettant en évidence le bénéfice des hydrolysats dans un procédé de culture de cellules animales sont présentés. Finalement, dans un dernier chapitre, les travaux portant sur la nature et le rôle des molécules des hydrolysats impliquées dans la réponse cellulaire sont analysés.

La deuxième partie décrit les matériels et les méthodes mis en œuvre au cours de la thèse. Elle intègre la mise en culture des cellules, les diverses méthodes d'analyse ainsi que les procédés de fractionnement.

Le premier chapitre de résultat compare l'influence de trois hydrolysats de levure et étudie leurs conditions d'utilisation (concentration, mélange, moment d'ajout, ajout de substrats supplémentaires) sur les paramètres cinétiques de la culture de cellules CHO. Des cultures discontinues ont été mises en œuvre en fiole d'Erlenmeyer ou en bioréacteur.

Le second chapitre de résultats discute de la nature biochimique et du rôle des composés actifs de l'extrait de levure (EXL). Pour cette étude, un procédé de nanofiltration membranaire a été utilisé pour fractionner les molécules de l'EXL de poids moléculaire (PM) inférieur et supérieur à 500 Da. De plus, certaines familles de biomolécules (acides aminés et glucides) ont été reconstituées. Finalement, la synergie des molécules de faible et haut PM a été étudiée. Ces études ont également été réalisées avec des cultures discontinues de cellules CHO en fiole d'Erlenmeyer.

Le troisième chapitre de résultat présente des stratégies de fractionnement chromatographique pour la caractérisation physico-chimique des composés actifs de l'EXL. Ces procédés de fractionnement, individuels ou séquentiels proposent d'isoler les composés de l'EXL nanofiltré selon leur charge électrique, leur hydrophobie et leur PM. Dans ce cas, ce sont des cultures discontinues en microplaque qui ont été réalisées pour comparer l'activité de l'EXL nanofiltré et des fractions chromatographiques. De plus, des cultures discontinues de cellules CHO en fiole d'Erlenmeyer ont été réalisées pour valider l'activité d'une fraction.

Enfin, la conclusion générale fait un état des lieux des principaux résultats qui découlent des travaux de la thèse et des perspectives sont proposées pour confirmer, valider et approfondir ce travail.

Analyse bibliographique

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1- PROCÉDES DE CULTURE DE CELLULES DE MAMMIFÈRES POUR LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX RECOMBINANTS	13
1.1- CONTEXTE GÉNÉRAL DES BIOPHARMACIES	13
1.2- PRODUCTION INDUSTRIELLE D'AcM	14
1.2.1- Structure des anticorps	14
1.2.2- Vers les AcM recombinants	16
1.2.3- Systèmes d'expression pour la production d'AcM recombinants	17
1.3- PROCÉDES DE CULTURE DE CELLULES DE MAMMIFÈRES	21
1.3.1- Culture de cellules adhérentes ou en suspension	21
1.3.2- Systèmes de culture	22
1.3.3- Modes d'alimentation	24
1.3.4- Paramètres opératoires physico-chimiques	25
1.3.5- Milieux de culture	26
1.4- CONCLUSION	33
2- STRATÉGIES DE CONDUITE DES PROCÉDES DE CULTURE POUR AMÉLIORER LES PERFORMANCES CELLULAIRES	35
2.1- MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE	35
2.1.1- Principales voies du métabolisme énergétique	36
2.1.2- Stratégie pour influencer le métabolisme énergétique et les performances de culture	40
2.2- MORT DES CELLULES EN BIOREACTEUR	46
2.2.1- Mécanismes de mort des cellules de mammifères	47
2.2.2- Stratégies pour ralentir les phénomènes de la mort cellulaire en bioréacteur	48
2.3- CROISSANCE CELLULAIRE ET PRODUCTION DE PROTÉINES RECOMBINANTES	51
2.3.1- Cycle cellulaire	51
2.3.2- Synthèse des protéines	52
2.4- CONCLUSION	54
3- INFLUENCE DES HYDROLYSATS SUR LES PERFORMANCES DU PROCÉDE DE CULTURE DE CELLULES ANIMALES	55
3.1- HYDROLYSATS UTILISÉS EN CULTURE DE CELLULES ANIMALES	55
3.1.1- Matières premières des hydrolysats	55
3.1.2- Procédés de production des hydrolysats	56
3.1.3- Caractérisation des hydrolysats	56
3.2- INFLUENCE DE L'AJOUT D'HYDROLYSATS DANS UN PROCÉDE DE CULTURE CELLULAIRE	59
3.2.1- Croissance cellulaire et production d'anticorps recombinants	59
3.2.2- Influence des hydrolysats sur le métabolisme énergétique	62
3.3- STRATÉGIE D'APPORT DES HYDROLYSATS DANS LES CULTURES	64
3.3.1- Effet de la concentration de l'hydrolysate	64
3.3.2- Effet de la combinaison de plusieurs hydrolysats	65
3.3.3- Moment de l'ajout de l'hydrolysate	66
3.4- CONTRAINTES LIÉES À L'UTILISATION D'HYDROLYSATS	66
3.5- CONCLUSION	68
4- FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS ET CARACTÉRISATION DES MOLECULES D'INTERET	70
4.1- PROCÉDES DE FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS	70
4.1.1- Fractionnement par filtration membranaire	70
4.1.2- Fractionnement par précipitation	73
4.1.3- Fractionnement par chromatographie	74
4.1.4- Conclusion	79

4.2- MOLECULES ACTIVES DES HYDROLYSATS.....	81
4.2.1- <i>Peptides et acides aminés</i>	81
4.2.2- <i>Autres molécules</i>	83
4.3- CONCLUSION	84

1- Procédés de culture de cellules de mammifères pour la production d'anticorps monoclonaux recombinants

1.1- Contexte général des biopharmacies

Les produits biopharmaceutiques sont des substances utilisées à des fins thérapeutiques ou de diagnostic. Elles sont produites industriellement par des procédés biotechnologiques utilisant des cellules procaryotes ou eucaryotes et ne sont donc pas issues de l'extraction directe d'une source biologique native. Ainsi, un produit biopharmaceutique peut être une protéine recombinante, mais également un acide nucléique ou une entité vivante dont la virulence a été atténuée (Zhu, 2011).

En 1982, l'insuline humaine, développée par Genentech et produite par Eli Lilly & Co, a été la première protéine recombinante à obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour un usage thérapeutique par l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) et l'agence européenne de médicaments (EMA). L'insuline recombinante humaine a remplacé celle extraite à partir de tissus animaux utilisée jusqu'alors. Elle a ainsi amélioré la sécurité sanitaire, mais également la tolérance des patients au traitement. Depuis, le développement rapide des biotechnologies a considérablement fait évoluer l'industrie pharmaceutique vers les biopharmacies. En 2007, celles-ci représentaient déjà 16 % des bénéfices de l'industrie pharmaceutique en générant 94 milliards de dollars (Walsh, 2010). De même, plus de 200 produits biopharmaceutiques ont aujourd'hui obtenu une AMM témoignant ainsi du dynamisme de ce secteur (Walsh, 2010). La majorité de ces médicaments est destinée à un usage thérapeutique ; seule une faible proportion de ceux-ci est utilisée pour le diagnostic (Carter, 2011). Ces médicaments sont principalement impliqués dans les traitements du cancer, du diabète, de la déficience de croissance, de l'hémophilie, des hépatites et autres maladies auto-immunes.

La grande majorité des produits biopharmaceutiques actuellement sur le marché sont des protéines recombinantes. En effet, lors de ces 8 dernières années, un seul des 80 produits biopharmaceutiques ayant obtenu une AMM était à base d'acides nucléiques les autres biomolécules étant des protéines recombinantes (Walsh, 2006 ; Walsh, 2010). Ces dernières, de fonctions variées, englobent les hormones, les facteurs de croissance, les anticorps monoclonaux (AcM), les sous unités de vaccins, les protéines de fusion, les

enzymes thérapeutiques et d'autres protéines régulatrices. La spécificité et la sélectivité des AcM ainsi que leur activité biologique en ont fait des cibles thérapeutiques et diagnostiques de choix. En effet, ces caractéristiques permettent aux AcM d'être utilisés non seulement, pour reconnaître un organisme pathogène (bactérie, cellule cancérigène) ou une toxine et induire leur destruction par l'activation du système immunitaire, mais également, pour bloquer ou activer des réactions clefs de certaines pathologies. De même, le couplage des AcM à des molécules effectrices comme des toxines, des radio-isotopes ou des enzymes permet la destruction d'organismes pathogènes ciblés sans faire intervenir le système immunitaire (Gerber, 2008; Jefferis, 2009). Ainsi, avec près de 25 AcM disponibles sur le marché pour soigner principalement le cancer et les maladies auto-immunes, le marché des AcM représente environ 40 % des bénéfices issus des biopharmacies (Walsh, 2010). D'après les prévisions, la place des AcM dans les biopharmacies devrait continuer à croître et atteindre un chiffre d'affaire de 70 milliards de dollars en 2015 (Chon & Zarbis-Papastoitsis, 2011).

1.2- Production industrielle d'AcM

1.2.1- Structure des anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines de la superfamille des immunoglobulines formées de 4 chaînes polypeptidiques comprenant deux chaînes lourdes et deux chaînes légères qui sont reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures (Figure 2). Leur structure générale a été décrite pour la première fois en 1959 par Porter (Porter, 1959). Les premières expériences montrèrent que la digestion des anticorps par de la papaïne permettait de libérer trois fragments actifs (2 Fab et Fc). Les fragments Fab, comprenant la chaîne légère ainsi que la portion N-terminale de la chaîne lourde, permettent la liaison aux antigènes, alors que les fragments Fc, composés de la partie C-terminale de la chaîne lourde, activent les cellules du système immunitaire (Nimmerjahn & Ravetch, 2008). Les chaînes lourdes et légères ont un poids moléculaire (PM) respectifs de 50 et 25 kDa, ce qui confère aux anticorps un PM global d'environ 150 kDa (Chartrain & Chu, 2008). Chaque chaîne lourde est composée de trois domaines constants et d'un domaine variable, tandis que chaque chaîne légère comporte un domaine constant et un domaine variable. La spécificité des anticorps dépend de la séquence en acides aminés de sites spécialisés appelés CDR (Complementary Determining Regions) présents dans les domaines variables des chaînes lourdes et légères. Le site spécifique de l'interaction anticorps/

antigène est désigné par le terme paratope. Le récepteur de l'antigène reconnu par le paratope est appelé épitope. Les anticorps présentent une glycosylation sur la partie constante des chaînes lourdes qui peut varier d'un anticorps à un autre. Selon la nature du polysaccharide, l'affinité de l'interaction entre la partie constante de l'anticorps et les récepteurs des cellules du système immunitaire varie (Jefferis, 2005). Une absence de glycosylation sur le fragment Fc altère sévèrement les mécanismes d'action des cellules effectrices du système immunitaire (Jefferis, 2009).

Les anticorps sont subdivisés en classes selon la structure des domaines constants des chaînes lourdes : les chaînes γ , α , μ , ϵ et δ correspondent respectivement aux immunoglobulines IgG, IgA, IgM, IgE et IgD. Il existe également des sous-classes d'immunoglobulines, reflétant des différences plus fines entre les chaînes lourdes. L'homme possède ainsi quatre sous-classes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) et deux sous-classes d'IgA (IgA1 et IgA2). Chaque classe et sous-classe de l'anticorps exprime un profil unique de fonctions effectrices (Burton & Woof, 1992). Il existe également des isotypes de chaînes légères, celles-ci pouvant être κ ou λ . Les IgG correspondent à la classe d'anticorps la plus abondante dans le sang. Tous les anticorps monoclonaux actuellement sur le marché sont des IgG et plus particulièrement de sous classe 1 (Reichert, 2011).

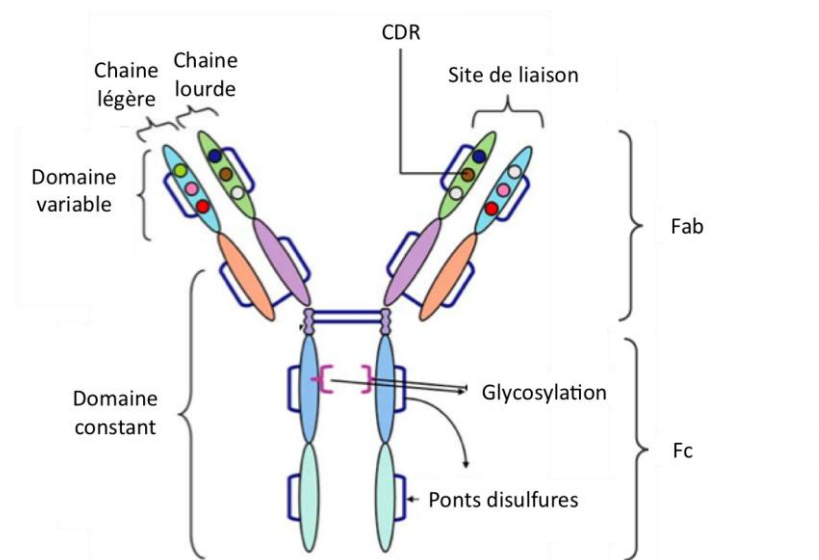


Figure 2. Structure générale des anticorps comprenant deux chaînes légères avec un domaine variable et constant et deux chaînes lourdes avec un domaine variable et trois domaines constants (Chartrain & Chu, 2008).

1.2.2- Vers les AcM recombinants

Traditionnellement, les anticorps étaient produits à la suite de l'immunisation répétée de souris ou d'autres mammifères avec un antigène ciblé. Les organismes développent une forte réponse immunitaire qui génère la production de cellules lymphocytes B sécrétrices d'anticorps spécifiques de cet antigène. Cependant, la population des anticorps produits est hétérogène pour plusieurs épitopes de l'antigène (anticorps polyclonaux). L'isolation d'un clone de lymphocyte B permet la production d'un AcM, mais ces cellules ne peuvent pas se répliquer à long terme. La production stable d'AcM spécifique d'un épitope ciblé n'a été possible qu'en 1975 grâce à la technique des cellules hybrides (Kohler & Milstein, 1975). Ces cellules, appelées hybridomes, sont issues de cellules de myélome murin immortalisées et de lymphocytes B de souris immunisées avec un antigène ciblé. Cette technique est à l'origine du premier AcM murin destiné à un usage thérapeutique qui a obtenu une AMM en 1986 (Tableau 1). Cependant, l'utilisation in vivo des AcM murins à des fins de diagnostic et de thérapie a été freinée par la faible fixation de ces anticorps sur les récepteurs humains et par leur immunogénicité. Les progrès en biologie moléculaire dans les années 1980 et l'élucidation de la structure des anticorps ont alors permis de créer successivement des AcM chimériques humain/souris, des AcM humanisés puis des AcM humains afin d'améliorer leur efficacité (Siberil et *al.*, 2005 et Figure 3).

Les AcM chimériques possèdent les domaines variables d'origine murine et les domaines constants d'origine humaine, les AcM humanisés détiennent uniquement les parties CDR d'origine murine, et les AcM humains sont entièrement humains. Dans un premier temps, les AcM chimériques étaient produits à partir d'hybridomes dont l'ADN codant des AcM était modifié pour correspondre aux séquences humaines. Puis, la technique de l'ADN recombinant a fait évoluer l'élaboration des systèmes d'expression des AcM. L'isolation et l'amplification de l'ADN codant pour les chaînes lourdes et légères des AcM à partir des lymphocytes ont été possibles par réaction en chaîne par polymérase (PCR). La constitution de banques et de systèmes de criblage a ainsi permis le développement des systèmes d'expression recombinants pour la production d'AcM humain (Chartrain & Chu, 2008). Ces systèmes d'expression ont l'avantage de permettre des rendements de production beaucoup plus élevés que la culture d'hybridomes (Chon & Zarbis-Papastoitsis, 2011).

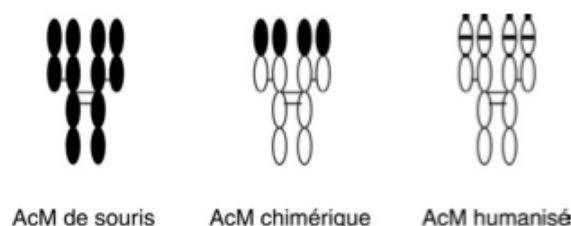


Figure 3. Évolution des anticorps monoclonaux (AcM) thérapeutiques : anticorps de souris, anticorps chimériques et anticorps humanisés (Siberil et *al.*, 2005). Le noir et blanc représentent respectivement les parties de l'AcM d'origine murine et humaine.

Les premiers AcM chimériques, humanisés et humains à usage thérapeutique ont respectivement obtenu leur AMM en 1994, 1998 et 2002 (Tableau 1). Aujourd'hui, 25 AcM à usage thérapeutique ont obtenu une AMM pour traiter les patients atteints de cancer ou de maladies auto-immunes. De plus, 25 AcM humanisés ou humains sont actuellement en phase 3 d'étude clinique et donc en bonne voie pour obtenir une AMM (Reichert, 2011).

1.2.3- Systèmes d'expression pour la production d'AcM recombinants

1.2.3.1- Cellules hôtes

La bactérie *E. coli* a été le premier hôte utilisé pour la production d'insuline recombinante en 1982. En effet, la caractérisation de son génome, son faible temps de génération ainsi qu'une bonne adaptation à la culture à grande échelle lui confèrent de nombreux avantages. Cependant, ce système reste peu intéressant pour la production d'AcM recombinants. Tout d'abord, les bactéries ne possèdent pas toutes les protéines chaperonnes permettant de produire une protéine recombinante avec la conformation requise (Butler, 2005). De plus, les bactéries n'ont pas la capacité d'excréter les protéines recombinantes, ce qui conduit à la formation de corps d'inclusion (agrégats protéiques) intracellulaires. Ce facteur est d'autant plus limitant pour l'expression d'AcM dans un système bactérien, car ce sont des protéines de très haut poids moléculaire (150 kDa au lieu de 6 kDa pour l'insuline). En outre, les systèmes bactériens ne permettent pas de réaliser les maturations post-traductionnelles telles que les ponts disulfures ou les glycosylations qui confèrent en partie la spécificité des AcM. Malgré ces inconvénients, la production d'un AcM humanisé dans le système d'expression *E. coli* a obtenu une AMM en 2006 (Tableau 1). Néanmoins, cette protéine est uniquement constituée de la partie Fab de l'anticorps. Elle ne nécessite donc pas de glycosylation et présente un poids moléculaire considérablement réduit.

Tableau 1. Anticorps monoclonaux ayant obtenu une AMM pour un usage thérapeutique et actuellement sur le marché. Source: Reichert (2011), sites internet de l'Agence européenne de médicaments (EMA) et de l'Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA).

Nom commercial	Origine	Indication	Système d'expression	Date AMM	Entreprise
Prolia	Humain	Perte osseuse	CHO	2010	Amgen & Boehringer Ingelheim
Actemra	Humanisé	Polyarthrite rhumatoïde	CHO	2010	Roche
Arzerra	Humain	Cancer	NSO	2009	Lonza & Glaxo
Stelera	Humain	Psoriasis	Lignée cellulaire recombinante	2009	Centocor & Janssen-Cilag
Simponi	Humain	Polyarthrite et Spondylarthrite ankylosante	Hybridome	2009	Centocor
Ilaris	Humain	Psoriasis	SP2/0	2003	Novartis
Cimzia	Fab Humanisé	Maladie de Crohn	E. coli	2008	UCB
Soliris	Humanisé	Hémoglobininurie paroxystique nocturne	NSO	2007	Lonza, AMRIC & Almac
Vectibix	Humain	Cancer	CHO	2006	Amgen & Boehringer Ingelheim
Lucentis	Fab Humanisé	Dégénérescence maculaire	E. coli	2006	Genentech & Novartis
Erbix	Chimérique	Cancer	Sp2/0	2004	Boehringer Ingelheim & Merck
Avastin	Humanisé	Cancer	CHO	2004	Genentech & Roche
Tysabri	Humanisé	Sclérose en plaque	NSO ou Sp2/0	2004	Biogen
Bexxar	Souris	Cancer	CHO	2003	GSK
Xolair	Humanisé	Asthme	CHO	2003	Genentech & Novartis
Humira	Humain	Polyarthrite rhumatoïde	CHO	2002	Abott
Zezalin	Souris	Cancer	CHO	2002	Biogen & Bayer
Campath-1H	Humanisé	Cancer	CHO	2001	Genzyme Oncology
Herceptin	Humanisé	Cancer	CHO	1998	Genentech & Roche
Remicade	Chimérique	Maladie de Crohn	Lignée cellulaire recombinante	1998	Centocor
Synagis	Humanisé	Prévention de l'infection par le virus respiratoire syncytial	NSO	1998	Boehringer Ingelheim & Abott
Simulect	Chimérique	Prévention contre le rejet de reins transplantés	NSO	1998	Novartis
Rituxan	Chimérique	Cancer	CHO	1997	Genentech
Reopro	Chimérique	Antithrombotique	CHO	1994	Centocor & Eli Lilly
Orthoclone Okt3	Souris	Prévention contre le rejet de reins transplantés	Hybridomes	1986	Janssen-Cilag

Les systèmes d'expression eucaryotes, comprenant les levures, les cellules d'insectes et les cellules de mammifères, ont l'avantage d'assurer le repliement, les modifications post-traductionnelles et l'excrétion des protéines recombinantes. Néanmoins, tous ces systèmes ne permettent pas d'obtenir les mêmes qualités de protéines recombinantes (Clincke et *al.*, 2011). En effet, les levures n'assurent ni le repliement, ni l'excrétion des protéines de grande taille telle que les AcM et réalisent une glycosylation incomplète. Les cellules d'insectes utilisent un système d'expression transitoire par infection d'un baculovirus. Ce système assure de hauts rendements de production et permet la maturation et la glycosylation des protéines recombinantes. Cependant, la glycosylation obtenue est très éloignée de celle des cellules de mammifères. Malgré ces inconvénients, les grands rendements et les coûts relativement faibles de production de ces procédés (levures ou cellules d'insectes) encouragent le développement de systèmes d'expression génétiquement modifiés permettant d'améliorer la qualité des protéines recombinantes complexes produites dans ces systèmes (Peterson et *al.*, 2006 ; Olivier & Mehtali, 2009).

La complexité de la structure des AcM a donc nécessité d'utiliser des systèmes d'expression qui expriment de façon intrinsèque le matériel protéique permettant leur production. Seule l'utilisation de lignées de cellules de mammifères permet de répondre à tous ces critères (repliement, maturation), et ceci, malgré le coût élevé de production (Birch & Racher, 2006 ; Chartrain & Chu 2008 ; Jefferis, 2009). En effet, en excluant l'AcM produit par *E. coli*, le Tableau 1 montre que la totalité des AcM actuellement sur le marché sont produits dans des systèmes d'expression utilisant des cellules de mammifères. En fait, plus de 70 % des protéines recombinantes sont actuellement produites dans diverses lignées cellulaires de mammifères (de Jesus & Wurm, 2011). Parmi elles, les cellules originaires de rétine d'embryon humain (PER-C6), de rein (HEK-293) ou de fibroblaste (MRC-5) et celles originaires de rein de singe vert (VERO) sont principalement utilisées pour la production de virus. D'autre part, les cellules de rein de hamster (BHK21), d'ovaire de hamster chinois (CHO) et de myélome de souris (NSO et SP2) sont plus fréquemment utilisées pour la production de protéines recombinantes (Zhu, 2011). Seules les lignées cellulaires NSO, Sp2/0 et plus particulièrement la lignée CHO sont actuellement utilisées en production industrielle d'AcM (Tableau 1). Néanmoins, le développement de procédé utilisant des cellules hôtes humaines comme la lignée PER.C6 pour l'amélioration de l'efficacité thérapeutique des AcM (glycosylation, conformation) est en expansion (Kuczewski et *al.*, 2011 ; Hou et *al.*, 2011).

1.2.3.2- Génération de clones de cellules CHO pour la production de protéines recombinantes

La lignée CHO est utilisée pour la production de 90 % des protéines recombinantes (incluant les AcM) exprimées dans des cellules de mammifères (Kantardjieff et *al.*, 2009). Cette lignée cellulaire a été établie à partir d'un ovaire de hamster chinois en 1957 par Puck (Puck et *al.*, 1958). Depuis, la lignée cellulaire CHO a été adaptée à la culture en suspension et s'est avérée relativement robuste pour supporter les conditions de culture dans des bioréacteurs agités à grande échelle (Butler, 2005). De plus, les différents travaux réalisés en génie génétique en ont fait une plateforme technologique bien caractérisée permettant la sélection aisée de clones optimisés pour une production de protéines recombinantes à haut rendement (Kantardjieff et *al.*, 2009). La lignée CHO a été ainsi l'une des premières lignées cellulaires à être utilisée pour l'élaboration de clones recombinants stables, grâce à la construction de clones CHO mutants auxotrophes à la DHFR (dihydrofolate réductase) ou à la GS (glutamine synthétase) (Chartrain & Chu, 2008 ; de Jesus & Wurm, 2011).

La DHFR est une enzyme clé du métabolisme cellulaire qui permet la synthèse de la glycine, de l'hypoxanthine et de la thymidine. Les deux clones CHO DUKX-B11 et DG44 ont la particularité de ne pas exprimer cette enzyme. Ainsi, ces lignées cellulaires ne peuvent pas proliférer dans un milieu de culture non supplémenté en glycine, hypoxanthine et thymidine. Afin d'élaborer un clone recombinant, un vecteur d'expression comprenant l'ADN codant pour la DHFR ainsi que l'ADN codant pour la protéine recombinante à exprimer, est transfecté dans la cellule. La sélection des clones exprimant le vecteur pourra donc se faire en milieu déficient en glycine, hypoxanthine et thymidine. De plus, la culture de ces cellules dans un milieu contenant une concentration élevée de méthotrexate (MTX), qui bloque l'activité de l'enzyme DHFR, permet d'amplifier le nombre de copies du vecteur d'expression, et ainsi d'obtenir un clone plus productif (Birch & Racher, 2006 ; Jayapal et *al.*, 2007 ; Chartrain & Chu, 2008). Selon le même principe, un autre système d'expression est utilisé avec la lignée CHO K1 qui a la particularité d'avoir une faible activité de glutamine synthétase (GS). La culture répétée de ces cellules transformées avec un vecteur co-exprimant la GS et l'AcM d'intérêt dans un milieu sans glutamine et avec de la méthionine sulfoximide (MSX), un inhibiteur de la GS, permet ainsi la sélection des clones exprimant le plasmide (Birch & Racher, 2006 ;

Jayapal et *al.*, 2007 ; Chartrain & Chu, 2008). Aujourd'hui, des plateformes automatiques sont utilisées pour la sélection des clones à haut rendement (Lindgren et *al.*, 2009).

1.3- Procédés de culture de cellules de mammifères

Comme nous l'avons montré, les caractéristiques fonctionnelles des AcM ainsi que les progrès en génie génétique ont permis un essor considérable dans le développement de nouvelles thérapies. Cependant, afin de pérenniser leur usage pour les traitements de cancers et de pathologies chroniques, le développement de procédés mieux maîtrisés et optimisés représente l'un des défis majeurs de l'industrie biopharmaceutique. Les exigences et les contraintes des procédés de culture de cellules animales représentent effectivement une large part du coût de ces thérapies car de grandes quantités d'AcM sont nécessaires pour ces traitements thérapeutiques.

1.3.1- Culture de cellules adhérentes ou en suspension

La majorité des lignées cellulaires provient de tissus d'organismes vivants et sont donc à l'origine de type adhérent. La culture *in vitro* de ces lignées nécessite la présence d'un support hydrophile pour permettre leur prolifération. Initialement en verre puis en plastique, les boîtes de culture sont les systèmes les plus basiques pour la prolifération des cellules adhérentes (Figure 4-A). Bien que principalement utilisées en laboratoire, elles sont encore utilisées pour la production du vaccin contre la rage à partir des cellules diploïdes MRC-5. La technologie des microporteurs s'est alors développée afin d'accroître la surface de supports solides tout en favorisant les transferts de matière dans les systèmes de culture sous agitation (Figure 4-B). Des procédés destinés à la production de vaccin (Kurokawa & Sato, 2011) ou à l'amplification de cellules souches devant garder leur caractère pluripotent (Want et *al.*, 2012) utilisent cette technologie.

En revanche, les cellules CHO, NSO, ou PER.C6, utilisées pour la production d'AcM, sont adaptées à la culture en suspension unicellulaire (Rita Costa et *al.*, 2010). Leur culture répétée en mode agité a permis de sélectionner des clones résistants à la culture en suspension (Figure 4-C). Ces étapes peuvent être très longues et toutes les lignées cellulaires ne sont pas adaptables au mode de culture en suspension. En effet, les cellules de mammifères sont des organismes de relativement grande taille par rapport aux bactéries ou aux levures et ne possèdent pas de parois. Elles sont donc potentiellement sensibles aux contraintes hydrodynamiques induites lors de culture en mode agité. Des agents

protecteurs, comme le pluronic F68 (un surfactant) ou des protéines, sont ajoutés dans le milieu de culture pour améliorer la résistance des cellules à ces contraintes (van der Pol & Tramper, 1998).

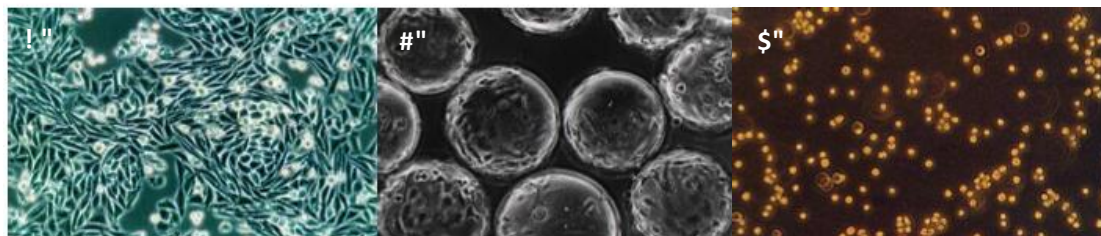


Figure 4. Photographies prises au microscope (grossissement x 1000) de cellules adhérentes cultivées (A) sur un support plan ou (B) sur microporteurs et de (C) cellules cultivées en suspension (Barbouche, 2008).

1.3.2- Systèmes de culture

1.3.2.1- Systèmes non contrôlés

Les systèmes dits non contrôlés ne sont ni régulés en pH, ni en oxygène dissous. Cependant, ces systèmes sont placés dans des environnements contrôlés en température (37°C) et en pression partielle de dioxyde de carbone. Ces systèmes ne sont généralement pas utilisés pour la production industrielle de protéines recombinantes, mais permettent le criblage de conditions de culture qui soient optimales pour la montée en échelle du procédé (Li et *al.*, 2010).

La microplaque multi-puits, couplée à un système automatique de comptage cellulaire non invasif comme le Cellscreen® permet de cribler jusqu'à 10 conditions de culture en parallèle (Brinkmann et *al.*, 2002). Ce type de système est largement utilisé pour optimiser la composition des milieux de culture pour les cellules adhérentes ou en suspension (Farges-Haddani et *al.*, 2006 ; Petiot et *al.*, 2009). Cependant, les faibles volumes utilisés (200 µL) limitent les analyses du milieu en cours de culture. La fiole d'Erlenmeyer avec des volumes de culture allant de 25 à 500 mL permet la culture des cellules en mode agité. L'agitation est réalisée via une table orbitale rotative pour maintenir les cellules en suspension et améliorer les capacités de transfert de matière. Ce système s'assimile donc plus à un bioréacteur et les volumes sont suffisants pour permettre un suivi cinétique du procédé. Les « spinners » diffèrent des fioles d'Erlenmeyer par leur système d'agitation. Les cellules sont maintenues en suspension à l'aide d'un rotor aimanté mis en rotation par une table magnétique.

Une étude récente propose la production de protéines recombinantes dans un système de culture de 5 L de volume, non contrôlé et agité via une table orbitale rotative. Malgré l'absence de régulation, la reproductibilité du procédé est assurée et un meilleur rendement de production d'AcM est obtenu par rapport aux bioréacteurs de type cuve agitée avec un axe rotatif (Tissot et *al.*, 2011).

1.3.2.2- Bioréacteurs

Les bioréacteurs permettent de cultiver les cellules dans un environnement contrôlé en température, pH, pression partielle d'oxygène dissous. Il existe une large gamme d'échelle de bioréacteurs pouvant aller de 1 mL à 25000 L. Les systèmes à petite échelle sont utilisés pour le développement et l'optimisation de procédés (Link et *al.*, 2004 ; Chen et *al.*, 2009). Par contre, les volumes des bioréacteurs utilisés pour la production industrielle de protéines recombinantes se situent généralement entre 5000 et 25000 L (Chon & Zarbis-Papastoitsis, 2011). Entre ces deux échelles, des bioréacteurs pilote sont utilisés pour la montée en échelle du procédé et la propagation des cellules. Les rendements de production industrielle d'AcM couramment obtenus sont de l'ordre de 1 à 5 g/L, mais certaines entreprises atteignent des concentrations entre 10 à 13 g/L (Kelley, 2009). Il existe plusieurs technologies de bioréacteurs qui diffèrent selon leur forme, leur mode d'agitation, leur système de régulation et leur durée d'utilisation. Une des difficultés majeures d'un système de production à grande échelle réside dans la détermination des conditions permettant, à la fois, un transfert de matière suffisant, et des contraintes hydrodynamiques non délétères pour les cellules (Jain & Kumar, 2007).

Les bioréacteurs de type cuve agitée en inox avec un axe rotatif ont été les premiers systèmes de culture développés pour la production en système agité à grande échelle (Figure 5). A fond rond et avec des pales tournantes de type hélice marine, ces bioréacteurs ont été conçus afin de diminuer les contraintes hydrodynamiques (van der Pol & Tramper, 1998). Ils sont aujourd'hui encore les systèmes de culture les plus utilisés (Butler, 2005 ; Birch & Racher, 2006). D'autres bioréacteurs, de type gazosiphon ou « Airlift », permettent de maintenir les cellules en suspension uniquement par la diffusion d'air ou de gaz. Bien que ces systèmes permettent un bon rendement de production, ils sont moins adaptés pour la culture à grande échelle (Butler, 2005). La nouvelle tendance pour un développement de procédé plus rapide et flexible est l'utilisation de bioréacteurs jetables (Chon & Zarbis-Papastoitsis, 2011 ; Smelko et *al.*, 2011). Ces bioréacteurs, de volume limité à 1000 L, peuvent être dotés d'une agitation via des pales tournantes, mais

également être agitées par des tables orbitales rotatives par la même technologie que les fioles d'Erlenmeyer (de Jesus & Wurm, 2011).

1.3.3- Modes d'alimentation

La Figure 5 représente les différents modes d'alimentation couramment utilisés pour la production de protéines recombinantes en système de cuves agitées (Birch & Racher, 2006). Le mode discontinu (batch) correspond à un ajout unique de milieu frais en début de culture lors de l'ensemencement cellulaire. La croissance cellulaire est donc limitée par l'épuisement des nutriments et le procédé dure de 3 à 7 jours. Le mode de culture semi-continu (fed-batch) consiste à ajouter du milieu de culture frais en cours de culture sans soutirer le milieu usagé. Ce système permet ainsi d'augmenter la concentration maximale cellulaire et d'atteindre de hauts rendements de production (Jain & Kumar, 2007). Cependant, l'accumulation de métabolites cellulaires, comme les ions ammonium, peut être toxique pour les cellules et néfaste pour la qualité des AcM (Chen & Harcum, 2006). Le mode perfusé, soit continu, soit par intermittence, est préférable pour limiter l'accumulation de déchets du métabolisme cellulaire. Ce système consiste à ajouter du milieu frais tout en soutirant du milieu usé. Le milieu usagé est séparé des cellules. Puis, les cellules peuvent être réintroduites dans la cuve de culture et le surnageant purifié pour récupérer les anticorps. L'inconvénient de ce système est que la quantité d'AcM produite est diluée ce qui augmente les étapes de purification. Néanmoins, l'alimentation continue en nouveaux nutriments permet d'allonger la durée de vie des cellules jusqu'à 80 jours et donc d'obtenir une forte productivité (Lee et al., 2008).

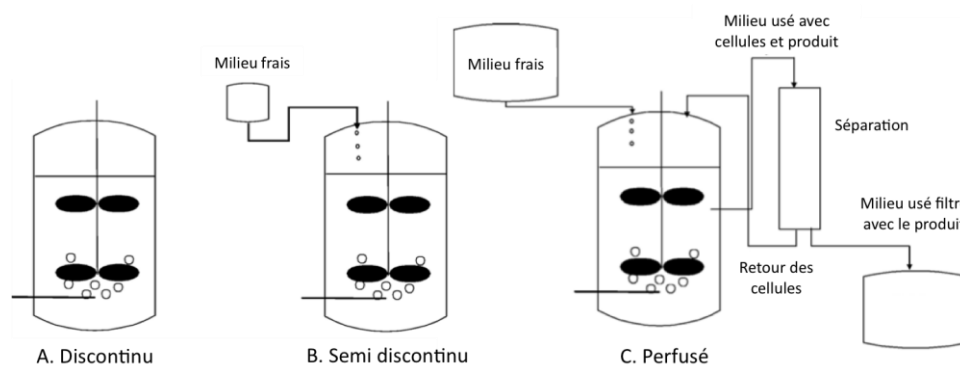


Figure 5. Différents modes d'alimentation utilisés pour la production d'anticorps monoclonaux à grande échelle en cuves agitées (Birch & Racher, 2006). (A) discontinu : aucun milieu frais ajouté en cours de culture ; (B) semi discontinu : du milieu frais est ajouté en cours de culture mais le milieu usagé n'est pas soutiré ; (C) perfusé : du milieu frais est ajouté et le milieu usagé filtré.

1.3.4- Paramètres opératoires physico-chimiques

1.3.4.1- Température

La température optimale de croissance des cellules de mammifères est de 37°C. Des températures comprises entre 32 et 38°C ne sont pas délétères pour les cellules, mais la vitesse de croissance en sera affectée (Chuppa et *al.*, 1997 ; Trummer et *al.*, 2006). Certaines études mettent en évidence le bénéfice de cultures bi-phasiques avec un abaissement de la température jusqu'à 32°C lorsqu'une quantité suffisante de cellules est atteinte afin de favoriser la production spécifique de protéines recombinantes (Trummer et *al.*, 2006 ; Yoon et *al.*, 2006 ; Kumar et *al.*, 2008). Cependant, une étude a montré que la production d'AcM à basse température (33°C) favorisait leur agrégation (Gomez et *al.*, 2010). Dans les bioréacteurs, la régulation se fait via une sonde de température plongée au cœur de la cuve et couplée à un système de chauffage, souvent de type double enveloppe et épingle chauffante. Les systèmes de culture non régulés sont positionnés dans une étuve thermostatée.

1.3.4.2- Oxygène dissous

L'oxygène dissous permet à la cellule de mammifère de produire de l'énergie par la respiration oxydative. Une déficience en oxygène induit une respiration par fermentation peu efficace en terme énergétique. La consommation d'oxygène est généralement comprise entre 0,05 et 0,5 mmol O₂ / (h x 10⁹ cellules). Le taux d'oxygène dissous dans le bioréacteur est fixé entre 40 et 60 % de la saturation en air, alors que dans un système non contrôlé il est apporté par l'interface air/ milieu de culture. L'oxygène est apporté dans les bioréacteurs via différents systèmes d'aération. Le plus simple est l'aération de surface limitée à de faibles volumes de liquide ou, plus communément, par la diffusion de bulles via un sparger, une membrane, une grille ou une canne. Selon les systèmes utilisés, des bulles plus ou moins petites sont générées. Les bulles plus petites permettent un meilleur transfert d'O₂. Par contre, lors de l'éclatement des bulles à l'interface air/ liquide, les petites bulles libèrent une plus grande énergie dans le milieu de culture que les grandes ce qui est plus délétère pour les cellules (Nienow, 2006). La régulation en bioréacteur se fait par une sonde étalonnée dans un milieu complètement saturé en oxygène.

1.3.4.3- pH

Le pH physiologique des cellules de mammifères est légèrement alcalin, entre 7,2 et 7,4. Un pH plus faible diminue significativement la vitesse de croissance des cellules, alors que la viabilité est prolongée, augmentant ainsi l'intégrale des cellules viables (IVC) (Trummer et *al.*, 2006). Ainsi, bien que la production spécifique de protéines recombinantes n'est pas améliorée pour un pH inférieur à 7,1, la concentration maximum de protéines produites est augmentée grâce à l'allongement de la durée de vie de la culture. Un procédé de culture biphasique avec abaissement du pH en fin de phase exponentielle de croissance a permis d'améliorer le rendement de production par un facteur 2 à 3 (Trummer et *al.*, 2006 ; Yoon et *al.*, 2006). La régulation du pH dans les bioréacteurs utilise une sonde pH préalablement étalonnée et une régulation basée sur l'ajout de base et de CO₂. Dans les systèmes non régulés, le milieu de culture contient généralement du bicarbonate de soude, ce qui permet de tamponner le pH dans les incubateurs régulés en CO₂. Néanmoins, les fortes densités cellulaires obtenues peuvent induire une baisse significative de pH due à la production d'acide lactique et de CO₂.

1.3.4.4- Osmolarité

Les milieux de culture possèdent une osmolarité de 260 à 320 mOsm/kg. Plusieurs études ont montré que l'hyperosmolarité du milieu de culture inhibe la croissance cellulaire et améliore la production spécifique de protéines recombinantes (Zhu et *al.*, 2005 ; Han et *al.*, 2009 ; Shen et *al.*, 2010). La régulation du pH induit l'ajout de quantités non négligeables de base qui augmente significativement l'osmolarité du milieu de culture. L'osmolarité du milieu de culture peut augmenter jusqu'à environ 450 mOsm/kg. Cependant, les conditions d'hyperosmolarité nécessaires pour augmenter la production spécifique d'anticorps doivent être au delà de 450 mOsm/kg (Zhu et *al.*, 2005; Han et *al.*, 2009; Shen et *al.*, 2010).

1.3.5- Milieux de culture

Les technologies de culture et les systèmes de régulation imposent l'environnement mécanique et physico-chimique des cellules cultivées *in vitro*. Par ailleurs, le milieu de culture apporte des éléments nutritifs et bioactifs nécessaires au bon fonctionnement du métabolisme cellulaire. Il peut être également impliqué dans la protection des cellules par rapport aux contraintes hydrodynamiques et dans la limitation des variations de pH par sa fonction tampon.

1.3.5.1- Milieux de cultures de base avec sérum

Depuis près d'un siècle, la formulation des milieux de culture utilisés pour l'expansion des cellules de mammifères a fait l'objet de nombreuses études. Initialement les cellules étaient cultivées dans des milieux contenant du plasma, du sérum ou des extraits de tissus d'origine animale. Puis la grande variabilité de lot-à-lot a motivé le développement de milieux de culture de base chimiquement définis afin de standardiser les conditions de culture. Ainsi, le milieu de base 199 a été formulé à partir d'une soixantaine de composés synthétiques suite à l'analyse des constituants du plasma. Eagle a alors sélectionné les composés de ce milieu, indispensables à la croissance des cellules pour formuler le milieu BME (Eagle's basal medium). Le BME est un mélange de 13 acides aminés, 6 vitamines, 6 espèces ioniques et du glucose auquel il est nécessaire d'ajouter 10 à 20 % de sérum pour assurer la croissance cellulaire (Eagle, 1959). Ce milieu de base a été décliné et amélioré pour la croissance de différents types cellulaires tels que les milieux de culture de base EMEM (Eagle's minimal essential medium) ou DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium). Puis, des milieux de base plus riches comme le RPMI 1640 (Roswell park memorial institute medium), le Ham's F12 ont été formulés afin de diminuer la quantité de sérum à ajouter.

Les fonctions des principaux composants des milieux de culture de base et du sérum sont les suivantes :

➤ *Glucose*

La principale source de carbone est le glucose. Il peut-être ajouté jusqu'à une concentration de 25 mM, alors que la concentration physiologique du glucose dans le sang est de 5 mM. La majorité du glucose est métabolisée en pyruvate via le cycle de la glycolyse puis réduite en lactate. Son métabolisme sera détaillé dans le prochain chapitre.

➤ *Glutamine*

Les cellules en culture utilisent la glutamine comme principale source azotée (Reitzer et al., 1979 ; Jenkins et al., 1992). Le métabolisme de la glutamine, la glutaminolyse, produit les précurseurs nécessaires à la synthèse des bases azotées (purine, pyridine), de certains acides aminés (glutamate, aspartate, proline, ornithine...) et des lipides (Engström & Zetterberg, 1984 ; Quek et al., 2010 ; Metallo et al., 2011 ; Wise & Thompson, 2010). Par conséquent, la limitation en glutamine est responsable de l'arrêt de la croissance et peut également provoquer la mort cellulaire par apoptose (Hwang & Lee, 2008). Or les cellules

de mammifères possèdent généralement une faible activité glutamine synthétase et la glutamine se dégrade rapidement en culture (Christie & Butler, 1994). La glutamine est donc ajoutée à des concentrations allant de 1 à 6 mM, soit environ 10 fois supérieures à celles des autres acides aminés. Son métabolisme sera détaillé dans le prochain chapitre.

➤ Acides aminés

Les acides aminés sont composés d'une fonction carboxylique, d'une fonction amine et d'une chaîne latérale. Selon la nature de leur chaîne latérale, les acides aminés peuvent être non polaires, aromatiques, polaires non chargés, chargés positivement (basiques) ou chargés négativement (acides) (Figure 6).

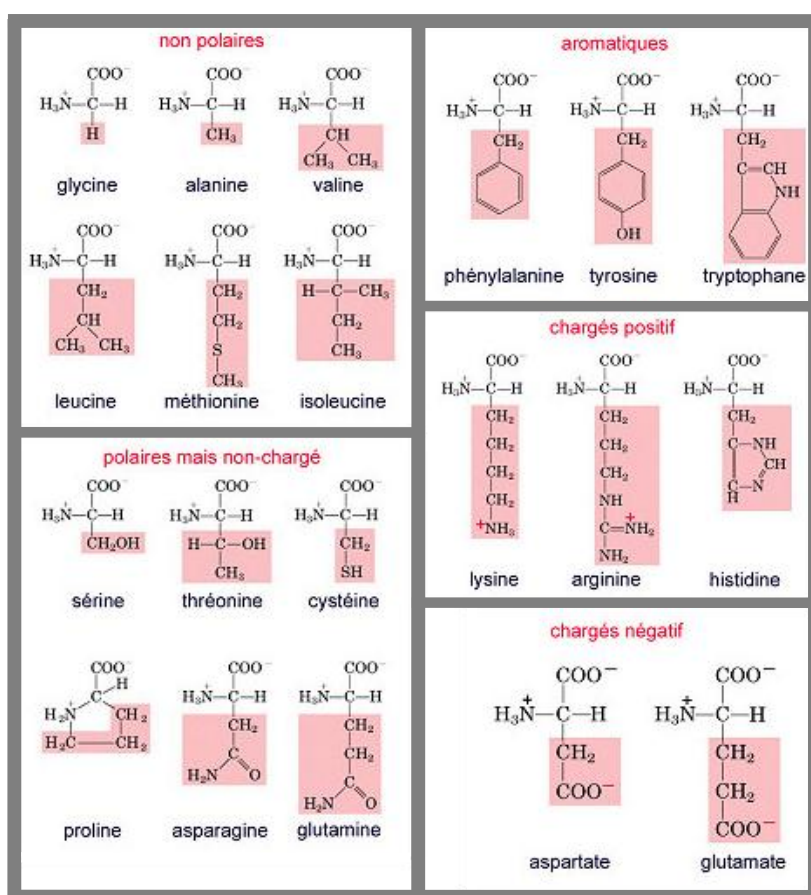


Figure 6. Classification des acides aminés selon leur chaîne latérale (Nelson & Cox, 2004)

La culture *in vitro* de cellules de mammifères nécessite l'addition des 8 acides aminés, dits essentiels pour l'homme (leucine, isoleucine, lysine, méthionine, tryptophane, phénylalanine, thréonine et valine), mais également de 5 acides aminés supplémentaires (arginine, cystéine, glutamine, histidine et tyrosine) (Eagle, 1959 ; Yamamoto & Niwa,

1993). De manière générale, une optimisation spécifique de la composition en acides aminés du milieu de culture peut permettre une amélioration significative de la concentration maximale cellulaire et de la production en protéines recombinantes (Xing et *al.*, 2011 ; González-Leal et *al.*, 2011). Par ailleurs, comme la glutamine, certains acides aminés sont peu stables en culture et peuvent donc être ajoutés au cours du procédé. Les milieux de base contiennent des concentrations d'acides aminés libres de l'ordre de 0,5 mM. En revanche, lors de l'ajout de sérum une quantité d'acides aminés non définie est introduite dans le milieu de culture.

➤ Vitamines

Les vitamines sont des substances organiques nécessaires au métabolisme cellulaire car elles ne peuvent pas être synthétisées par les cellules. Elles interviennent dans le métabolisme en tant que coenzymes ou dans la composition des coenzymes. Une faible quantité de vitamines est requise pour combler les besoins cellulaires. Elles sont donc ajoutées en faible concentration dans le milieu de culture de l'ordre du mg/L. Les besoins en vitamines varient considérablement selon les lignées cellulaires. Le sérum est une source importante en vitamines. Ainsi, lorsque la quantité de sérum est diminuée, il est important d'utiliser des milieux de base plus riches en vitamines. Le premier milieu de base défini par Eagle (BME) contient les 8 vitamines suivantes : biotine (B7), choline (groupe B), acide folique (B9), nicotinamide (B3), acide pantothénique (B5), pyridoxal (B6), riboflavine (B2) et thiamine (B1) (Eagle, 1959). Elles sont de la famille du groupe B et sont hydrosolubles. Le sérum apporte aux cellules les autres vitamines et cofacteurs nécessaires. Les milieux de base plus complexes, comme Ham's F12, DMEM ou M199, sont formulés pour la culture de cellules sans sérum et contiennent donc une plus large gamme de vitamines, incluant les vitamines liposolubles et solubles du groupe C. Par exemple, M199 contient, outre les vitamines comprises dans le milieu BME, les vitamines suivantes : acides ascorbique (C), cholécalférol (D3), vitamines A, E, K et acide p-aminobenzoïque. Une limitation en vitamines peut provoquer une diminution de la vitesse de croissance et du temps de survie des cellules (Kurano et *al.*, 1990 ; Kim et *al.*, 2006).

➤ Eléments minéraux

Les éléments minéraux assurent de nombreuses fonctions tant au niveau de l'environnement cellulaire que de la nutrition des cellules. Tout d'abord, la concentration en sels dans le milieu de culture permet d'assurer un environnement isotonique avec une

osmolarité de 260 à 320 mOsm/kg. Par ailleurs, le bicarbonate de soude est utilisé pour son pouvoir tampon. Lorsqu'il est couplé à du dioxyde de carbone (5 à 10 %), les variations du pH sont limitées entre 6,9 et 7,4.

D'autre part, les éléments traces les plus communément ajoutés sont les éléments inorganiques suivants : Mn, Cu, Zn, Mo, Va, Se, Fe, Ca, Mg, Si et Ni. La plupart de ces éléments jouent un rôle clé pour l'activité des enzymes et sont essentiels à la survie des cellules. L'addition de ces éléments minéraux peut diminuer le nombre de facteurs de croissance nécessaires à la cellule. Par exemple, un sel ferreux peut remplacer la transferrine pour le transport de fer dans plusieurs lignées cellulaires (Yabe & Matsui, 1997). Le sélénium présente des propriétés antioxydantes et un rôle important pour la croissance cellulaire via certaines sélénoprotéines (glutathion peroxidase et thioredoxine réductase) (Holben & Smith, 1999 ; Zhang *et al.*, 2006). Le calcium joue un rôle important car il est impliqué dans plusieurs mécanismes cellulaires dont la division cellulaire et l'adhérence. Ainsi, la réduction du calcium diminue les phénomènes d'adhérence cellulaire (Peshwa *et al.*, 1993).

➤ Nucléotides

Les nucléotides sont composés d'une base azotée de type purine (adénine, guanine) ou pyrimidine (thymine, uracile et cytosine), un sucre à cinq atomes de carbone (désoxyribose pour l'ADN et ribose pour l'ARN) et un groupement phosphate. Les nucléotides peuvent être mono, di ou triphosphates. Bien que la majorité des cellules soient capables de synthétiser les nucléotides, exceptées les cellules DHFR déficientes, les bases nucléotidiques peuvent-être ajoutées. Par exemple, l'adénine monophosphate stimule la production spécifique de protéines recombinantes en ralentissant la croissance cellulaire (Carvalho *et al.*, 2003 ; Carvalho *et al.*, 2011).

➤ Sérum de veau fœtal

Plusieurs types de sérum ont été initialement utilisés, mais le sérum de veau fœtal (SVF) s'est majoritairement imposé. Il correspond au liquide sanguin débarrassé des cellules et des protéines de coagulation. Il est composé de lipides, micronutriments (éléments traces et nutriments insolubles), facteurs d'adhérence, facteurs de croissance, hormones, et éléments protecteurs (antitoxines, antioxydants, antiprotéases).

L'utilisation du sérum, bien que souvent idéale pour les performances des procédés de cultures de cellules animales, présente de nombreux inconvénients (Jan et *al.*, 1994 ; Grillberger et *al.*, 2009) :

- La variation lot-à-lot ne permet pas d'assurer un rendement constant,
- Le haut taux de protéines (60 à 150 g/L) rend les étapes de purification des protéines recombinantes délicates,
- Le risque de contamination par les virus ou mycoplasmes,
- Le risque de transmission des contaminants aux patients (prion),
- L'approvisionnement en sérum de veau fœtal limité par les cheptels disponibles et la forte demande,
- Le coût élevé, jusqu'à 85 % de celui du milieu de culture,
- L'éthique.

Face à ces nombreux inconvénients, plusieurs alternatives ont été étudiées pour remplacer totalement le SVF.

1.3.5.2- Suppléments de milieux de culture sans sérum

➤ *Suppléments d'origine animale*

Tout d'abord, des travaux ont été réalisés pour déterminer le rôle du sérum et chercher à le remplacer par des composés mimant son action (Ham, 1974; Sato, 1974). Des cocktails d'hormones ont ainsi été formulés comme l'ITES développé pour la croissance d'hybridomes en milieux sans sérum ; il est constitué d'insuline, transferrine, éthanolamine et sélénite (Murakami et *al.*, 1982). Cependant, les besoins cellulaires en hormones varient énormément d'une lignée à l'autre (Godia, 2006). En parallèle, des travaux ont porté sur l'utilisation d'hydrolysats d'origine animale, obtenus à partir de la digestion enzymatique (pepsine, papaïne, pancratine, trypsine chymotrypsine) de matière première animale (primatone RL, viande, lait ou gélatine). Ces hydrolysats sont riches en matière protéique et apportent aux cellules les cofacteurs et facteurs de croissance nécessaires à leur prolifération (Amiot et *al.*, 2004 ; Ikonomou et *al.*, 2001 ; Schlaeger, 1996).

➤ *Suppléments sans molécules d'origine animale, avec ou sans protéines*

Depuis une vingtaine d'années, les industries de la biopharmacie font face à un nouveau défi. Toute substance d'origine animale peut être la source de contamination par des virus,

prions ou mycoplasmes potentiellement transmissibles à l'homme (Grillberger et *al.*, 2009). Dès lors, la formulation de milieux de culture sans molécules d'origine animale est fortement recommandée par les autorités réglementaires (FDA, EMA...). De plus, les molécules utilisées pour mimer l'action du sérum doivent elles-mêmes être produites avec un milieu de culture sans molécules d'origine animale pour être considérées comme source sûre. Leur coût a donc significativement augmenté, favorisant le développement d'autres types de suppléments d'origine non animale (Tableau 2). Sur la base des travaux réalisés sur les hydrolysats d'origine animale, des études ont alors évalué l'utilisation d'hydrolysats d'origine végétale ou microbienne (Heidemann et *al.*, 2000 ; Burteau et *al.*, 2003 ; Sung et *al.*, 2004 ; Farges et *al.*, 2008 ; Kim & Lee, 2009).

Tableau 2. Comparaison des avantages et inconvénients de divers suppléments de milieux de culture (Les signes « - » et « + » désignent les inconvénients et avantages).

Supplément \ Contrainte	Contamination	Coût	Purification	Variation lot-à-lot	Performance
Sérum	-	-	-	-	+
Hydrolysats d'origine animale	-	+	+	-	+
Protéines recombinantes	+	-	-	+	+
Hydrolysats d'origine non animale	+	+	+	-	+
Milieux chimiquement définis exempts de protéines	+	-	+	+	-

Dans un premier temps, la combinaison de ces hydrolysats avec des protéines recombinantes, comme l'albumine et l'insuline, a permis la formulation de milieux assurant de hautes performances, comme les milieux proCHOTM5 et proCHOTM4 de Lonza. Puis, le fort potentiel des hydrolysats d'origine non animale a conduit à la formulation de milieux sans aucune addition de protéines recombinantes (Burteau et *al.*, 2003). L'absence de protéines simplifie les étapes de purification des protéines recombinantes produites. Ces suppléments, sans molécules d'origine animale ni protéines, résolvent un grand nombre des contraintes initialement posées par le sérum (Tableau 2).

Néanmoins, les hydrolysats restent des composés complexes et non chimiquement définis. Ils sont donc soumis à une variabilité lot-à-lot induite par la matière première et leur procédé de production. Or, cette variabilité peut-être responsable de fortes variabilités de production des protéines recombinantes (Luo & Chen, 2007). De plus, leur composition non définie rend difficile leur optimisation. La tendance actuelle est donc d'envisager des

suppléments de culture de mieux en mieux caractérisés, voire totalement définis, et sans protéines. Des stratégies de criblage de bibliothèques de molécules ou de fractionnement/caractérisation des hydrolysats sont adoptées pour formuler ces milieux. Cependant, actuellement, les performances obtenues par les milieux de culture chimiquement définis sans protéines restent bien inférieures à celles obtenues en présence d'hydrolysats (Badcock, 2011).

1.4- Conclusion

Dans cette première partie, les enjeux économiques motivant l'optimisation des procédés de culture de cellules animales pour la production de protéines recombinantes et plus spécifiquement d'AcM ont été exposés. La Figure 7 résume les différents paramètres à définir et à optimiser pour développer des procédés de culture performants et maîtrisés.

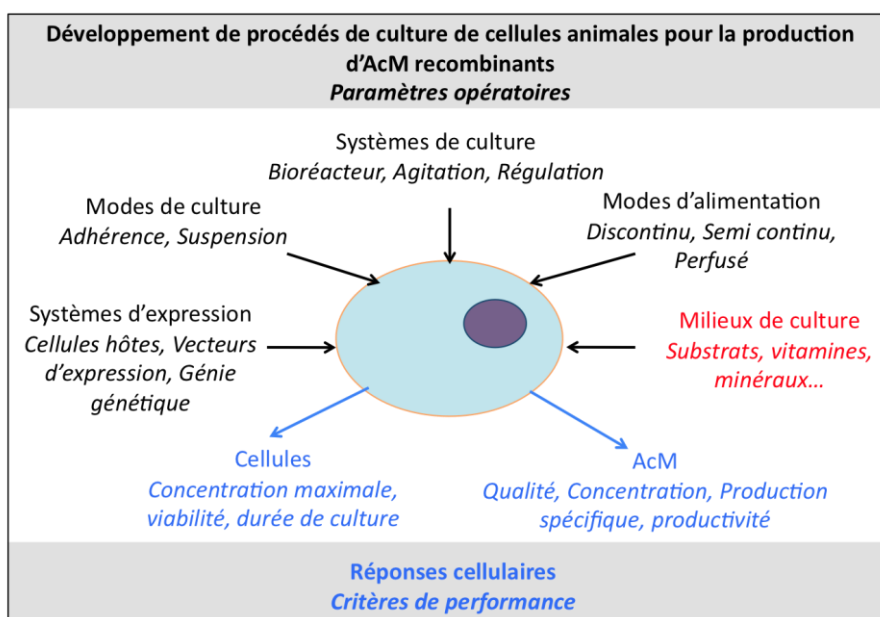


Figure 7. Principaux paramètres à optimiser pour un procédé de culture de cellules animales et critères de performance.

En l'état actuel des avancées technologiques et scientifiques, les cultures de cellules de mammifères CHO en suspension dans des bioréacteurs à cuves agitées avec une alimentation semi-continue et en milieu sans sérum, s'avèrent les procédés les plus performants pour répondre aux différentes contraintes de production des AcM. Le milieu de culture assure plusieurs fonctions dans ces procédés. Tout d'abord, il est le support

nutritionnel des cellules et peut apporter les facteurs bioactifs nécessaires à la prolifération cellulaire et à la production des molécules d'intérêt. D'autre part, il assure un environnement physico-chimique (osmolarité, pH) et mécanique (protection contre les contraintes de cisaillement) adéquat. Dans la suite de cette étude bibliographique, l'influence des différents constituants du milieu de culture sur le métabolisme et la physiologie des cellules va être détaillée pour aborder, plus spécifiquement, l'intérêt de l'ajout d'hydrolysats dans un procédé.

2- Stratégies de conduite des procédés de culture pour améliorer les performances cellulaires

De nombreuses voies d'activation ou d'inhibition interagissent sur le métabolisme cellulaire et permettent de contrôler la prolifération cellulaire, la mort cellulaire et la production de protéines. Par ailleurs, lors d'une culture en bioréacteur, l'environnement cellulaire est en constante évolution. Aussi, l'objectif de cette partie n'est pas de décrire toutes les cascades de réactions aboutissant aux réponses physiologiques, mais les stratégies intégratives permettant d'améliorer les performances d'une culture via la formulation du milieu de culture.

2.1- Métabolisme énergétique

La prolifération cellulaire et la production de protéines recombinantes nécessitent des apports nutritifs, énergétiques ainsi qu'une activité biosynthétique permettant de dupliquer les composants macromoléculaires à chaque division cellulaire. Par définition, l'ensemble des réactions permettant la biosynthèse des macromolécules est attribué à l'anabolisme, alors que le catabolisme désigne les voies métaboliques qui apportent les précurseurs métaboliques et l'énergie. Le métabolisme énergétique, également désigné par le métabolisme carboné central, comprend : la glycolyse, la voie des pentoses phosphates (PPP), le cycle des acides tricarboxyliques (TCA ou cycle de Krebs), la chaîne respiratoire et la glutaminolyse.

En 1956, Warburg démontra que les cellules cancéreuses cultivées en aérobie n'étaient pas capables d'exploiter le métabolisme oxydatif pour produire l'ATP (Adénosine triphosphate) comme la plupart des cellules de mammifères (Warburg, 1956). En revanche, il observa un fort taux de consommation de glucose et de production de lactate, suggérant une production d'énergie via la glycolyse et la conversion du pyruvate en lactate. Depuis, de nombreuses études ont montré que ce métabolisme n'est pas uniquement caractéristique des cellules cancéreuses, mais de toutes les cellules en prolifération qu'elles soient primaires (Brand, 1985), hématopoïétiques (Bauer et *al.*, 2004) ou de lignées continues (Petiot et *al.*, 2010 ; Altamirano et *al.*, 2006 ; Quek et *al.*, 2010). Ce métabolisme est à l'origine des fortes concentrations de glucose et glutamine ajoutées dans les milieux de culture. Néanmoins, les différentes études montrent que le

métabolisme énergétique s'autorégule selon l'apport nutritionnel disponible, permettant une utilisation plus ou moins efficace des substrats, tout en assurant une croissance identique (Bauer et *al.*, 2004 ; Wilkens et *al.*, 2011). La formulation du milieu de culture pour améliorer les performances du procédé apparaît donc essentielle.

2.1.1- Principales voies du métabolisme énergétique

2.1.1.1- Glycolyse

L'assimilation du glucose dans la cellule est la première étape de la glycolyse. Le glucose est une molécule polaire et ne peut donc pas franchir la membrane cytoplasmique par simple diffusion. Il peut-être transporté dans les cellules de mammifères via un transporteur actif ou passif facilité (Wood & Trayhurn, 2003). Le mécanisme de transport actif de type sodium dépendant est uniquement exprimé par les cellules épithéliales intestinales ou rénales, tandis que le mécanisme passif facilité est exprimé par la totalité des cellules de mammifères. Il existe 3 familles de transporteurs qui regroupent au total 13 isoformes (GLUT 1 à 12 et HMIT1), exprimées ou non selon le phénotype des cellules (Joost & Thorens, 2001), et présentant des constantes d'affinité différentes pour le glucose (Wlaschin & Hu, 2007). L'isoforme GLUT1 a la particularité d'être exprimée par la majorité des cellules, dont les cellules CHO, et dispose d'une très forte affinité pour le glucose (Wood & Trayhurn, 2003).

Une fois intégré dans la cellule, le glucose est métabolisé dans le cytoplasme via la glycolyse. Le glucose est tout d'abord phosphorylé par l'hexokinase II (HK II) qui lui adjoint un groupement phosphate provenant de l'ATP. Puis, une succession de réactions chimiques est opérée qui aboutit à la synthèse de 2 molécules de pyruvate, 2 molécules d'ATP et 2 molécules de coenzyme NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit) à partir d'une molécule de glucose. Par ailleurs, les intermédiaires de la glycolyse alimentent l'anabolisme et permettent la biosynthèse partielle des molécules nécessaires à la division cellulaire (Figure 8). Par exemple, le glucose-6-phosphate (glucose-6-P) peut être utilisé pour la biosynthèse de nucléotides grâce à la production des précurseurs ribose-5-phosphate et du NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit) via le cycle des pentoses phosphates. La proportion de glucose déviée afin d'assurer la synthèse des acides nucléiques est en général de l'ordre de 4 à 8 % (Godia et *al.*, 2006). De plus, d'autres précurseurs issus de la glycolyse permettent la biosynthèse des lipides (glycérol 3-phosphate) ou des acides aminés sérine et glycine.

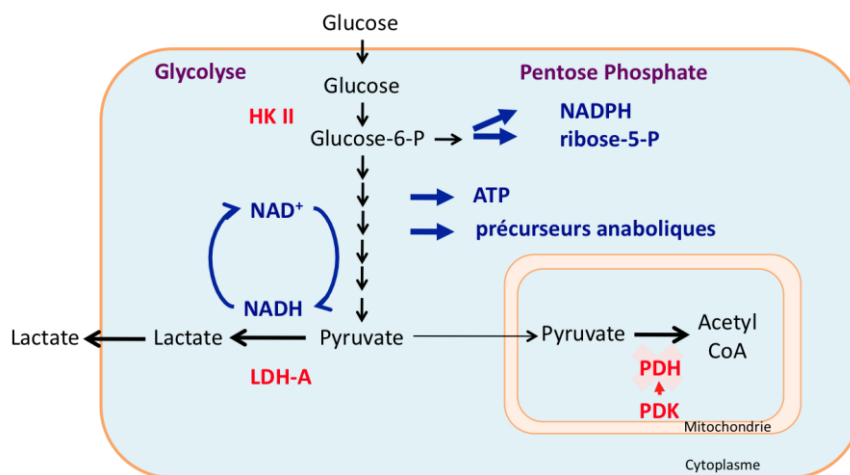


Figure 8. Glycolyse des lignées cellulaires continues et production de lactate (Feron, 2009).

A l'issue de la glycolyse, le pyruvate peut, soit, entrer dans la mitochondrie pour être transformé en acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA) et intégré dans le cycle TCA, soit, être transformé en lactate (Figure 8). La métabolisation du pyruvate via le cycle TCA et la chaîne respiratoire permet la production théorique de 36 moles d'ATP supplémentaires (2 et 34 respectivement), alors qu'aucune n'est produite via sa conversion en lactate. Néanmoins, les cellules en prolifération métabolisent seulement 10 à 30 % du pyruvate via le cycle TCA en aérobie malgré la perte énergétique occasionnée (Altamirano *et al.*, 2006 ; Quek *et al.*, 2010).

2.1.1.2- Conversion du pyruvate en lactate

Dans un milieu non limité en glucose, son intégration rapide dans la cellule est responsable d'une forte activité glycolytique qui génère des productions élevées de NADH et pyruvate. Afin de rééquilibrer son potentiel redox NAD^+/NADH la cellule doit donc régénérer le NADH rapidement. Or, la membrane mitochondriale est peu perméable à la diffusion du NADH ce qui constitue une étape limitante pour sa régénération via le cycle oxydatif (Godia *et al.*, 2006). En revanche, la conversion du pyruvate en lactate a l'avantage de rééquilibrer rapidement le potentiel redox NAD^+/NADH des cellules (Feron, 2009). Le couplage de la glycolyse à la conversion du pyruvate en lactate résulte donc en un métabolisme énergétique autonome. De plus, la vitesse élevée de production du pyruvate limite son intégration dans le cycle TCA et favorise sa transformation en lactate pour son évacuation vers le milieu extracellulaire (Bauer *et al.*, 2004 ; Wilkens *et al.*, 2011).

D'autre part, le flux de pyruvate vers le lactate est régulé par l'action de deux enzymes : la lactate déshydrogénase A (LDH-A) et la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK) (Christofk et *al.*, 2008 ; Zhou et *al.*, 2011). La LDH-A favorise la conversion du pyruvate en lactate, alors que la PDK inhibe l'enzyme pyruvate déshydrogénase (PDH) qui permet la conversion du pyruvate en acétyl coenzyme A (acétyl-CoA) dans la mitochondrie pour être métabolisé dans le cycle TCA (Figure 8). L'inhibition de l'expression de ces enzymes dans la cellule CHO a permis de favoriser l'assimilation du pyruvate dans le cycle TCA et donc de diminuer la production de lactate (Chen et *al.*, 2001 ; Zhou et *al.*, 2011).

2.1.1.3- Cycle TCA et glutaminolyse

La faible proportion de pyruvate intégrée dans le cycle oxydatif est tout d'abord transportée dans la mitochondrie pour être transformée en acétyl-CoA via la PDH (Figure 8 et Figure 9). La réaction de l'acétyl-CoA avec l'oxaloacétate (OAA) permet la formation du citrate qui constitue la première étape du cycle TCA. Une quantité importante de citrate diffuse alors dans le cytoplasme pour permettre l'anabolisme des lipides (Godia et *al.*, 2006 ; Ma et *al.*, 2009). La déviation du citrate, conjuguée à la faible proportion de pyruvate intégrée au cycle TCA, épuise significativement le cycle au niveau de l'embranchement citrate/ α -cétoglutarate (α KG). Ainsi, le cycle TCA des lignées continues de cellules de mammifères est dit tronqué.

Les produits issus de la glutaminolyse, assurent l'approvisionnement du cycle TCA en α KG. La première étape de la glutaminolyse est la conversion de la glutamine en glutamate par une désamination qui conduit à la formation d'une mole d'ion ammonium (Figure 9). Le glutamate permet alors la formation d' α KG via trois voies distinctes (Altamirano et *al.*, 2000) :

- Désamination du glutamate par la glutamate déshydrogénase,
- Transamination par l'alanine amino transaminase,
- Transamination par l'aspartate amino transférase.

Les étapes suivantes du cycle TCA conduisent à la transformation de l' α KG en succinate, fumarate, malate pour finalement régénérer l'OAA (Figure 8). L'engorgement du cycle TCA, via l'approvisionnement en α KG issu de la glutaminolyse, est régulé grâce à la transformation du malate en pyruvate par deux mécanismes différents (Altamirano et *al.*, 2006 ; Godia et *al.*, 2006) :

- L'enzyme malique qui est présente dans la mitochondrie et le cytoplasme,

- La synthèse d'OAA par la malate déshydrogénase (MDH) dans le cytoplasme, transformé ensuite en phosphoénol pyruvate (PEP) qui réintègre ensuite la glycolyse pour la formation de pyruvate.

La conversion du malate en pyruvate aboutit également à la régénération du NADH en NAD^+ . Le pyruvate produit est alors, soit, intégré au cycle TCA pour former de l'acétyl-CoA, soit, transformé en lactate dans le cytoplasme. Par conséquent, la glutaminolyse est à l'origine de la production de trois principaux métabolites : les ions ammonium, le lactate et l'alanine. Ces déchets sont connus pour être toxiques pour la cellule lorsqu'ils sont accumulés à de fortes concentrations (Lao & Toth, 1997 ; Takagi et *al.*, 2001 ; Genzel et *al.*, 2005 ; Ma et *al.*, 2009 ; Zhou et *al.*, 2011).

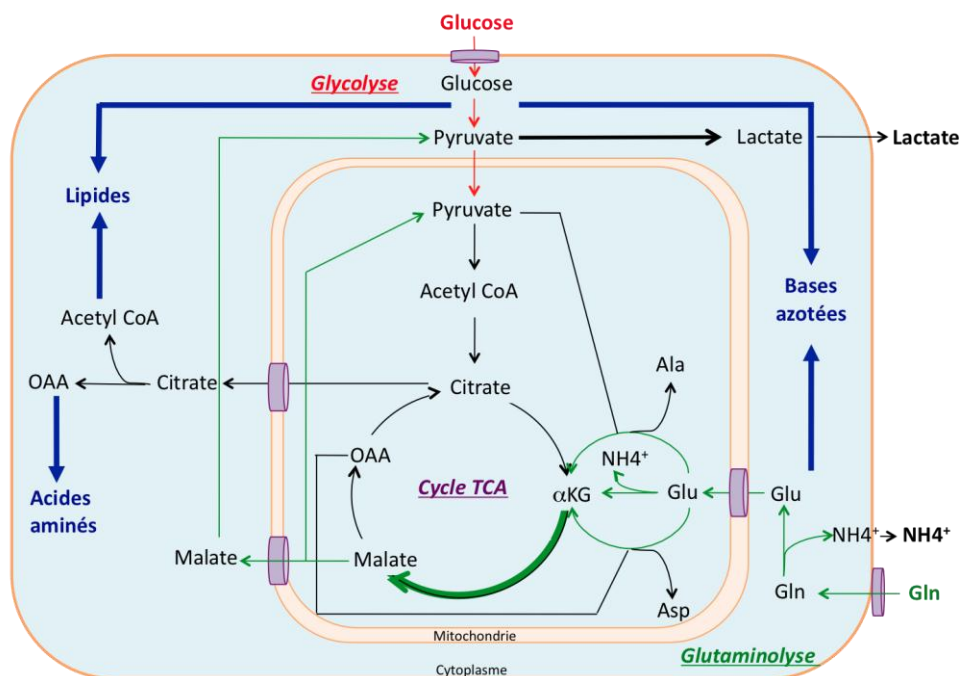


Figure 9. Alimentation du cycle TCA via le métabolisme du glucose et de la glutamine et principaux précurseurs anaboliques (Altamirano et *al.*, 2000 ; Godia et *al.*, 2006 ; Feron, 2009).

Le pyruvate peut également être transformé en oxaloacétate ou en malate via la pyruvate carboxylase. Cette enzyme est activée par une concentration élevée en acétyl-CoA, indicateur d'un manque d'oxaloacétate. Par ailleurs, le catabolisme des acides aminés aboutit également à la production des intermédiaires du cycle TCA. Par exemple, le métabolisme du glutamate assure les mêmes fonctions que celui de la glutamine tout en évitant la formation d'une mole d'ion ammonium (Figure 9). Néanmoins, les différents systèmes de transport des acides aminés font de la glutamine un substrat privilégié (Hyde

et *al.*, 2003). En effet, l'intégration des acides aminés dans le cytoplasme cellulaire nécessite des transporteurs actifs, avec généralement un co-transport d'ions sodium variables selon la nature de la chaîne latérale de l'acide aminé (Collarini & Oxender, 1987 ; Hyde et *al.*, 2003 ; Wahl et *al.*, 2008). Or, les transporteurs du glutamate (chargé négativement) ont la particularité d'être énergivores, alors que la glutamine peut utiliser plusieurs transporteurs (Wahl et *al.*, 2008). De plus, certaines lignées cellulaires, comme les cellules CHO et NSO, possèdent une activité glutamine synthétase faible ce qui nécessite un apport exogène de glutamine.

D'un autre côté, il est à noter que les réactions du catabolisme des acides aminés sont réversibles. Par conséquent, lorsque le cycle TCA est engorgé, des acides aminés peuvent être synthétisés ce qui confère une grande flexibilité au métabolisme cellulaire.

2.1.2- Stratégie pour influencer le métabolisme énergétique et les performances de culture

2.1.2.1- Glycolyse

L'assimilation rapide du glucose génère une activité glycolytique élevée qui se traduit par une production d'énergie réalisée principalement via la glycolyse et la conversion du lactate en pyruvate. Différentes études ont cherché à ralentir l'assimilation du glucose par la cellule afin de rééquilibrer le métabolisme énergétique. Outre les modifications génétiques, les principaux paramètres pour ralentir la consommation des glucides sont la nature et la concentration en glucides ainsi que le pH du milieu de culture.

➤ Substitution du glucose par d'autres glucides

La substitution du glucose par un glucide métabolisé plus lentement comme le fructose (Duval et *al.*, 1992 ; Altamirano et *al.*, 2000 ; Petiot et *al.*, 2010), le galactose (Altamirano et *al.*, 2006 ; Wilkens et *al.*, 2011) ou le mannose (Altamirano et *al.*, 2000 ; Berrios et *al.*, 2011) permet de diminuer leur vitesse de consommation. Dans la majorité des travaux, ceci a pour conséquence de diminuer le taux de lactate produit par mole de glucide consommée, ce qui indique l'augmentation de la production d'énergie via la respiration cellulaire (Berrios et *al.*, 2011 ; Wilkens et *al.*, 2011 ; Altamirano et *al.*, 2006). Ce changement de métabolisme permet l'allongement de la durée de la culture grâce, d'une part, à l'augmentation du rendement de production des cellules par mole de glucide et, d'autre part, à la diminution du lactate toxique pour la cellule (Lao & Toth, 1997 ; Takagi

et *al.*, 2001 ; Genzel et *al.*, 2005). Néanmoins, la substitution du glucose par des sucres métabolisés plus lentement engendre un ralentissement de la croissance cellulaire (Tableau 3). La majorité des travaux combinent donc le glucose avec un sucre métabolisé plus lentement afin d'assurer, dans un premier temps, un taux de croissance élevé, puis d'allonger la durée de vie des cultures (Duval et *al.*, 1992 ; Petiot et *al.*, 2010 ; Altamirano et *al.*, 2006 ; Wilkens et *al.*, 2011). Cette stratégie de formulation du milieu de culture peut alors conduire à l'augmentation de la production des protéines recombinantes (Duval et *al.*, 1992).

Tableau 3. Effet de l'ajout de 20 mM (G20) et 6 mM (G6) de glucose ou de la combinaison de 6 mM de glucose avec 14 mM de galactose (GG6/14) et de 2 mM de glucose et 18 mM de galactose (GG2/18) sur la vitesse spécifique de croissance maximale ($\mu_{\max}$) et le rendement de lactate produit par mole de glucide consommé ($\Delta L/\Delta H^a$) de cellules CHO (Wilkens et *al.*, 2011).

Experiment	$\mu_{\max}$ ($10^{-2}/h$)		$\Delta L/\Delta H^a$	
	Phase 1	Phase 2	Phase 1	Phase 2
G20	2.60	–	1.5	–
G6	1.93	–	1.3	–
GG6/14	2.44	0.74	1.3	–2.5
GG2/18	2.58	0.59	1.8	–2.5

^aH stands for hexose, depending on the culture's phase it can be either glucose or galactose.

➤ Concentration du glucose

D'autres études ont montré que, dans un environnement pauvre en glucose, les cellules sont capables de maintenir une vitesse de croissance élevée malgré une plus faible consommation de glucose (Cruz et *al.*, 1999 ; Europa et *al.*, 2000 ; Bauer et *al.*, 2004 ; Maranga & Goochee, 2006). Par conséquent, la production d'énergie via la glycolyse et la conversion du lactate semble surdimensionnée par rapport aux besoins cellulaires (Godia et *al.*, 2006). Néanmoins, une faible concentration de glucose peut être responsable de la diminution de la vitesse de croissance, mais également d'une concentration maximale de cellules réduite si le milieu n'est pas alimenté en cours de culture (Tableau 3) (Altamirano et *al.*, 2001 ; Wilkens et *al.*, 2011). Il est donc nécessaire d'alimenter le procédé en glucose, de manière continue ou semi continue, afin de maintenir un taux de glucose suffisant et d'atteindre une concentration élevée de cellules viables (Glacken et *al.*, 1986 ; Cruz et *al.*, 1999 ; Europa et *al.*, 2000 ; Maranga & Goochee, 2006).

➤ Diminution du pH

La diminution du pH du milieu de culture est corrélée à la diminution des vitesses de consommation du glucose et de production de lactate (Kuwaie et *al.*, 2005 ; Yoon et *al.*, 2005 ; Burky et *al.*, 2007). De plus, le rendement de production de lactate par mole de glucose consommée ($Y_{\text{Lac/Glc}}$) diminue, ce qui met en évidence une diminution de la production d'énergie via la glycolyse au profit de la respiration cellulaire (Tableau 4) (Tsao et *al.*, 2005 ; Yoon et *al.*, 2005). L'influence de ce changement de métabolisme se caractérise par une diminution de la vitesse de croissance cellulaire et par l'allongement de la durée de vie de la culture. Une stratégie de culture diphasique, intégrant une phase de prolifération au pH optimal de croissance (7,2) suivi d'une phase stationnaire à un pH plus faible (7,0) permet ainsi d'atteindre une concentration maximale de cellules puis de prolonger la culture pour augmenter la concentration de protéines recombinantes (Yoon et *al.*, 2006).

Tableau 4. Influence du pH et de la température sur le rendement de mole de lactate produite par mole de glucose consommée ($Y_{\text{Lac/Glc}}$) et de mole d'ions ammonium produite par mole de glutamine consommée ($Y_{\text{Amm/Gln}}$) de cellules CHO cultivées en bioréacteur (Yoon et *al.*, 2005).

pH	$Y_{\text{Lac/Glc}}$ (mol/mol)		$Y_{\text{Amm/Gln}}$ (mol/mol)	
	32.5°C	37°C	32.5°C	37°C
6.85	1.10 ± 0.09	1.14 ± 0.13	2.12 ± 0.24	1.25 ± 0.11
7.00	0.96 ± 0.09	1.36 ± 0.09	1.84 ± 0.01	0.91 ± 0.01
7.20	1.00 ± 0.21	1.53 ± 0.04	1.87 ± 0.34	1.07 ± 0.17
7.40	1.52 ± 0.03	1.61 ± 0.02	3.17 ± 0.14	1.56 ± 0.26
7.60	1.58 ± 0.16	1.47 ± 0.02	2.48 ± 0.58	1.05 ± 0.01
7.80	1.78 ± 0.06	1.53 ± 0.03	1.78 ± 0.28	1.38 ± 0.03

^aValues are means of two independent experiments.

D'après les différents travaux présentés, nous pouvons conclure que, malgré son faible rendement énergétique, la glycolyse couplée à la conversion du pyruvate en lactate permet d'assurer une vitesse de croissance élevée. Ainsi, comme l'ont proposé différents auteurs, la vitesse spécifique de production en ATP est augmentée par un métabolisme glycolytique par comparaison d'un métabolisme oxydatif (Guppy et *al.*, 1993 ; Pfeiffer et *al.*, 2001). De plus, le métabolisme glycolytique permettrait de favoriser la consommation des nutriments pour la production de cellules (Vander Heiden et *al.*, 2009). D'ailleurs, une étude a montré que la stimulation de la prolifération cellulaire par une cytokine (hormone de croissance) a été précédée par l'activation d'un métabolisme glycolytique (Bauer et *al.*,

2004). Néanmoins, d'autres études mettent en évidence une surproduction d'énergie qui peut être régulée par le ralentissement de la vitesse d'assimilation du glucose via la formulation du milieu de culture. La réduction de la production du lactate et l'utilisation plus efficace des substrats via le cycle oxydatif permettent alors l'allongement de la durée de la culture et, dans certains cas, l'augmentation de la production de protéines recombinantes.

2.1.2.2- Glutaminolyse et cycle TCA

Lors de la phase de croissance, une glutaminolyse active est nécessaire pour alimenter le cycle TCA tronqué au niveau de l'embranchement α KG. Cependant, la déviation au niveau du malate est caractéristique de l'engorgement du cycle TCA et d'une suractivité de la glutaminolyse. Cette suractivité a pour conséquence la production de fortes concentrations en ions ammonium, lactate et alanine qui sont connues pour être inhibitrices de la croissance cellulaire (Lao & Toth, 1997 ; Takagi et *al.*, 2001). Par conséquent, il peut être intéressant de diminuer la vitesse d'assimilation de la glutamine afin d'en ralentir son métabolisme. Par ailleurs, toutes les stratégies permettant de préserver l'intégrité du cycle TCA et de stimuler la chaîne respiratoire peuvent améliorer le métabolisme énergétique et conduire à l'augmentation de la quantité de cellules viables et de protéines recombinantes.

➤ *Substitution de la glutamine*

L'une des principales stratégies pour diminuer l'assimilation de la glutamine est sa substitution par le glutamate (Altamirano et *al.*, 2000 ; Altamirano et *al.*, 2004 ; Zhang et *al.*, 2006). En effet, l'ajout de glutamate, sous-produit de la glutaminolyse, permet de diminuer la production d'ions ammonium. De plus, comme nous l'avons vu dans le paragraphe 2.1.1.3, le transport de cet acide aminé est plus lent, ce qui permet d'éviter l'engorgement du cycle TCA, la déviation du malate et donc la production de lactate (Figure 9). Des résultats de la littérature mettent en évidence une nette diminution de la production de lactate et d'ions ammonium (Figure 10). Par contre, la substitution de la glutamine s'accompagne également de la diminution de la quantité de cellules viables si les cellules n'expriment pas une activité glutamine synthétase suffisante. Les cellules CHO, caractérisées par une activité glutamine synthétase faible doivent donc être transformées pour bénéficier de telles stratégies de substitution de la glutamine (Zhang et *al.*, 2006).

D'autres études ont substitué la glutamine par du pyruvate (Genzel et *al.*, 2005), de l'asparagine ou des dipeptides alanine-glutamine ou glycine-alanine (Christie & Butler, 1994; Christie & Butler, 1999; Petiot et *al.*, 2010). Ces études, réalisées avec des cellules VERO, BHK-21 ou MRC-5, ont permis de diminuer significativement la production d'ions ammonium. Au niveau des performances cellulaires, la vitesse spécifique de croissance est, soit inchangée, soit diminuée et le nombre maximal de cellules viables est inchangé ou augmenté (Petiot et *al.*, 2010; Christie & Butler, 1999).

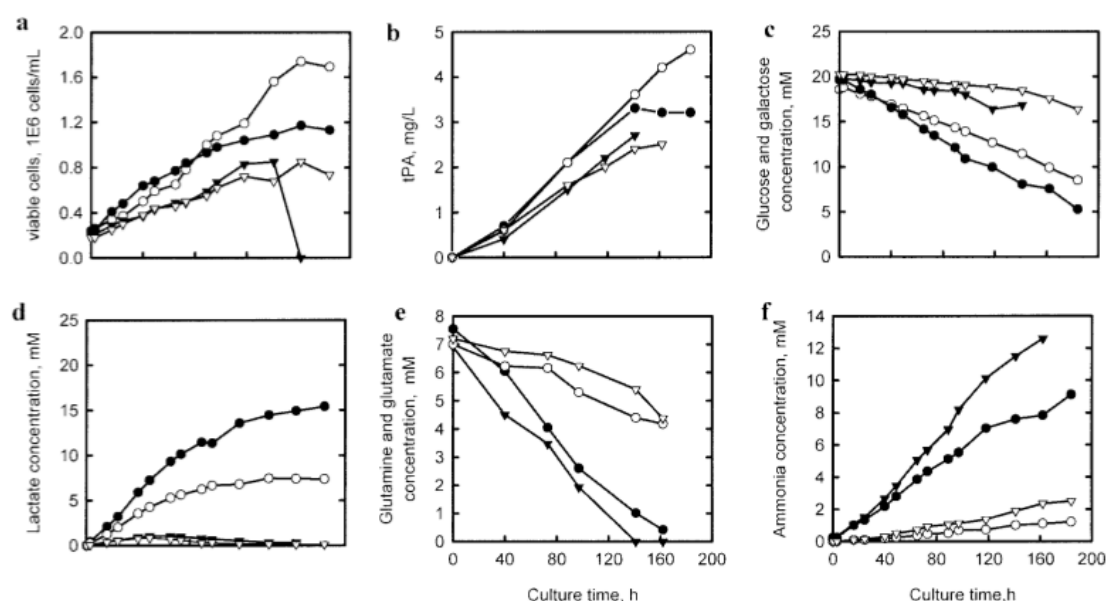


Figure 10. Cultures de cellules CHO discontinues avec ajout de glutamine ou de glutamate à une concentration de 7 mM comme source azotée et de glucose ou galactose à une concentration de 20 mM comme source carbonée dans la formulation du milieu de culture : galactose/glutamine (▼), galactose/glutamate (▽), glucose/glutamate (○), glucose/glutamine (●). Cellules viables (a) ; protéines recombinantes (b) ; glucide (c) ; lactate (d) ; glutamine ou glutamate (e) ; et ions ammonium (f) (Altamirano et *al.*, 2004).

➤ Alimentation du cycle TCA

L'activité du métabolisme oxydatif se traduit par une forte concentration des intermédiaires du cycle TCA et une consommation élevée des acides aminés intracellulaires. Certains auteurs ont montré la possibilité d'améliorer cette activité en modifiant la formulation du milieu de culture par l'ajout de cuivre (Qian et *al.*, 2011 ; Luo et *al.*, 2012) ou d'acides aminés (Europa et *al.*, 2000), ce qui a abouti à l'augmentation de la concentration des cellules viables. De manière intéressante, le bénéfice de l'ajout de cuivre est observé uniquement après la phase exponentielle de croissance (Figure 11), la

croissance cellulaire étant assurée, dans un premier temps, via un métabolisme principalement glycolytique.

Par ailleurs, d'autres études montrent que le lactate ne serait pas un simple métabolite, mais pourrait être utilisé comme substrat vers le cycle TCA (Altamirano et *al.*, 2006; Ma et *al.*, 2009 ; Luo et *al.*, 2012 ; Gagnon et *al.*, 2011; Wilkens et *al.*, 2011). Ce phénomène est observé en fin de phase de croissance, lors de la transition du métabolisme énergétique vers la respiration cellulaire. Il peut être observé lorsque le glucose est substitué par un glucide métabolisé plus lentement (Altamirano et *al.*, 2006 ; Wilkens et *al.*, 2011), lorsque le pH est diminué (Burky et *al.*, 2007 ; Tsao et *al.*, 2005), ou lorsque l'activité du cycle TCA est stimulée par l'ajout de cuivre (Luo et *al.*, 2012). Il semble également dépendre de la lignée cellulaire (Gagnon et *al.*, 2011 ; Luo et *al.*, 2012). De plus, la surexpression de gènes anti-apoptotiques dans une cellule CHO a permis d'améliorer la capacité des cellules à consommer le lactate (Dorai et *al.*, 2009).

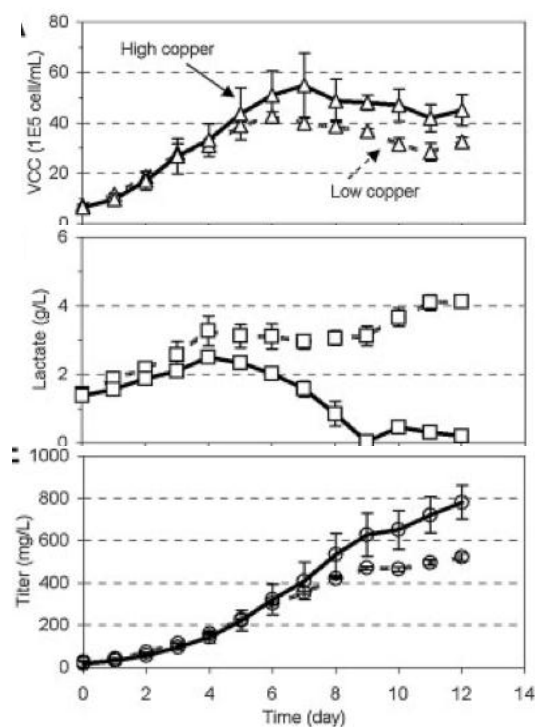


Figure 11. Influence de la concentration de cuivre (copper) ajouté à faible (- - -) ou haute (—) concentrations dans le milieu de culture de cellules CHO cultivées en bioréacteur avec une alimentation semi continue de glucose: Cellules viables (Δ); lactate ($\square$) et anticorps ($\circ$) (Luo et *al.*, 2012).

Une activité glycolytique trop faible n'assurant pas l'alimentation du cycle TCA en pyruvate est à l'origine de la reconversion du lactate en pyruvate. L'équilibre redox NAD^+/NADH ainsi qu'une concentration élevée en lactate pourrait expliquer la régulation

de ce changement de métabolisme (Figure 12) (Ma et *al.*, 2009 ; Mulukutla et *al.*, 2012). Dans les cultures de cellules où les conditions ne sont pas propices à une faible activité glycolytique (glucose non limitant, pas de baisse de pH), une diminution de l'activité de l'enzyme HK II (Figure 8) serait à l'origine de ce changement de métabolisme (Ma et *al.*, 2009).

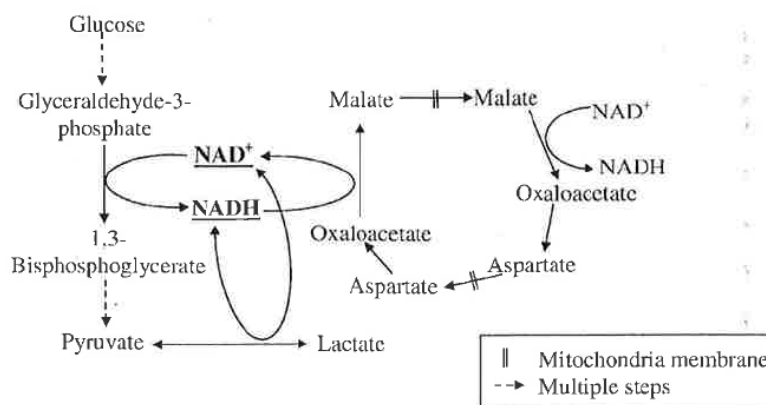


Figure 5. Major NAD^+ and NADH conversion pathways.

Figure 12. Principales voies de conversion de l'équilibre redox NAD^+/NADH (Ma et *al.*, 2009).

Suite à ces observations, une stratégie d'alimentation du réacteur en glucose, basée sur le contrôle du pH en fin de phase de croissance, appelée HYPDOG (High-end pH-controlled delivery of glucose) a été récemment proposée (Gagnon et *al.*, 2011). Lorsque les cellules consomment du lactate, le pH extracellulaire s'alcalinise ce qui déclenche un ajout de glucose. Puis, lorsque les cellules produisent du lactate, le pH s'acidifie provoquant l'arrêt de la pompe d'alimentation du glucose. Ce système permet d'ajuster la concentration de glucose de manière très fine et de maintenir l'équilibre du métabolisme énergétique. Les résultats, obtenus à différentes échelles et avec différentes lignées cellulaires, mettent en évidence l'allongement de la durée de la culture, en maintenant une faible vitesse de croissance, mais en aboutissant à l'augmentation de la densité cellulaire et de la production de protéines recombinantes.

2.2- Mort des cellules en bioréacteur

A l'origine, les mécanismes de la mort cellulaire étaient peu considérés lors de la mise en œuvre des procédés de culture de cellules animales. Pourtant, de nombreux facteurs, propres aux procédés de culture de cellules animales en bioréacteur sont à l'origine de la mort cellulaire. Aussi, depuis une quinzaine d'années, les dommages créés par la mise en

culture des cellules sont davantage étudiés. Les résultats ont mis en évidence que les cellules en culture peuvent emprunter deux mécanismes de mort : la nécrose et l'apoptose (Figure 13) (Arden & Betenbaugh, 2006). La compréhension de ces mécanismes a permis d'optimiser les performances des procédés en: (i) allongeant la durée de vie des cultures, (ii) réduisant la quantité de protéases dans le milieu extracellulaire et (iii) améliorant les opérations de purification. Dans cette partie, les deux mécanismes de mort cellulaire sont présentés, ainsi que les différents paramètres opératoires du procédé qui peuvent les influencer.

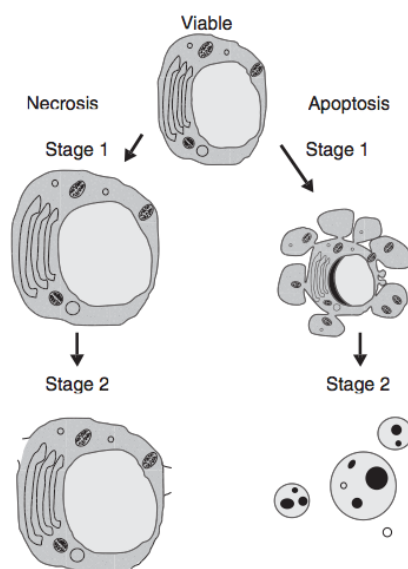


Figure 13. Caractéristiques morphologiques de la mort cellulaire par apoptose et nécrose (Al- Rubeai et *al.*, 2009).

2.2.1- Mécanismes de mort des cellules de mammifères

2.2.1.1- Nécrose

La nécrose est un phénomène de mort cellulaire accidentelle et brutale causée par des facteurs extérieurs à la cellule. L'intégrité de la membrane est alors altérée. Perméable, elle ne joue plus son rôle de barrière, ce qui se traduit par un gonflement aboutissant à la lyse cellulaire (Figure 13 et Figure 14). La lyse cellulaire entraîne la libération du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire. *In vivo*, ce phénomène provoque une réaction inflammatoire des tissus, alors que *in vitro* le relargage des enzymes du lysosome et, plus spécifiquement des protéases, peut être responsable de la dégradation des protéines recombinantes (Hansen et *al.*, 1997). La lyse cellulaire peut être quantifiée au cours du

procédé par l'analyse de l'activité de la LDH dans le milieu extracellulaire (Goergen et *al.*, 1993 ; Godoy- Silva et *al.*, 2009).

2.2.1.2- Apoptose

L'apoptose est une réponse physiologique à un stimulus initialement non létal qui active une cascade de réactions moléculaires, mettant en jeu des enzymes protéolytiques appelées caspases et qui aboutit à la mort cellulaire en quelques heures (Arden & Betenbaugh, 2006). L'apoptose est donc une mort programmée par la cellule, considérée *in vivo* comme un mécanisme de survie cellulaire. Les premières étapes de l'apoptose conduisent à la condensation du cytoplasme, alors que les organites restent intacts. Un changement morphologique de la cellule est alors observé, notamment un rétrécissement du corps cellulaire avec des bourgeonnements (Figure 13 et Figure 14). Puis, les cellules sont fragmentées en corps apoptotiques. *In vivo*, les macrophages reconnaissent ces corps apoptotiques grâce à la modification des protéines de leur membrane et les phagocytent ce qui évite une réaction inflammatoire. En revanche, *in vitro* les corps apoptotiques peuvent se lyser si le procédé se prolonge (Arden & Betenbaugh, 2006).

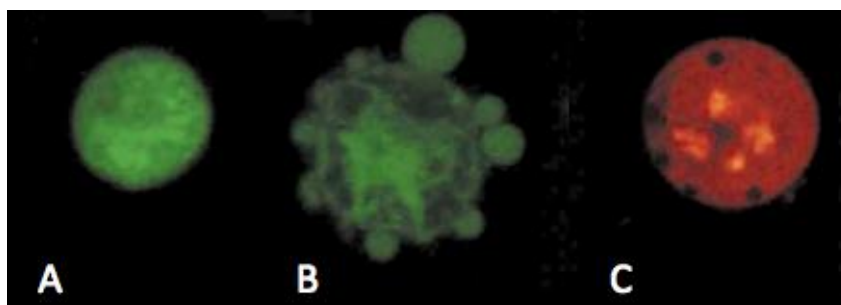


Figure 14. Images par microscopie fluorescence de cellules d'hybridomes murins colorées avec du bromide d'éthidium et de l'acridine orange : (A) cellule viable, (B) cellule apoptotique et (N) cellule nécrotique (Tintó et *al.*, 2002).

2.2.2- Stratégies pour ralentir les phénomènes de la mort cellulaire en bioréacteur

L'exposition brutale des cellules à des stress environnementaux conduit généralement à la mort cellulaire par nécrose, alors qu'une exposition longue à des niveaux plus bas de stress externes induit préférentiellement l'apoptose (Al- Rubeai et *al.*, 2009 ; Tanzeglock et *al.*, 2009). La culture de cellules animales en bioréacteur est à l'origine de nombreux stress environnementaux responsables de la mort cellulaire (Figure 15) qui peuvent être classés en quatre groupes : (i) environnement hydrodynamique, (ii) accumulation de

métabolites, (iii) déplétion en nutriments et oxygène, valeurs sous-optimales du pH et de la température et (iv) facteurs intracellulaires. L'identification de ces stress a permis de proposer diverses stratégies pour l'amélioration des performances de ces procédés.

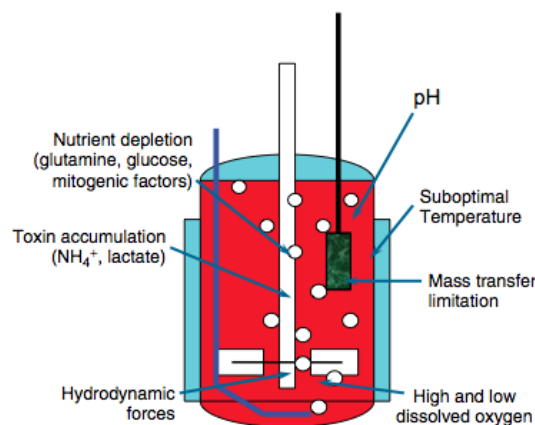


Figure 15. Facteurs favorisant la mort cellulaire en bioréacteur (Al- Rubeai et *al.*, 1995).

2.2.2.1- Contraintes hydrodynamiques

L'aération et l'agitation mécanique sont nécessaires à l'apport de l'oxygène pour assurer un bon transfert de matière entre les cellules et leur environnement. Cependant, les cellules de mammifères ne possèdent pas de paroi cellulaire comme les bactéries et sont beaucoup plus grosses que celles-ci. Autant d'inconvénients qui les rendent beaucoup plus vulnérables aux contraintes hydrodynamiques. En particulier, les contraintes de cisaillement, les interfaces bulles de gaz/cellules et l'explosion des bulles en surface ont été corrélées à la mort cellulaire (Nienow et *al.*, 2006 ; Hu et *al.*, 2011). Selon la valeur de la puissance dissipée engendrée par l'agitation, un phénomène de mort par nécrose ou par apoptose est observé (Al-Rubeai et *al.*, 1995 ; Tanzeglock et *al.*, 2009). L'ajout d'agents, tels que des tensio-actifs (pluronic F-68, dextran...) ou des protéines (albumine, sérum...) protège les cellules des contraintes hydrodynamiques en formant une couche protectrice à la surface de la membrane cellulaire (Tharmalingam et *al.*, 2008 ; Legazpi et *al.*, 2009).

2.2.2.2- Accumulation de métabolites

L'ajout des principaux métabolites, tels que le lactate et les ions ammonium, dans une culture d'hybridomes ou de myélomes murins a mis en évidence leurs effets délétères sur les cellules en favorisant l'apparition de cellules nécrotiques (Mercille & Massie, 1994). La présence d'autres métabolites, tels que le glutathion oxydé, l'adénosine monophosphate (AMP) et la guanosine monophosphate (GMP) entraîne quant à elle, la mort cellulaire par

apoptose (Chong et *al.*, 2011). De plus, l'augmentation de l'osmolarité en cours de culture a été directement reliée à l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques (deZengotita et *al.*, 2002).

2.2.2.3- Déplétion en nutriments et en oxygène dissous

La déplétion en nutriments peut survenir en fin de culture d'un procédé discontinu, mais également lorsque le système de culture est insuffisamment homogène. La glutamine, peu stable et assimilée à une vitesse élevée, est la première à avoir été identifiée comme responsable de la mort de cellules d'hybridomes par apoptose (Tintó et *al.*, 2002). Depuis, de nombreuses études ont montré que la déplétion du milieu de culture en acides aminés, glucose, vitamines, sels inorganiques et oxygène induit aussi la mort cellulaire par apoptose (Perreault & Lemieux, 1993 ; Mercille & Massie, 1994 ; Al-Rubeai et *al.*, 1995 ; Simpson et *al.*, 1998 ; Hwang & Lee, 2008). De même, la suppression du sérum peut provoquer une mort cellulaire importante par apoptose ou nécrose (Al-Rubeai et *al.* 2009 ; Quesney et *al.*, 2001). Outre l'ajout des nutriments limitants au cours de la culture, des approches par génie métabolique ont permis de ralentir l'induction de l'apoptose. Par exemple, des cellules CHO transfectées par des gènes de la famille de Bcl-2 ont montré une viabilité plus élevée que les cellules non transfectées lors de culture sous conditions stressantes (déplétion en nutriments ou en oxygène dissous) (Hwang & Lee, 2008).

2.2.2.4- Facteurs intracellulaires

Contrairement à la mort par nécrose, le phénomène d'apoptose peut être généré par des facteurs internes à la cellule, car il est contrôlé par une cascade de réactions via l'interaction de ligands et de récepteurs. Ainsi, l'absence de certaines hormones (EGF) peut aboutir à l'activation des caspases, alors que la présence de certains ligands peut induire l'apoptose via des récepteurs spécifiques comme le système Fas (Raff, 1992 ; Joyner et *al.*, 2011). L'ajout de certaines molécules dans le milieu de culture tels que des peptides (Franěk & Fussenegger, 2005), des peptides modifiés (N-acétyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldéhyde ou benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluorométhyl-cetone) (Tintó et *al.*, 2002) ou la rapamycine (Balcarcel & Stephanopoulos, 2001) a permis de diminuer l'apoptose cellulaire. D'autre part, les espèces réactives de l'oxygène (ROS), produites lors d'une forte activité mitochondriale, sont également connues pour induire l'apoptose des cellules (Matés et *al.*, 2008). Aussi, l'ajout d'antioxydants dans le milieu de culture prévient l'apoptose (Chang et *al.*, 1999 ; Yun et *al.*, 2001). De plus, quelques études ont

rapporté l'existence d'un stress provoquant l'apoptose dans le réticulum endoplasmique. Le déséquilibre entre la vitesse de production des protéines nouvellement synthétisées et la capacité du réticulum endoplasmique à assurer la maturation conformationnelle en serait à l'origine (Cudna & Dickson, 2003 ; Cudna & Dickson, 2006).

2.3- Croissance cellulaire et production de protéines recombinantes

Les conditions de culture favorisant la croissance cellulaire et la production de protéines recombinantes ne sont, a priori, pas les mêmes. Afin d'améliorer la concentration maximale en protéines recombinantes, il est donc souvent nécessaire de déterminer un compromis entre les conditions optimales requises pour la croissance cellulaire et pour la production de protéines recombinantes (Sunley & Butler, 2010).

2.3.1- Cycle cellulaire

2.3.1.1- Description

Le cycle cellulaire est le processus qui permet la division des cellules. Il est composé de l'interphase, durant laquelle la cellule prépare sa division, et de la phase mitotique (phase M) qui aboutit à la formation des deux cellules filles. L'interphase est constituée de trois étapes, la phase S de synthèse de l'ADN et les phases G1 (Gap 1) et G2 (Gap 2) qui permettent respectivement la préparation des phases S et M (Figure 16). Chez les cellules dites « normales », chaque phase du cycle est régulée par un réseau complexe de kinases, inhibiteurs et autres molécules de signalisation. Des points de surveillance sont constamment sollicités afin d'arrêter la division cellulaire à la moindre anomalie (Kastan & Bartek, 2004). En revanche, les cellules cancéreuses possèdent un cycle cellulaire dérégulé et une absence de points de surveillance (Vermeulen et *al.*, 2003 ; Williams & Stoeber, 2012). Ainsi, la vitesse de croissance élevée des lignées continues pourrait s'expliquer par une dérégulation du cycle cellulaire, similaire à celle observée chez les cellules cancéreuses (Seth et *al.*, 2006 ; O'Callaghan & James, 2008). Cependant, en l'absence de facteurs mitogènes (insuline, facteurs de croissance, cytokines...) ou lorsque l'environnement devient inhibiteur pour la prolifération cellulaire (déchets toxiques, déplétion en nutriments, cofacteurs...), les cellules en prolifération entrent dans une phase stationnaire appelée G0 (Seth et *al.*, 2006 ; Williams & Stoeber, 2011). En général, cette transition se fait à l'issue de la phase G1 et peut être réversible (Afshari & Barrett, 1994).

Alors que ceci est synonyme de l'arrêt de la division cellulaire, des travaux mettent en évidence l'intérêt de bloquer la transition des cellules de la phase G1 à la phase S pour améliorer la production spécifique de protéines recombinantes (Ibarra et *al.*, 2003). En effet, les cellules en phase G1/G0 démontrent une forte activité de synthèse (Carvalho et *al.*, 2003 ; Dez & Tollervey, 2004).

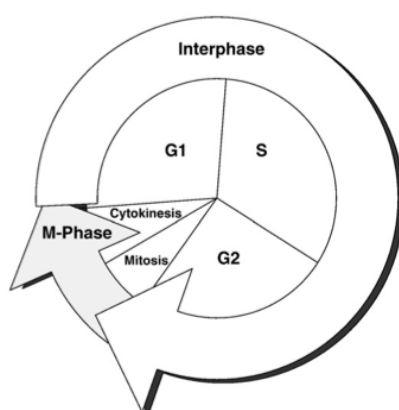


Figure 16. Cycle cellulaire (Sunley & Butler, 2010).

2.3.1.2- Stratégies d'amélioration de la productivité par la maîtrise du cycle cellulaire

Le ralentissement de la prolifération cellulaire pour la stimulation de la production spécifique de protéines recombinantes a fait l'objet de nombreuses études (Sunley & Butler, 2010). Bien que les mécanismes à l'échelle cellulaire soient peu connus, les travaux ont abouti à de nombreuses stratégies de conduite de procédé couramment utilisées pour améliorer les rendements de production. En début de culture, les conditions propices à la prolifération cellulaire sont maintenues pour obtenir une grande quantité de cellules dans un temps court. Puis, la prolifération est inhibée en favorisant la transition de la phase G1 à G0, ce qui permet d'augmenter la productivité des cellules. Différents paramètres de l'environnement de culture s'avèrent être efficaces pour bloquer la prolifération des cellules : la présence d'inhibiteurs chimiques tels que le sodium butyrate (Jiang & Sharfstein, 2008), la température (Thaisuchat et *al.*, 2011), l'osmolarité (Ho et *al.*, 2006) et le pH (Yoon et *al.*, 2006).

2.3.2- Synthèse des protéines

La synthèse des protéines débute dans le noyau cellulaire par la transcription de l'ADN en ARN messager qui est alors traduit en protéines dans le réticulum endoplasmique. Puis,

les protéines sont maturées dans le réticulum endoplasmique et le golgi pour être excrétées dans le milieu extracellulaire (Figure 17). La production spécifique des protéines recombinantes est donc fonction de divers processus cellulaires : (i) transcription, (ii) traduction, (iii) maturation post-traductionnelle et (iv) stabilité de la protéine recombinante dans le surnageant. Les étapes de traduction et maturation sont souvent restrictives pour la production de protéines via des lignées continues, alors que, *in vivo*, l'étape de transcription est finement contrôlée pour réguler la production des protéines (O'Callaghan & James, 2008).

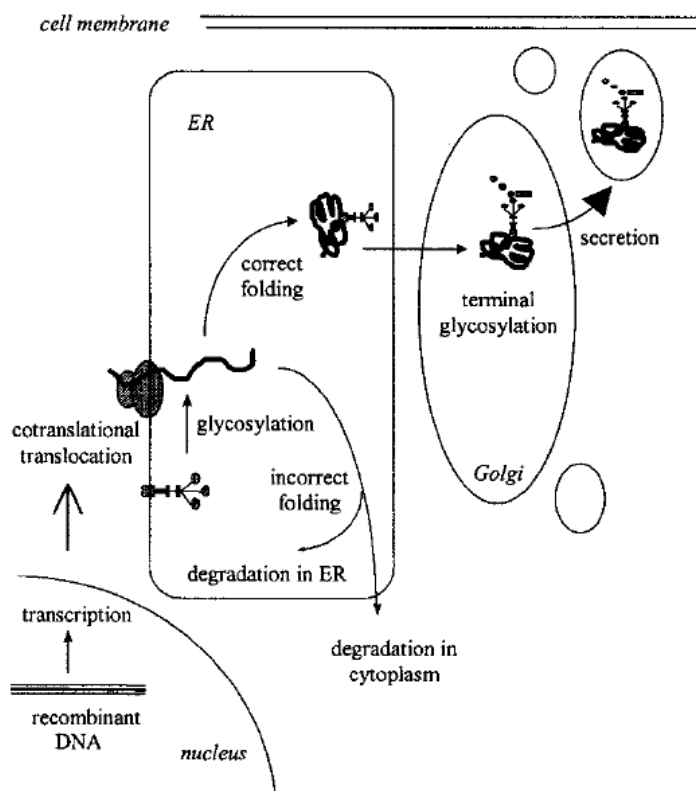


Figure 17. Synthèse et maturation des protéines (Cudna & Dickson, 2003).

La conception génétique du système d'expression est déterminante pour assurer la stabilité de la transcription. De plus, la génération de clones, exprimant en plus grande quantité les protéines clés impliquées dans les étapes de traduction et de maturation, permet aussi d'améliorer les rendements de production (Barnes & Dickson, 2006). Parallèlement, l'environnement des cellules cultivées en bioréacteur est surtout étudié pour son influence sur la maturation, telle que la glycosylation (Hossler et *al.*, 2009), et sur la stabilité des protéines dans le milieu de culture (Hansen et *al.*, 1997). Néanmoins, la composition du milieu de culture peut aussi améliorer les étapes de transcription et de traduction par

l'apport de nutriments tels que les acides aminés (Xing et *al.*, 2011) ou des facteurs spécifiques comme des peptides (Stern et *al.*, 2006).

2.4- Conclusion

Dans cette partie, l'interaction entre l'environnement des cellules en culture, défini par des paramètres mécaniques, physico-chimiques et biochimiques, et les comportements physiologiques et métaboliques des cellules a été discutée. L'étude a ainsi permis de caractériser la fonction des différents composés du milieu de culture (protection contre les contraintes hydrodynamiques, nutrition, facteurs spécifiques) et leurs principaux modes d'action sur les mécanismes cellulaires (métabolisme énergétique, prolifération, mort cellulaire, production de protéines recombinantes) (Figure 18). Elle a aussi présenté diverses stratégies de conduite pour améliorer les performances de cultures.

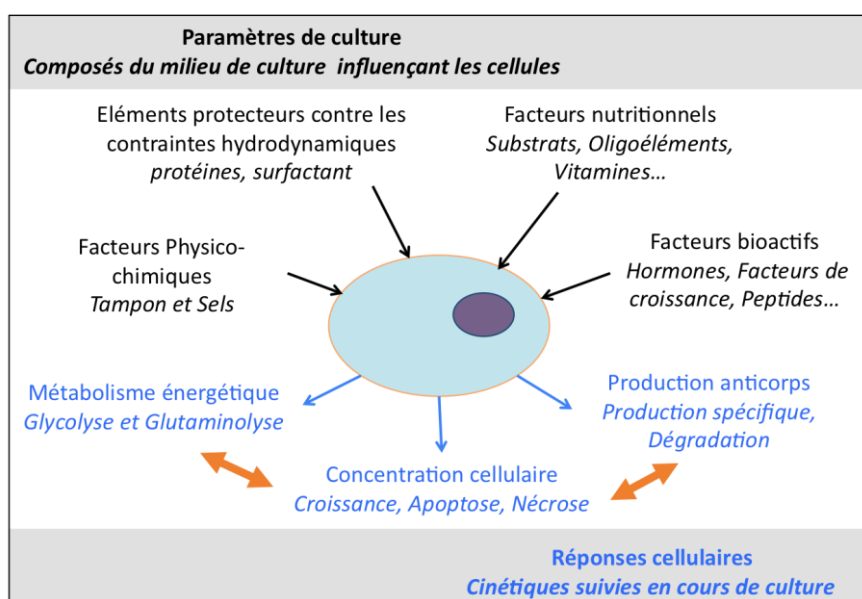


Figure 18. Interactions entre les réponses cellulaires et les paramètres de culture reliés à la composition du milieu de culture.

Sur la base de cette étude, la partie suivante présente de manière plus spécifique, l'influence de l'ajout d'hydrolysats dans le milieu de culture sur les performances du procédé de culture de cellules pour la production de protéines recombinantes.

3- Influence des hydrolysats sur les performances du procédé de culture de cellules animales

3.1- Hydrolysats utilisés en culture de cellules animales

3.1.1- Matières premières des hydrolysats

Les premiers hydrolysats utilisés pour substituer le sérum du milieu de culture de cellules de mammifères et d'insectes étaient d'origine animale, tels que la primatone, la bacto peptone (viande), la lactalbumine ou la N-Z Amine (protéines de lait). Aujourd'hui encore, certains de ces hydrolysats sont utilisés pour améliorer les rendements de production de procédés industriels (Tableau 5). Cependant, afin de répondre aux contraintes réglementaires, l'utilisation d'hydrolysats d'origine végétale ou de levure s'est considérablement développée. De multiples sources végétales sont utilisées telles que le soja, le blé, le coton, le riz, le pois chiche ou le colza (Tableau 5). À titre d'exemple, la société BD Bioscience propose un catalogue de 25 hydrolysats d'origine animale et de 14 hydrolysats sans composés d'origine animale, dont 6 à partir d'extraits de levure (EXL).

Tableau 5. Exemples d'utilisation d'hydrolysats dans des procédés industriels (Pasupuleti et *al.*, 2010).

Entreprise	Hydrolysats		Molécule thérapeutique	Cellule hôte	Année
	Nom	Origine			
Genentech	Primatone	Viande	IGF-IR	Cellules d'insecte	2009
Astra Zeneca	HyPep 1510	Soja	IgE	HEK-293	2009
Polymun Scientific	HyPep 1510	Soja	Vaccin grippe	VERO	2009
Invitrogen	HyPeps, HyYest 444	Végétale, Levure	/	VERO	2009
Baxter	HyPep 1510	Soja	/	Multiple	2008
Merck	HyPep 1510, HyPep 4601	Soja, Blé	Fc-EPO	BHK	2008
Amgen	Peptone	Soja	Fab	CHO	2008
Immunex & Amgen	N-Z-Soy, Hy-Soy	Soja	rTNF	CHO	2007
Genentech	Primatone	Viande	P37 protéines	CHO	2007
Novo Nordisk	HyPep 4402, HyPep 4605	Blé	Facteur VII	BHK	2006
BASF	HyPep, Edamin S	Lait	/	Cellules d'insectes	2005
Genentech	Primatone	Viande	Glycoprotéine	CHO	2003
Chugai	HyPep 4402, HyPep 4601	Blé	/	CHO	2002
Wyeth/AHP	N-Z-Amine A	Lait	Vaccin	VERO	1999
Roche	Primatone	Viande	Anti-PDGF	CHO	1999
Genzyme	Primatone	Viande	/	Hybridome	1997

La sélection de la matière première est une étape importante pour la production d'un hydrolysate de qualité. Il est nécessaire de s'assurer de la disponibilité et de la constance de sa production. Parmi ces différentes matières premières, les levures ont l'avantage d'être produites au cours d'un procédé bien contrôlé. Leur production n'est donc pas soumise aux fluctuations du climat, de la géographie ou des saisons, comme dans le cas des sources végétales.

3.1.2- Procédés de production des hydrolysats

Les hydrolysats correspondent à la fraction soluble d'une matière première hydrolysée. Les hydrolysats sont appelés peptones ou extraits s'ils sont issus de l'hydrolyse respectivement de fractions de protéines ou de la matière première totale. Les principales étapes de production des hydrolysats sont les suivantes (Pasupuleti & Braum, 2010) :

- Préparation de la matière première : broyage, solubilisation ;
- Pour les peptones, extraction de la matière protéique : précipitation, centrifugation ;
- Hydrolyse : acide, alcaline et plus généralement enzymatique avec des protéases ou d'autres enzymes permettant de dégrader la matière non protéique ;
- Séparation : centrifugation, décantation ;
- Filtration : ultrafiltration (10 ou 50 kDa) pour supprimer les endotoxines et clarifier le produit ;
- Séchage.

Parmi les procédés de production d'hydrolysats, l'étape d'hydrolyse des EXL est spécifique. En effet, les levures, soumises à un stress externe (choc osmotique, montée en température...), s'autolysent spontanément avec leur propre matériel enzymatique. Les EXL ne nécessitent donc pas l'ajout d'enzymes externes. Par contre, les peptones de levure sont produites à partir de protéines de levure, hydrolysées avec des enzymes exogènes. Les hydrolysats issus d'une même matière première peuvent donc être très variés selon les paramètres opératoires des étapes du procédé de production.

3.1.3- Caractérisation des hydrolysats

Les méthodes physico-chimiques permettent de caractériser le taux d'humidité des poudres, le pH des hydrolysats, leur solubilité et la quantité de matière minérale. D'autre part, les méthodes biochimiques classiques, principalement enzymatiques ou par chromatographie liquide haute performance (CLHP), renseignent sur la composition de la

matière organique des hydrolysats : glucides, protéines, acides nucléiques, lipides ou vitamines. Ces méthodes permettent une détection aisée des molécules sous forme de monomères : monosaccharides, acides aminés, bases azotées ou vitamines. Par contre, lorsque ces molécules sont polymérisées, leur identification est plus complexe. Elle nécessite le couplage d'une séparation par HPLC en phase inverse, pour isoler les molécules selon leur hydrophobie, à une analyse par spectrométrie de masse, pour identifier leur masse. De plus, des méthodes de fragmentation des molécules sont nécessaires pour déterminer leur séquence. En revanche, une chromatographie d'exclusion de taille couplée à un détecteur UV permet de caractériser le poids moléculaire des molécules à partir d'un étalonnage de la colonne.

3.1.3.1- Peptides et acides aminés

Les peptones, produites à partir de l'hydrolyse enzymatique de protéines, contiennent un pourcentage élevé d'acides aminés et de peptides allant de 50 à 90 % (Pasupuleti & Braum, 2010). Les EXL en contiennent une proportion légèrement inférieure comprise entre 50 et 80 % (Sommer, 1998 ; Shen et *al.*, 2007). La distribution des poids moléculaires des peptides est directement reliée aux conditions opératoires de l'hydrolyse telles que la durée, le pH et la température (Chabanon et *al.*, 2008). Plus de 90 % des peptides contenus dans les peptones commercialisées pour la culture de cellules animales, ont un poids moléculaire inférieur à 1000 Da (Tableau 6). La majorité de ces peptides est donc composée de moins de 13 acides aminés et sont essentiellement des di et tri-peptides (Heidemann et *al.*, 2000). La séquence des peptides dépend, non seulement, de la nature des enzymes qui hydrolysent les protéines à des sites spécifiques, mais aussi, de l'origine de la matière première. La diversité des peptides, mélangés aux autres molécules de l'hydrolysats, rend leur identification difficile. En revanche, la composition en acides aminés totaux et libres est quantifiable. Les hydrolysats contiennent globalement une faible quantité d'acides aminés libres, exceptée la peptone de blé qui en compte 28 % (Tableau 6). Les EXL contiennent aussi une quantité importante d'acides aminés libres, de l'ordre de 30 % (Shen et *al.*, 2007).

Tableau 6. Exemple de la distribution des poids moléculaires d'hydrolysats d'origine végétale (Burteau et *al.*, 2003).

Plant origin	Free amino acid content (% of total)	Molecular weight distribution (% of total oligopeptides)			
		<1 kDa	1–5 kDa	5–10 kDa	>10 kDa
Rice 1	3.0	94.0	4.0	2.0	0
Rice 2	2.0	96.8	2.2	0.4	0.6
Wheat 1	28.0	97.4	2.4	0.1	0.1
Wheat 2	2.0	94.9	4.1	0.5	0.5
Soy 1	13.0	100	0	0	0
Soy 2	Unavailable	Unavailable	Unavailable	Unavailable	Unavailable
Pea	0.7	89.6	9.6	0.7	0.1
Cotton seed	8.0	91.5	7.7	0.7	0.1

3.1.3.2- Glucides

En quantité, les glucides représentent la deuxième famille de biomolécules contenues dans les hydrolysats avec un pourcentage de 1 à 20 % (Tableau 7) (Shen et *al.*, 2007 ; Michiels et *al.*, 2011). Ils sont sous forme de monomères (glucose, mannose...), de disaccharides (tréhalose, saccharose) ou de polysaccharides (cellulose, amidon...). Les hydrolysats de levure ont la particularité de contenir du tréhalose (Zhang et *al.*, 2003). Cependant, très peu de données existent sur la nature des glucides présents dans les hydrolysats utilisés pour la culture de cellules animales.

Tableau 7. Composition d'une peptone de soja par (Michiels et *al.*, 2011).

Classes of molecule	Estimated content	Method used
Peptides/amino acids	60% ± 5%	Acid hydrolysis followed by ninhydrin reaction. Data conformed to manufacturer data (addition of each amino acid concentration)
Carbohydrates	20% ± 5%	Anthrone reaction
Salts	10%	Manufacturer indications (addition of individual salt concentrations)
Phospholipids	0.0012%	Chloroform extraction followed by complexation between phospholipids and ammonium ferrothiocyanate
Maillard reaction products	Below detection level (<0.1%)	Barbituric reaction in p-toluidine solvent
Polyphenols	Below detection level (<0.05%)	HPLC-DAD-MS/MS analysis

3.1.3.3- Minéraux

Les hydrolysats contiennent jusqu'à 15 % de matière minérale (Tableau 7) (Michiels et *al.*, 2011). Parmi cette matière, le potassium et le phosphore sont les plus abondants.

D'autres minéraux tels que le sodium, le calcium, le magnésium, le sélénium, le zinc, le fer et le chlorure, sont présents à des concentrations de l'ordre du mg/kg.

3.1.3.4- Acides nucléiques

La quantité d'acides nucléiques est rarement déterminée. Pourtant, une étude a montré que la présence d'acides nucléiques dans un EXL ajouté dans un procédé de culture pouvait contaminer la protéine recombinante produite (Dick et *al.*, 2009). En effet, les extraits, issus de l'hydrolyse de cellules entières, sont plus susceptibles de contenir des acides nucléiques issus de l'ADN ou de l'ARN cellulaire qui représentent environ 5 % de la matière sèche d'une cellule. Tout comme les peptides et les glucides, les acides nucléiques peuvent être sous forme plus ou moins dégradée : bases azotées, nucléosides, nucléotides, ADN ou ARN.

3.1.3.5- Vitamines, lipides et phénols

Par rapport aux peptones, les EXL ont la particularité de contenir des vitamines hydrosolubles (B1, B2, B5, B6, B8, B9, B12 et PP) à des concentrations de l'ordre du mg/kg. Lors de la production des hydrolysats, seule la fraction soluble en phase aqueuse est sélectionnée, ce qui implique une très faible quantité de lipides. Par exemple, une concentration de 0,012 mg/g de phospholipides a été mesurée dans une peptone de soja (Tableau 7). De même, une faible proportion de composés phénoliques est présente dans les peptones d'origine végétale (Michiels et *al.*, 2011 ; Farges-Haddani et *al.*, 2006).

3.2- Influence de l'ajout d'hydrolysats dans un procédé de culture cellulaire

3.2.1- Croissance cellulaire et production d'anticorps recombinants

3.2.1.1- Cas des peptones végétales

En 1995, Keen et Rapson publient les premiers résultats démontrant l'efficacité d'hydrolysats protéiques de soja sur la croissance de cellules CHO (Keen & Rapson, 1995). La nécessité de supprimer toute substance d'origine animale des milieux de culture a alors suscité un vif intérêt pour ces résultats. Depuis, plusieurs travaux ont étudié l'influence de peptones d'origine végétale pour stimuler la croissance de cellules de mammifères et la production de protéines recombinantes (Heidemann et *al.*, 2000 ; Franek et *al.*, 2000 ; Burteau et *al.*, 2003 ; Ballez et *al.*, 2004 ; Mols et *al.*, 2004 ; Farges et *al.*,

2008 ; Kim & Lee, 2009 ; Michiels et *al.*, 2011). Bien que l'influence des peptones soit largement dépendante du milieu de base (Michiels et *al.*, 2011), des effets convergents peuvent être déduits des différentes études.

Les paramètres de performances fréquemment étudiés pour déterminer le bénéfice d'une peptone dans un procédé de culture cellulaire sont : la vitesse spécifique de croissance, la concentration maximale de cellules viables, la vitesse spécifique de production et la concentration maximale de protéines recombinantes. Le Tableau 8 présente l'influence de peptones sur ces paramètres (Sung et *al.*, 2004). Les peptones montrent peu d'effet significatif sur la vitesse de croissance, mais améliorent la concentration maximale de cellules viables de plus de 50 % par rapport au milieu de référence. Ces résultats sont représentatifs de ceux de la majorité des études (Heidemann et *al.*, 2000 ; Sung et *al.*, 2004 ; Farges et *al.*, 2008 ; Kim & Lee, 2009), bien que, dans certains cas, les hydrolysats n'améliorent que faiblement la concentration maximale de cellules viables (Burteau et *al.*, 2003 ; Michiels et *al.*, 2011).

Tableau 8. Comparaison de l'effet de différents milieux de culture (milieu sans sérum (SFM), sans sérum avec extrait de levure (SFM+YH), peptones de soja (SH), de blé (WGH) ou de riz (RH), milieu avec sérum (IMDM + 10% dFBS) et sans sérum (CHO-S-SFM II^a), sur le vitesse spécifique de croissance (μ), la production spécifique de protéine recombinante (q_{hTPO}), la concentration maximale de cellules viables et de protéine recombinante, lors de cultures de cellules CHO en fioles d'Erlenmeyer (Sung et *al.*, 2004).

Medium	μ (day ⁻¹)	q_{hTPO} ($\mu\text{g (10}^6\text{cells)}^{-1}\text{ day}^{-1}$)	Maximum viable cell concentration (10 ⁶ cells ml ⁻¹)	Maximum hTPO concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
SFM	0.57±0.12	1.14±0.01	0.99±0.05	3.50±0.03
SFM + YH	0.69±0.09	4.49±0.87	1.50±0.08	40.41±4.12
SFM + SH	0.61±0.03	1.46±0.20	1.67±0.25	10.98±0.95
SFM + WGH	0.66±0.06	2.56±0.08	2.42±0.17	13.23±0.01
SFM + RH	0.58±0.01	1.12±0.10	1.76±0.08	7.10±0.31
IMDM + 10% dFBS	0.77±0.09	2.97±0.74	4.42±0.36	14.42±2.31
CHO-S-SFM II ^a	0.60±0.04	1.58±0.34	1.10±0.39	6.18±0.64

La concentration maximale de protéines recombinantes est influencée par plusieurs paramètres : (i) la concentration de cellules viables, (ii) la durée de culture, (iii) la vitesse de production et (iv) la stabilité des protéines. Or, l'ajout de peptones permet généralement d'augmenter la quantité de cellules viables et par conséquent la concentration maximale de protéines recombinantes (Sung et *al.*, 2004 ; Farges et *al.*, 2008 ; Kim & Lee, 2009). De plus, certaines peptones (blé et soja) stimulent aussi la production spécifique de protéines recombinantes (Tableau 8) (Burteau et *al.*, 2003 ; Sung et *al.*, 2004 ; Kim & Lee, 2009). Par contre, les peptones de soja ne protègent pas les protéines recombinantes de la dégradation induite par l'action des protéases cellulaires (Heidemann et *al.*, 2000 ; Michiels et *al.*, 2011). De plus, le procédé de fabrication des peptones peut être lui-même

à l'origine de contaminants protéolytiques, ce qui impose un contrôle étroit de ce procédé (Mols et *al.*, 2004). Enfin, des travaux ont montré que l'ajout de peptones n'affecte pas la glycosylation des protéines recombinantes produites (Heidemann et *al.*, 1999 ; Burteau et *al.*, 2003 ; Michiels et *al.*, 2011).

3.2.1.2- Cas des extraits et peptones de levure

Dès les années 1970, le milieu de base Grace, supplémenté par 10 % de SVF, est enrichi par l'ajout d'hydrolysats de levure (3,33 g/L) et de lactalbumine pour améliorer la croissance de cellules d'insectes (Hink, 1970). Depuis, plusieurs travaux ont confirmé l'efficacité d'EXL (4 à 16 g/L) pour substituer le SVF, tout en assurant les mêmes performances de culture dans le cas des cellules d'insectes (Vaughn & Fan, 1997 ; Donaldson & Shuler, 1998 ; Batista et *al.*, 2008).

L'utilisation d'EXL pour la culture de cellules de mammifères est plus récente (Liu et *al.*, 2001 ; Sung et *al.*, 2004 ; Kim et *al.*, 2006 ; Kim & Lee, 2009). Parmi ces travaux, seuls deux étudient l'influence spécifique de l'ajout d'EXL par rapport à un milieu de référence (Sung et *al.*, 2004 ; Kim & Lee, 2009). Selon les études, l'EXL, soit augmente la vitesse de croissance et la concentration maximale de cellules (Tableau 8) (Sung et *al.*, 2004), soit les diminue (Kim & Lee, 2009). Cependant, dans les deux études, la viabilité de la culture supplémentée en EXL est allongée. De même, la vitesse spécifique de production et la concentration de protéines produites sont améliorées. Différentes hypothèses ont été soulevées comme l'augmentation de l'osmolarité, l'inhibition des protéases ou la complémentation du milieu en acides aminés (Sung et *al.*, 2004). Néanmoins, aucune n'a permis d'expliquer l'augmentation de la production spécifique de protéines recombinantes suggérant un effet promoteur de certains peptides sur la synthèse de protéines, résultat déjà observé dans une autre étude (Franek et *al.*, 2003). En effet, le taux global d'ARNm des cellules cultivées en présence d'EXL augmente (Sung et *al.*, 2004). Par conséquent, l'augmentation de la production spécifique, conjuguée à l'allongement de la survie des cellules font progresser la concentration maximale en protéines recombinantes. Par ailleurs, l'ajout d'EXL en culture n'affecte pas la glycosylation des protéines recombinantes (Sung et *al.*, 2004). Cependant, une étude a caractérisé les impuretés potentielles dans une protéine recombinante purifiée produite dans une culture complétement en EXL (Dick et *al.*, 2009). Les analyses ont mis en évidence la présence d'acides nucléiques contaminants provenant des EXL. Or, la présence d'acides nucléiques

dans la formulation finale du produit biopharmaceutique est fortement réglementée (Sahoo et *al.*, 2009). Il serait donc intéressant d'évaluer l'influence de ces composés et d'améliorer le procédé de production des EXL pour les éliminer.

Il est à noter qu'aucun travail n'a étudié l'influence de peptones de levure dans un procédé de culture de cellules de mammifères, bien que le bénéfice de l'addition de peptones végétales et d'EXL ait été mis en évidence. Pourtant, la meilleure maîtrise des procédés de production des levures par rapport aux végétaux confère, a priori, un avantage à l'ajout de peptones de levure par rapport à l'ajout de peptones végétales.

3.2.2- Influence des hydrolysats sur le métabolisme énergétique

3.2.2.1- Métabolisme du glucose

L'ajout d'hydrolysats permet globalement d'améliorer la quantité de cellules viables sans augmenter la quantité de lactate produite, ni la quantité de glucose consommée (Burteau et *al.*, 2003 ; Ballez et *al.*, 2004 ; Chun et *al.*, 2007). Néanmoins, les vitesses spécifiques de consommation du glucose et de production de lactate, calculées lors de la phase exponentielle de croissance, sont, soient augmentées (Sung et *al.*, 2004), soient inchangées (Heidemann et *al.*, 2000 ; Burteau et *al.*, 2003), soient diminuées (Farges et *al.*, 2008). Or, la vitesse d'assimilation du glucose influence grandement l'efficacité du métabolisme énergétique (Cf paragraphe 2.1.2.1). Pourtant, seules deux études ont discuté de l'influence de l'ajout de peptones sur le rendement de production de lactate par quantité de glucose consommée ($Y_{\text{Lac/Glc}}$) de cellules de mammifères (Bonarius et *al.*, 1996 ; Farges et *al.*, 2008).

Bonarius et *al.* (1996) ont comparé le métabolisme de cellules d'hybridome cultivées en bioréacteur continu, supplémenté ou non avec une peptone de viande. L'étude du métabolisme a été basée sur le principe d'équilibre des flux du métabolisme couplé aux analyses des molécules intracellulaires et du CO_2 rejeté par les cellules. L'ajout de la peptone favorise l'entrée du pyruvate dans le cycle TCA plutôt que sa conversion en lactate (Figure 19). En revanche, la culture de cellules CHO dans un milieu de culture additionné d'une peptone de colza n'a pas modifié le rendement $Y_{\text{Lac/Glc}}$ malgré la diminution de la consommation spécifique en glucose (Farges et *al.*, 2008). Cependant, cette étude concerne uniquement la phase exponentielle de croissance. Or, les hydrolysats ont généralement un faible effet sur la vitesse maximale de croissance, mais prolongent la

phase de croissance. Par ailleurs, certains travaux rapportent une consommation du lactate, suite à la déplétion du glucose, dans des cultures supplémentées en peptones végétales, ce qui suggère l'évolution du métabolisme au cours de la culture (Burteau et *al.*, 2003 ; Ballez et *al.*, 2004 ; Babcock, 2011).

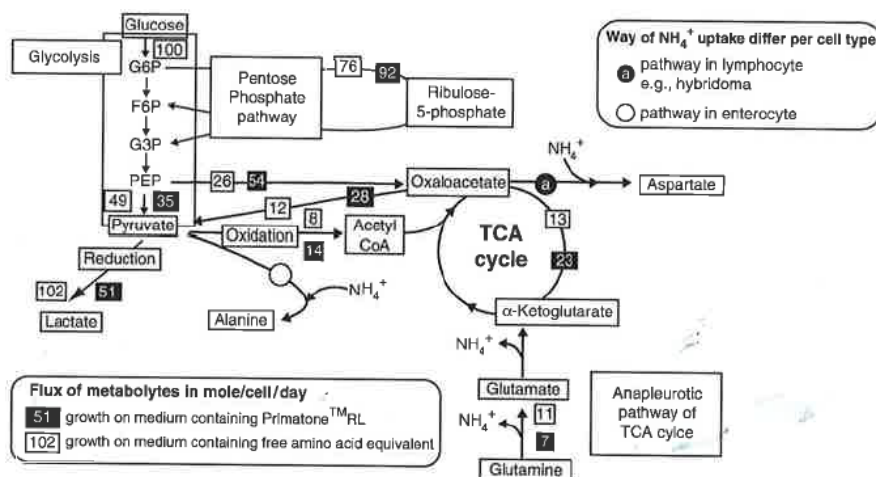


Figure 19. Influence d'une peptone de viande sur le métabolisme énergétique de cellules d'hybridomes cultivées en bioréacteur continu (Bonarius et *al.*, 1996 ; Siemensa et *al.*, 2010).

3.2.2.2- Métabolisme de la glutamine

Le peu de résultats publiés met en évidence une diminution de la consommation spécifique de glutamine en présence d'hydrolysats (Bonarius et *al.*, 1996 ; Sung et *al.*, 2004 ; Farges et *al.*, 2008) ou une absence d'effet (Heidemann et *al.*, 2000 ; Burteau et *al.*, 2003) durant la phase exponentielle de croissance. L'augmentation du flux de pyruvate vers le cycle TCA pourrait être à l'origine de la diminution de la glutaminolyse (Siemensa et *al.*, 2010). Néanmoins, l'apport d'autres sources azotées (glutamate, peptides contenant de la glutamine) pourrait également expliquer cette diminution. En effet, les hydrolysats enrichissent significativement le milieu de culture en matière azotée. D'ailleurs, l'ajout d'hydrolysats induit une augmentation de la concentration maximale d'ions ammonium en fin de culture suggérant un métabolisme actif des acides aminés (Farges et *al.*, 2008 ; Heidemann et *al.*, 2000 ; Burteau et *al.*, 2003 ; Babcock, 2011).

En résumé, il existe donc peu de connaissances sur l'évolution du métabolisme énergétique au cours de culture de cellules supplémentées par des hydrolysats. Pourtant, l'influence des hydrolysats sur les performances de production est souvent observée en fin

de phase exponentielle de croissance. Il serait donc intéressant de mieux relier l'amélioration des performances de culture à l'évolution du métabolisme énergétique.

3.3- Stratégie d'apport des hydrolysats dans les cultures

3.3.1- Effet de la concentration de l'hydrolysat

Les hydrolysats sont classiquement ajoutés à des concentrations comprises entre 1 et 5 g/L dans les milieux de culture de cellules de mammifères (Tableau 9). La concentration d'EXL semble être un paramètre critique dans le cas des cultures de cellules d'insectes (Batista et *al.*, 2008 ; Shen et *al.*, 2007). De plus, deux études ont démontré l'influence de la concentration d'hydrolysat sur les cultures de cellules de mammifères (Burteau et *al.*, 2003 ; Sung et *al.*, 2004). L'ajout d'une peptone de blé entre 0,25 et 2,5 g/L améliore les performances de culture de cellules CHO proportionnellement à la quantité de peptone (Burteau et *al.*, 2003). Par contre, à des concentrations comprises entre 5 et 10 g/L, un effet inhibiteur est observé sur la densité maximale de cellules CHO viables, alors que la production maximale d'anticorps reste peu affectée (Figure 20) (Sung et *al.*, 2004).

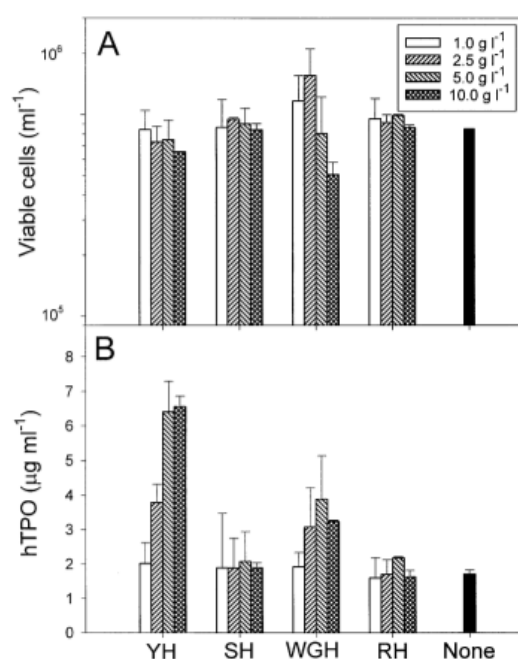


Figure 20. Influence de différentes concentrations d'hydrolysats dans un milieu de référence sur la concentration maximale de cellules CHO viables (A) et la production maximale de protéines recombinantes hTPO (B). Les hydrolysats ajoutés sont un extrait de levure (YH), une peptone de soja (SH), de blé (WGH), de riz (RH) comparé au milieu de référence (none) (Sung et *al.*, 2004).

De même, l'ajout d'une peptone de soja à des concentrations de 4 et 6 g/L est optimal pour la croissance de cellules CHO, alors qu'à 2 et 8 g/L de moins bons effets sont observés et qu'à 12 g/L la croissance est inhibée (Chun et *al.*, 2007). D'autre part, l'augmentation de la concentration d'EXL montre un effet bénéfique sur la production d'anticorps, alors qu'aucun effet n'est observé sur la croissance de cellules CHO (Figure 20) (Sung et *al.*, 2004). Cet effet apparaît proportionnel à la quantité d'EXL ajoutée dans le milieu de culture.

3.3.2- Effet de la combinaison de plusieurs hydrolysats

Les études ont mis en évidence des effets variés des différents hydrolysats sur les performances de culture (Burteau et *al.*, 2003 ; Sung et *al.*, 2004) (Tableau 9). Le mélange de plusieurs hydrolysats pourrait donc combiner ces effets pour obtenir des meilleures performances. D'ailleurs, les fabricants de milieux de culture proposent déjà des mélanges d'hydrolysats prêts à l'emploi (Kim et *al.*, 2006). Cependant, une seule étude rapporte un plan de mélanges pour démontrer l'intérêt de combiner un EXL avec des peptones de soja et de blé (Kim & Lee, 2009). Alors que le mélange des peptones de blé et soja s'avère optimal pour améliorer la croissance cellulaire, l'EXL stimule plus spécifiquement la production d'anticorps monoclonal (Figure 21).

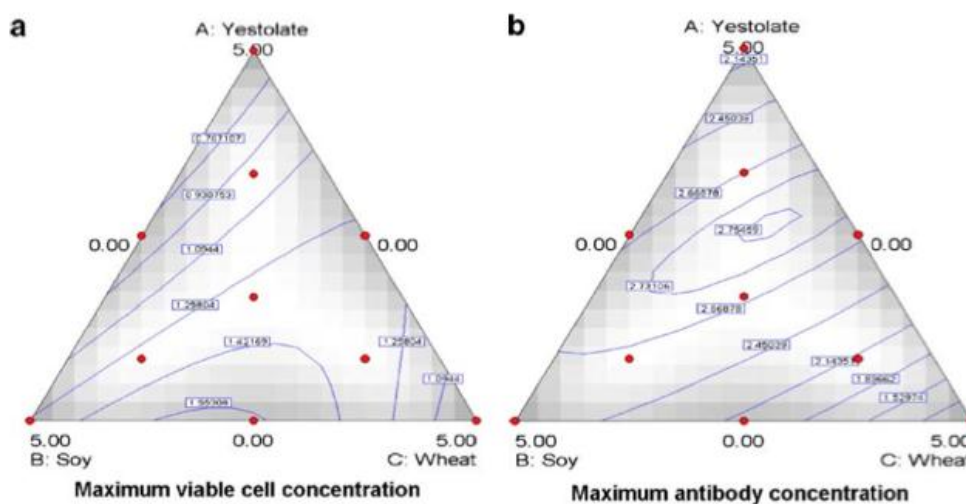


Figure 21. Influence de la combinaison de différentes concentrations d'un extrait de levure (Yeastolate) avec une peptone de soja (Soy) et de blé (Wheat) sur la concentration maximale de cellules CHO viables (a) et d'anticorps (b) (Kim & Lee, 2009).

Tableau 9. Conditions d'utilisation d'hydrolysats d'origine non animale dans une culture de cellules de mammifères ($X_{\max}$: nombre maximal de cellules viables, $P_{\max}$: production maximale de protéines recombinantes, nd : non défini).

Référence	Cellules/ Protéines recombinantes	Système de culture/ Mode d'alimentation	Origine Hydrolysats	Concentr ation (g/L)	Performance (% par rapport à milieu de référence)	
					$X_{\max}$	$P_{\max}$
Heideman n et <i>al.</i> , 2000	Hybridome IgG	Bioréacteur Continu	Soja	5	nd	+ 20 à 30
Liu et <i>al.</i> , 2001	CHO IgG	Fiole Erlenmeyer Discontinu	EXL <i>Plan multi- factoriel</i>	0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6	nd	nd
Burteau et <i>al.</i> , 2003	CHO IFN- γ	Fiole Erlenmeyer Discontinu	Riz, Soja, Coton, Pois chiche	1	+ 0 à 10	+ 0 à 20
Ballez et <i>al.</i> , 2004	CHO IFN- γ	Fiole Erlenmeyer et bioréacteur Discontinu	Blé	0,25 ; 1 ; 2	+ 0 à 40	+ 0 à 60
	CHO IFN- γ	Bioréacteur Semi- continu (renouvellement milieu à 48 h)	Riz	2	+ 25	+ 60
Mols et <i>al.</i> , 2004	CHO IFN- γ	Fiole Erlenmeyer Discontinu	Riz (deux lots)	1	+ 0	+ 30
Sung et <i>al.</i> , 2004	CHO hTPO	Fiole Erlenmeyer Discontinu	EXL Soja Blé	2 1 ; 2,5 ; 5 ; 10	+ 80	+ 0 ou 100
Franeck, 2004	Hybridomes IgG	Boîte de culture Discontinu	Riz		+ 0 à 10	+ 0
Kim et <i>al.</i> , 2006	CHO IgG	Fiole Erlenmeyer Discontinu	Blé	0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2	+ 0 à 40	+ 0 à 20
Chun et <i>al.</i> , 2007	CHO	Fiole Erlenmeyer Discontinu	Soja, Blé, EXL, Mélange non défini	5	nd	nd
Farges et <i>al.</i> , 2008	CHO IFN- γ	Fiole Erlenmeyer et bioréacteur Discontinu	Soja	2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 12	- 15 à + 40	nd
Kim & Lee, 2009	CHO IgG	Fiole Erlenmeyer Discontinu	Colza	4	+ 140	+ 400
Michiels et <i>al.</i> , 2011	CHO IFN- γ	Fiole Erlenmeyer Discontinu	EXL, Soja, Blé <i>Plan de mélanges</i>	0 à 5	+ 0 à 80	+ 0 à 180
			Soja	2	+ 0	+ 20

3.3.3- Moment de l'ajout de l'hydrolysate

Dans la plupart des études publiées, les hydrolysats sont ajoutés en début de culture (Tableau 9). Néanmoins, plus récemment, les fabricants de milieux de culture (Babcock et *al.*, 2011 ; Wilcox, 2011) et les industriels (Kochonawski et *al.*, 2011 ; Armand, 2011) ont

montré l'intérêt d'ajouter les hydrolysats en cours de procédé. En général, la concentration maximale de cellules viables n'est pas améliorée par l'ajout d'hydrolysats au cours de la phase exponentielle de croissance (Babcock et *al.*, 2011 ; Wilcox, 2011). En revanche, la mort cellulaire est retardée, ce qui aboutit à l'augmentation de la quantité de cellules viables produite au cours du procédé et donc, à une meilleure production de protéines recombinantes (Kochonawski et *al.*, 2011).

3.4- Contraintes liées à l'utilisation d'hydrolysats

Les hydrolysats présentent l'inconvénient d'être des mélanges complexes de composés non définis. Ainsi, malgré leur bénéfice sur les performances de culture, leur utilisation présente certaines contraintes. Tout d'abord, la variabilité de lot-à-lot de la composition de peptones végétales peut diminuer la reproductibilité des performances d'un procédé de culture (Luo & Chen, 2007 ; Schwartz et *al.*, 2009). En effet, les peptones végétales sont issues de plantes dont la composition varie selon le lieu de culture, le climat, la saison et les conditions de stockage. Par opposition, les hydrolysats de levure provenant d'un procédé de fermentation ne sont pas soumis à ces facteurs de variabilité. D'ailleurs, une étude a mis en évidence la reproductibilité des performances d'un procédé de culture de cellules CHO quel que soit le lot d'EXL utilisé (Sung et *al.*, 2004). Cependant, tous les hydrolysats sont issus d'un procédé de production (extraction, séparation, hydrolyse, purification) dont la maîtrise des paramètres opératoires ne permet d'assurer des spécifications de produits que dans un certain intervalle de confiance. De plus, les molécules actives n'étant pas identifiées, il est difficile de garantir une bonne reproductibilité des effets des hydrolysats. Pour mieux prédire l'activité des lots d'une peptone de soja, une étude a constitué une bibliothèque d'empreintes des différents lots par spectrométrie à résonance magnétique nucléaire (Luo et *al.*, 2007). Ces empreintes, reliées aux performances par une analyse statistique, ont permis de définir les zones du spectre indispensables pour garantir l'activité de la peptone.

Cependant, ces travaux n'apportent pas d'information sur la nature même des molécules actives. De ce fait, le caractère non défini des hydrolysats complique l'optimisation de l'alimentation d'un procédé de culture (Hermes & Castro, 2010). En effet, le rôle et le mécanisme d'action des hydrolysats ne peuvent être facilement reliés à la quantité de molécules ajoutées. De plus, pour vérifier une innocuité de la forme pharmaceutique du produit final, il est essentiel de connaître le plus exhaustivement possible les composés

présents dans le milieu de culture (Sahoo *et al.*, 2009 ; Dick *et al.*, 2009). Enfin, les hydrolysats peuvent contenir des composés inhibiteurs ou toxiques pour les cellules.

Par conséquent, afin de pallier les différentes contraintes d'utilisation des hydrolysats, un défi majeur réside dans une caractérisation plus précise de leur composition et sur l'identification maximale des composés actifs. L'idéal serait de séparer et identifier chacun des composés pour évaluer ses effets sur les cellules. Cette stratégie est impossible compte tenu du nombre trop élevé de molécules. De plus, les effets promoteurs peuvent résulter d'effets synergiques entre molécules. Ainsi, une méthode plus appropriée consiste à fractionner les hydrolysats selon certaines propriétés, à caractériser les différentes fractions, puis à évaluer leur influence sur le procédé de culture. Sur ce principe, la caractérisation de molécules actives ou inhibitrices selon leurs critères physico-chimiques peut être envisagée. Les résultats permettraient de simplifier la composition de l'hydrolysat, mais également de mieux comprendre le rôle des différentes molécules des hydrolysats.

3.5- Conclusion

La composition des hydrolysats dépend de leur origine et de leur procédé de production. Ils sont majoritairement composés de peptides, mais contiennent également des acides aminés, acides nucléiques, vitamines, glucides et minéraux.

L'influence des hydrolysats sur les performances de production est souvent observée en fin de phase exponentielle de croissance. Ils améliorent, soit, la concentration maximale de cellules viables, soit, la survie des cellules, ce qui est à l'origine d'une augmentation de la production de protéines recombinantes. Certains hydrolysats stimulent aussi la production spécifique de protéines recombinantes. Les hydrolysats semblent améliorer la production globale de cellules par mole de glucose et glutamine consommée. Cependant, il existe peu de connaissances sur l'évolution du métabolisme énergétique en cours de culture liée à la présence d'hydrolysats.

Outre la nature des hydrolysats, leurs conditions d'utilisation sont déterminantes pour obtenir des effets bénéfiques sur la culture de cellules animales. Alors que des concentrations inférieures à 2 g/L sont souvent insuffisantes pour observer un effet positif, des concentrations supérieures à 6 g/L peuvent être inhibitrices pour la croissance cellulaire. Par contre, l'inhibition de la croissance est souvent bénéfique pour stimuler la

production spécifique de protéines recombinantes. De plus, le mélange d'hydrolysats peut combiner leurs effets et l'ajout d'hydrolysat en fin de phase exponentielle de croissance permet de prolonger la survie des cellules.

Ainsi, la Figure 22 résume les différents paramètres à prendre en compte pour améliorer les performances d'un procédé de culture de cellules de mammifères par l'ajout d'hydrolysats.

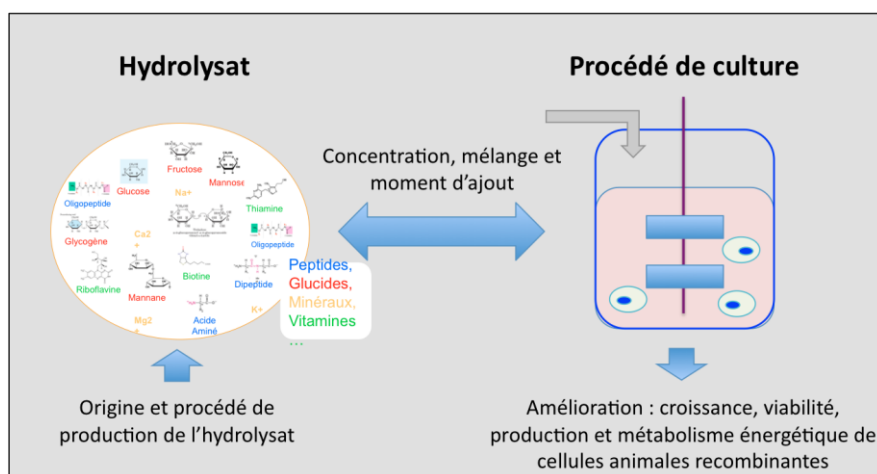


Figure 22. Stratégie d'utilisation d'hydrolysats dans un procédé de culture de cellules animales.

Finalement, nous avons montré que la nature non définie des hydrolysats diminue la fiabilité du procédé de culture. De plus, elle rend difficile la compréhension du mode d'action des hydrolysats sur la réponse cellulaire. Ainsi, dans le chapitre suivant, nous discuterons des différentes stratégies mises en œuvre pour améliorer la caractérisation des molécules actives des hydrolysats et la compréhension de leur rôle spécifique sur un procédé de culture de cellules.

4- Fractionnement des hydrolysats et caractérisation des molécules d'intérêt

4.1- Procédés de fractionnement des hydrolysats

4.1.1- Fractionnement par filtration membranaire

4.1.1.1- Principes de la séparation par filtration

Les procédés de filtration membranaire englobent la microfiltration, l'ultrafiltration, la nanofiltration et l'osmose inverse (Figure 23). Le choix de la technique pour fractionner un hydrolysats dépend de la nature des molécules à isoler. Pour isoler majoritairement des peptides, les deux techniques les plus couramment mises en œuvres sont l'ultrafiltration et la nanofiltration (Pouliot *et al.*, 1999 ; Farges-Haddani *et al.*, 2006 ; Chabeaud *et al.*, 2009 ; Vandanjon *et al.*, 2009 ; Picot *et al.*, 2010). Les membranes d'ultrafiltration sont semi-perméables et permettent, selon le seuil de coupure, la rétention de molécules de taille moyenne (500 Da), jusqu'à des macromolécules (Figure 23). La séparation dépend du poids moléculaire, mais également de la forme et de la structure des molécules (Desclaux & Remigy, 2007). Les membranes de nanofiltration ont des seuils de coupure plus faibles entre 200 et 1000 Da. Là aussi, la taille et la conformation moléculaire sont des critères de séparation importants. En revanche, à poids moléculaire équivalent, la séparation est beaucoup plus influencée par la charge électrique des molécules dans les procédés de nanofiltration (Martin-Orue *et al.*, 1998 ; Pouliot *et al.*, 1999 ; Tessier *et al.*, 2006).

4.1.1.2- Procédés de filtration pour fractionner des hydrolysats

Des travaux ont évalué l'influence de procédés d'ultrafiltration avec des membranes de 3 à 30 kDa sur les performances d'hydrolysats utilisés dans des culture de cellules animales (Tableau 10) (Farges-Haddani *et al.*, 2006 ; Mendonça *et al.*, 2007 ; Chun *et al.*, 2007). Les résultats, tels que ceux présentés Figure 24, indiquent que les hydrolysats peuvent être remplacés par leurs fractions contenant les molécules de faible poids moléculaire, sans que cela ne diminue les performances (Farges-Haddani *et al.*, 2006 ; Chun *et al.*, 2007). Il a aussi été montré que la croissance cellulaire peut être améliorée en ajoutant la fraction d'un EXL, exclue par ultrafiltration 30 kDa, plutôt que le produit initial (Mendonça *et al.*, 2007). Les molécules actives sur la croissance cellulaire et la production d'anticorps sont donc probablement de faible poids moléculaire. C'est pourquoi, la production des

hydrolysats, utilisés en culture de cellules, intègre généralement une étape d'ultrafiltration avec des membranes de seuil de coupure de 10 kDa (Pasupuleti & Braum, 2010).

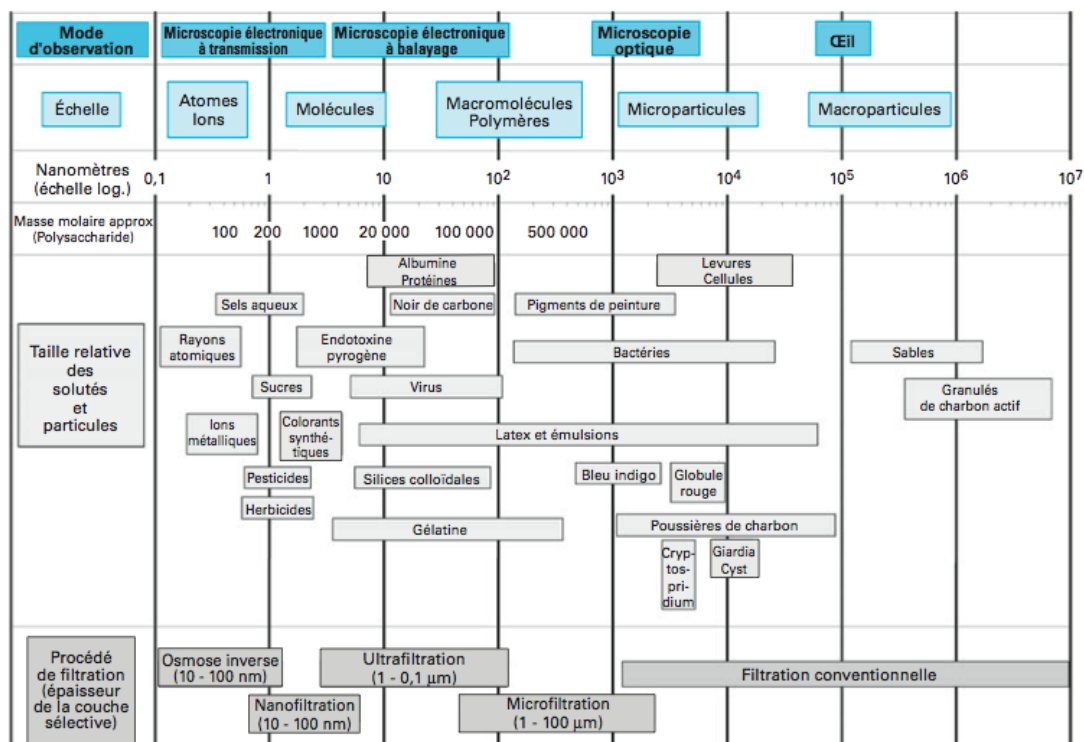


Figure 23. Comparaison des diverses opérations de filtration par membrane (Desclaux & Remigy, 2007).

Ce fractionnement membranaire présente aussi plusieurs avantages pour garantir la qualité des hydrolysats. Tout d'abord, il assure un faible taux d'endotoxines qui peuvent être présentes lors de contamination bactérienne du procédé de production des hydrolysats. Or, les endotoxines sont toxiques pour les cellules et peuvent provoquer un choc septique chez l'homme si elles se retrouvent dans la forme pharmaceutique finale (Ryan, 2008). Le poids moléculaire des endotoxines varie de 3 à 40 kDa, mais ces molécules ont tendance à former des agrégats de 1000 kDa. Plus généralement, l'étape d'ultrafiltration permet de garantir l'absence de molécules de haut poids moléculaire dans l'hydrolysat ce qui facilite les étapes de purification de la protéine recombinante (Butler, 2005). De plus, elle prévient également la contamination de l'hydrolysat par des enzymes protéolytiques comme observé dans une peptone de riz (Mols et al., 2004).

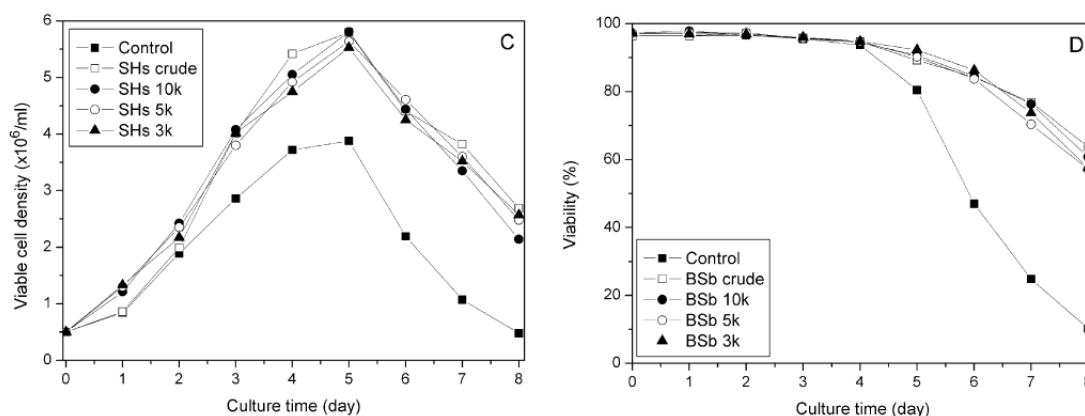


Figure 24. Influence de procédés d'ultrafiltration sur l'activité d'une peptone de soja (SHs crude et BSb crude) sur la cinétique de cellules CHO viables (C) et sur la viabilité (D). Les fractions testées sont ajoutées à une concentration de 6 g/L et correspondent à celles exclues par des membranes de seuil de coupure de 10 kDa (SHs 10k et BSb 10k), 5 kDa (SHs 5k et BSb 5k), et 3 kDa (SHs 3k et BSb 3k) (Chun et al., 2007).

4.1.1.3- Procédés de filtration pour modifier la composition d'un hydrolysat

Une étude a proposé d'utiliser un procédé de filtration membranaire pour améliorer les performances d'une peptone de colza (Farges-Haddani et al., 2006). Deux étapes d'ultrafiltration à 1 et 3 kDa et une étape de nanofiltration à 500 Da ont été mises en œuvre (Figure 25-A). Parmi les différentes fractions testées, la fraction 4 est la plus performante sur la croissance de cellules CHO cultivées en microplaque (Figure 25-C). Les fractions 4 et 5 ne contiennent plus de peptides de taille supérieure à 5000 Da. En revanche, la fraction 4, a été enrichie en peptides de taille comprise entre 1000 et 5000 Da et appauvrie en peptides de taille inférieure à 500 Da par rapport à la fraction 5 (Figure 25-B). La fraction la plus performante comprend donc un mélange de peptides inférieurs à 5000 Da. Ce travail montre qu'il est possible d'améliorer les effets d'une peptone en modifiant les proportions relatives de molécules par fractionnement. Cependant, du fait de la faible sélectivité de ce procédé, il n'est pas possible d'identifier plus précisément les peptides actifs de taille inférieure à 5000 Da. Des diafiltrations successives permettraient de fractionner plus spécifiquement les molécules. De plus, les activités des fractions ont été évaluées à une concentration de 4 g/L. Or, les résultats avec la fraction sélectionnée montrent qu'une concentration supérieure ou inférieure à 4 g/L a un effet moins favorable sur la concentration maximale de cellules viables (Farges-Haddani et al., 2006). Ainsi, une concentration d'ajout non optimale des autres fractions pourrait être à l'origine de leur plus faible activité sur la croissance des cellules CHO.

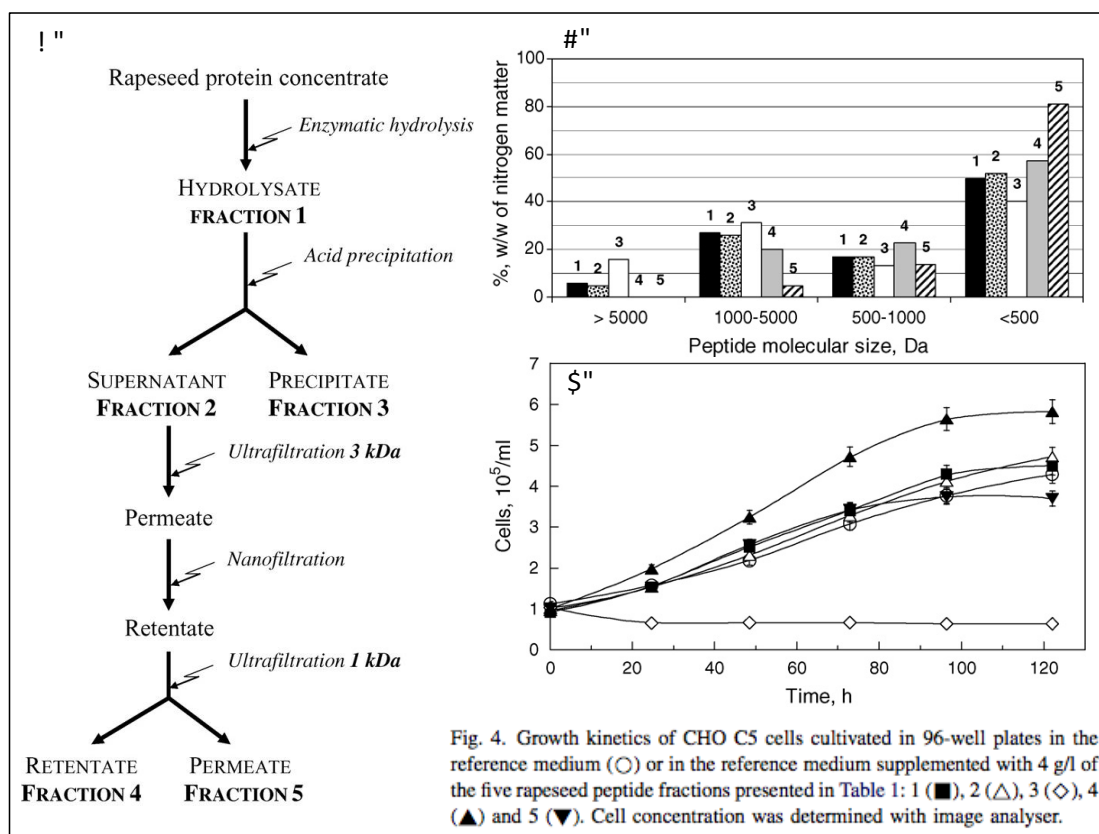


Figure 25. Procédés de production et de fractionnement d'une peptone de colza (A), caractérisation du poids moléculaire des peptides contenus dans les différentes fractions (B) et influence des fractions sur la croissance de cellules CHO en microplaque (C) (Farges-Haddani et al., 2006).

4.1.2- Fractionnement par précipitation

Une seule étude rapporte un fractionnement d'EXL par précipitation alcoolique séquentielle (Shen et al., 2007) (Tableau 10). La fraction F1 (0- 65 % d'éthanol) stimule la croissance de cellules d'insectes à une concentration de 2 g/L par rapport à l'EXL complet (Figure 26). Cette fraction, correspondant aux composés les moins solubles dans l'eau, est moins riche en acides aminés et contient sans doute les peptides de plus hauts poids moléculaires. Cependant, lorsqu'elle est ajoutée à 4 g/L, la densité cellulaire maximale est plus faible qu'avec l'EXL complet. Par contre, le mélange de la fraction F1 avec la fraction F6 qui contient les molécules de plus petite taille génère des performances identiques à l'EXL. Ces résultats suggèrent donc des effets synergiques de molécules de tailles différentes à l'origine de l'activité de l'EXL. Néanmoins, le peu de caractérisation des fractions et la faible sélectivité du fractionnement ne permettent pas de conclure sur la nature des molécules actives.

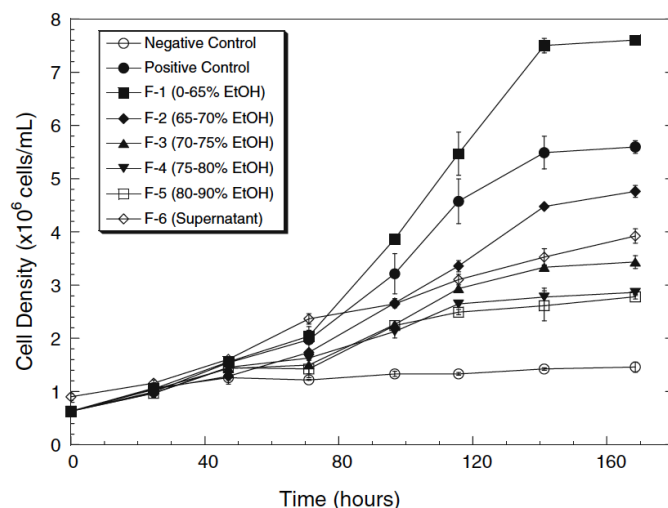


Figure 26. Influence de fractions d'EXL à 2 g/L générées par précipitation alcoolique sur la croissance de cellules d'insectes Sf9 (Shen et *al.*, 2007).

4.1.3- Fractionnement par chromatographie

4.1.3.1- Principe de séparation par chromatographie

Le fractionnement par chromatographie est plus complexe à mettre en œuvre que les procédés de filtration ou de précipitation, du fait de ses faibles rendements et de son coût important, mais il présente l'avantage d'être sélectif. De plus, en fonction de la phase stationnaire utilisée, la séparation peut-être réalisée selon les caractéristiques physico-chimiques des molécules (poids moléculaire, hydrophobie et charge électrique), ou selon l'affinité d'un ligand spécifique (Figure 27).

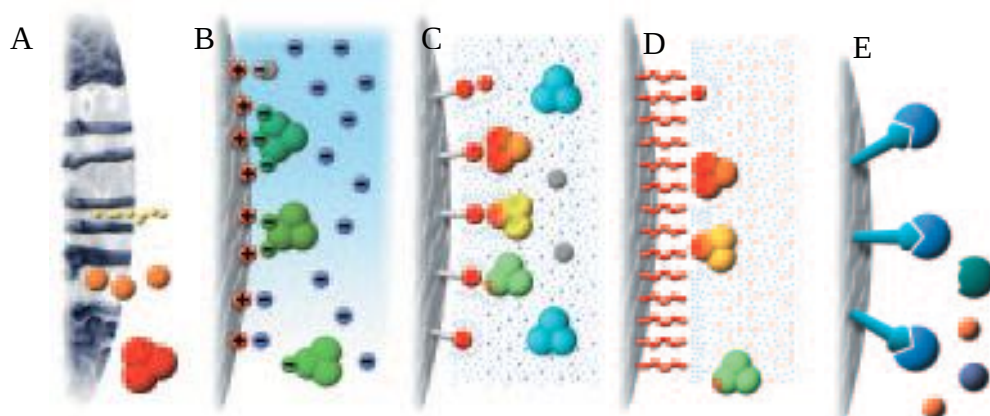


Figure 27. Principes de séparation par chromatographie d'exclusion de taille (ET) (A), échange d'ions (EI) (B), interactions hydrophobes (IH) (C), phase inverse (PI) (D) et affinité (E). (Handbook affinity chromatography, 2003, 18-1022-29, Amersham biosciences).

La chromatographie d'exclusion de taille (ET) sépare les molécules selon leur différence de poids moléculaire (PM) lors de leur passage à travers la phase stationnaire. Les molécules dont le volume est supérieur aux pores des billes de la phase stationnaire ne peuvent y pénétrer et sont éluées rapidement, alors que les molécules dont le volume est inférieur y pénètrent et subissent des frottements qui les retardent (Figure 27-A). Selon la granulométrie des phases stationnaires, des molécules de 100 Da à 80000 kDa peuvent être séparées. Il existe de nombreuses phases stationnaires constituées de différents polysaccharides (superdex, superose, séphacryl ou sephadex). La nature des billes influence le choix de la phase mobile et la résolution de la séparation.

La phase stationnaire de la chromatographie d'échange d'ions (EI) est constituée de polysaccharides (généralement sepharose) complexés à des molécules chargées positivement, comme le DEAE (Diethylaminoethyl) et le Q (Quaternary ammonium), ou négativement comme le CM (Carboxyméthyl), le SP (Sulphopropyl) et le S (Méthyl sulphonate). A partir de liaisons électrostatiques, les biomolécules de charges inverse à celles de la phase stationnaire y sont adsorbées (Figure 27-B). Puis, une phase mobile contenant des sels chargés permet de désorber par compétition les biomolécules liées à la phase stationnaire.

Les chromatographies d'interactions hydrophobes (IH) et de phase inverse (PI) séparent les biomolécules selon leur hydrophobie. Elles font intervenir des liaisons hydrophobes entre les biomolécules et la phase stationnaire. Les parties polaires des biomolécules sont masquées par des sels en IH et de l'acide trifluoroacétique (TFA) en PI. En IH, la diminution du taux de sel dans la phase mobile désorbe les biomolécules liées à la phase stationnaire (Figure 27-C). En revanche, en PI, la diminution de la polarité de la phase mobile est à l'origine de la désorption des biomolécules (Figure 27-D).

La chromatographie d'affinité sépare des protéines sur la base d'une interaction réversible entre une protéine et son ligand spécifique complexé à la phase stationnaire de la chromatographie (Figure 27-E). Les liaisons impliquées sont électrostatiques, hydrophobes, des forces de van der Waals et/ ou des ponts hydrogènes. La biomolécule peut-être élue par un ligand compétitif, en changeant la force ionique, le pH ou la polarité de la phase mobile.

Les chromatographies liquides basse pression (CLBP) d'affinité ou d'échange d'ions (EI) sont communément utilisées à l'échelle industrielle pour la purification de protéines

recombinantes (Birch & Racher, 2006). Par ailleurs, des études ont mis en œuvre le fractionnement d'hydrolysat par CLBP d'exclusion de taille (ET) (Franek et *al.*, 2000 ; Franek et *al.*, 2004 ; Mendonça et *al.*, 2007 ; Michiels et *al.*, 2011), et par des chromatographies liquides hautes performances (CLHP) ET (Amiot et *al.*, 2004). D'autre part, deux études ont fractionné séquentiellement des peptones par CLBP-EI et CLBP-ET pour isoler les molécules actives sur la croissance de cellules (Wilkins et *al.*, 2009 ; Michiels et *al.*, 2011) (Tableau 10).

4.1.3.2- Fractionnement d'hydrolysats par chromatographie d'exclusion de taille

Franek et *al* (2000) sont pionniers dans la démarche de fractionnement d'hydrolysats utilisés en culture de cellules de mammifères. Ils ont mis en œuvre des CLBP-ET pour fractionner de peptones de soja et de blé selon leur PM. Les phases stationnaires utilisés, sephadex G-15 et biogel P-2, fractionnent les biomolécules de PM allant de 100 à 1800 Da environ. Les molécules de PM supérieurs à 1800 Da sortent donc dans la fraction exclue. Dans chaque peptone, une fraction stimulant la concentration maximale de cellules d'hybridomes et la production d'AcM a été isolée. Les fractions présentent des quantités d'azote similaires suggérant la sélection de peptides bioactifs dans la fraction active. La taille de ces peptides a été estimée entre 2 et 10 acides aminés (Franek et *al.*, 2000). Une estimation plus précise serait possible en étalonnant la colonne de chromatographie à l'aide de peptides synthétiques. Suite à cette étude, Franek et *al* (2004) ont amélioré la fraction isolée à partir de la peptone de blé en la re-fractionnant par CLBP-ET (mêmes conditions que précédemment). A partir de ce nouveau fractionnement, deux fractions ont été isolées contenant une forte proportion d'acide glutamique et/ ou glutamine, de leucine et de méthionine. L'influence des fractions, ajoutées à des concentrations de 0,2 ; 0,5 ; 1,0 et 2 g/L, a été évaluée sur la croissance, la viabilité et la production d'AcM par des cellules d'hybridomes après 6 jours de culture (Figure 28). Les fractions améliorent de manière équivalente les différents paramètres cellulaires étudiés. Le double fractionnement n'a donc pas abouti à une meilleure caractérisation des peptides actifs. Finalement, les auteurs font l'hypothèse de la présence de peptides anti-apoptotiques pour expliquer leurs résultats. Néanmoins, il serait nécessaire de valider ces travaux par une étude cinétique approfondie des mécanismes de mort cellulaire.

additive	viable cells ($\times 10^{-3}$ cell mL $^{-1}$)	total cells ($\times 10^{-3}$ cell mL $^{-1}$)	viability (%)	mAb (mg L $^{-1}$)
none (control)	1180	2110	56	22
a21				
0.02%	1290	2020	64	28
0.05%	1480	2080	71	31
0.10%	1680	2330	72	35
0.20%	1810	2590	70	36
a211				
0.02%	1330	2050	65	31
0.05%	1580	2230	71	33
0.10%	1750	2500	70	35
0.20%	1840	2490	74	38
a212				
0.02%	1370	2010	68	29
0.05%	1510	2190	69	30
0.10%	1520	2050	74	32
0.20%	1420	1950	73	32

^a Values on day 6 of the cultures are given.

Figure 28. Influence de fractions d'une peptone de blé obtenues par chromatographie liquide basse pression d'exclusion de taille (CLBP-ET) sur la culture de cellules d'hybridomes productrices d'AcM. La fraction a21 provient du fractionnement d'une peptone de blé par CLBP-ET. Les fractions a211 et a212 proviennent du fractionnement de la fraction a21 par CLBP-ET (identique à la précédente) (Franek et al., 2004).

Par ailleurs, Amiot et al (2004) ont fractionné séquentiellement une peptone de lait par CLBP-ET et CLHP-ET afin d'identifier les molécules promotrices de la croissance de cellules de kératinocytes humains. La phase stationnaire de la CLBP-ET, sephadex G-25, sépare les molécules entre 300 et 2500 Da, alors que celle de la CLHP-ET, TSK G2000SW, est plus particulièrement conçue pour séparer les petits peptides. Dans un premier temps, la CLBP-ET a permis la sélection d'une fraction active, contenant les peptides d'un PM moyen de 800 Da. Elle a alors été fractionnée par la CLHP-ET. Parmi les cinq fractions récoltées, l'une stimulait plus spécifiquement la concentration maximale de cellules aux concentrations de 0,1 ; 0,2 et 0,3 g/L. Les peptides de cette fraction ont alors été caractérisés par CLHP-PI. Chaque pic du chromatogramme a été collecté et analysé dans sa composition en acides aminés totaux. Enfin, la séquence des 15 peptides séparés a pu être identifiée en comparant leur composition en acides aminés aux séquences des protéines du lait. Ces peptides actifs possèdent un PM compris entre 300 à 1400 Da et une majorité d'acides aminés hydrophobes et aromatiques (Amiot et al., 2004). Cependant, aucun d'eux ne correspond aux peptides habituellement rapportés comme actifs sur la biologie des cellules de mammifères (Amiot et al., 2004). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour déterminer leur mécanisme d'action sur les cellules de kératinocytes humain.

Après avoir ultrafiltré un EXL avec une membrane frontale de seuil de coupure de 30 kDa, Mendonça et *al.* (2007) ont mis en œuvre un fractionnement par CLBP-ET. La phase stationnaire utilisée, sephadex G-10, ne retient pas les molécules supérieures à 700 Da. Seule la fraction non retenue, ajoutée à 5 g/L, a un effet sur la concentration maximale de cellules d'insectes. D'après ces résultats, les molécules actives de l'EXL seraient donc de taille supérieure à 700 Da. Cependant, une concentration en excès des molécules de faible poids moléculaire pourrait également être à l'origine de l'effet défavorable de ces molécules sur la croissance des cellules d'insecte uniquement testées à 5 g/L.

4.1.3.3- Fractionnement d'hydrolysats par différents types de chromatographies

Une seule publication présente une stratégie de fractionnement d'une peptone de soja, incluant des chromatographies d'EI et d'ET mises en œuvre séquentiellement, pour la sélection de fractions actives sur la croissance de cellules CHO (Michiels et *al.*, 2011). Dans un premier temps, le fractionnement de la peptone de soja a été réalisé par CLBP-EI (Figure 29-A). La phase stationnaire, DEAE sepharose, est chargée positivement, et retient donc les biomolécules chargées négativement. La fraction non retenue (chargée positivement), ajoutée à 2 g/L, améliore l'intégrale des cellules viables et l'intégrale des protéines recombinantes par rapport aux autres fractions et à la peptone de départ (Figure 29-B). Cette fraction a été refractionnée par CLBP-EI pour vérifier qu'une surcharge de la colonne n'était pas à l'origine de l'activité de la fraction. Les résultats ont confirmé l'intérêt des molécules cationiques. Dans un deuxième temps, la fraction a été séparée par CLBP-ET. Une phase stationnaire, superdex 30, permettant la séparation des molécules jusqu'à 10 kDa a été utilisée. La fraction contenant les peptides de PM intermédiaires a permis d'obtenir une activité équivalente à celles des fractions cationiques. Finalement, la fraction sélectionnée a été analysée par CLHP-PI couplée à un détecteur de masse, sans résultats du fait de sa complexité. Malgré la mauvaise caractérisation des composés actifs, les résultats mettent en évidence l'intérêt de la CLBP-EI et la CLBP-ET successives pour simplifier la composition d'une peptone de soja. D'autre part, l'activité antioxydante des fractions a été évaluée. Alors que les molécules antioxydantes sont supposées prévenir de l'apoptose (Chang et *al.*, 1999 ; Yun et *al.*, 2001), l'activité antioxydante des fractions n'a pas pu être corrélée à leur effet sur les cellules CHO.

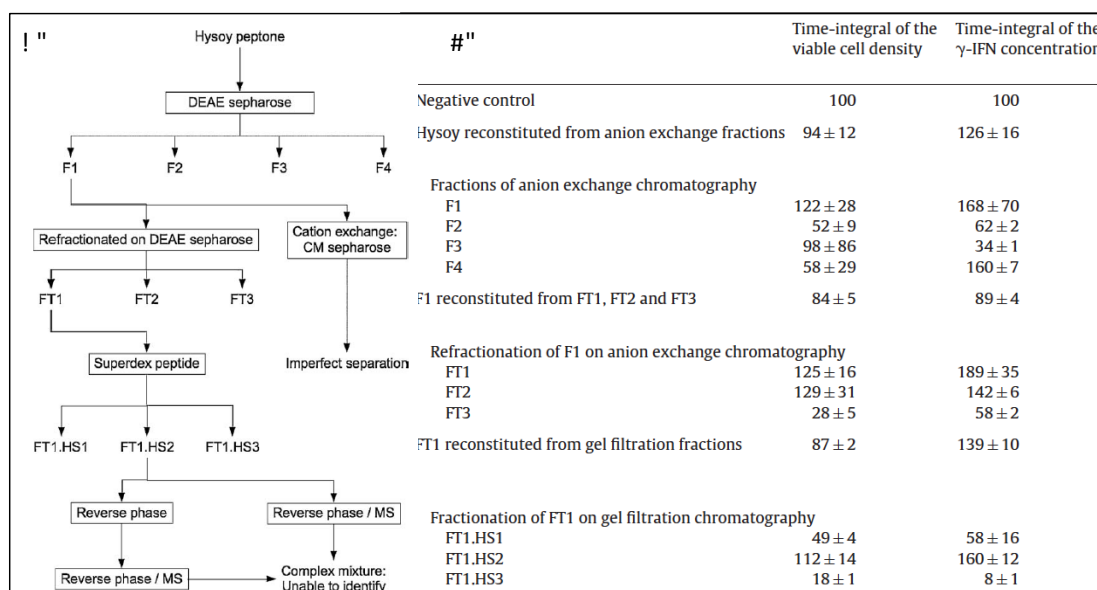


Figure 29. Stratégie de fractionnement d'une peptone de soja par chromatographie basse pression d'échange d'anions, d'exclusion de taille et par chromatographie haute performance en phase inverse (A). Influence des fractions sur l'intégrale de cellules CHO viables et la production d'IFN- γ (B) (Michiels et *al.*, 2011).

Par ailleurs, suivant une stratégie de fractionnement similaire, un brevet a rapporté que des di et tri-peptides contenant de l'arginine, chargée positivement, étaient à l'origine de l'effet positif d'une peptone d'origine animale (Wilkins et *al.*, 2009). Ces résultats confirment l'effet de molécules chargées positivement, et suggèrent l'intérêt de peptides de taille inférieure à 500 Da.

4.1.4- Conclusion

Les travaux réalisés dans la littérature montrent le potentiel des divers procédés de fractionnement pour isoler, selon leurs caractéristiques physico-chimiques, des fractions ayant une influence positive sur la croissance cellulaire et la production de protéines recombinantes (Tableau 10). Les résultats obtenus par ultrafiltration et CLBP-ET indiquent que les molécules actives auraient un poids moléculaire d'environ 1000 Da. De plus, un brevet a plus spécifiquement montré l'intérêt des di et tri-peptides contenant de l'arginine. Par ailleurs, une étude a mis en évidence le potentiel de la charge électrique comme propriété pour sélectionner des molécules actives sur la croissance cellulaire. Par contre, aucune étude n'a utilisé la CLHP-PI ou la CLHP-RP pour fractionner des hydrolysats.

Tableau 10. Procédés de fractionnement d'hydrolysats utilisés pour la culture de cellules animales (Erlen. désigne les fioles d'Erlenmeyer).

Auteurs	Hydrolysats Cellules	Fractionnement	Test activité	Caractéristiques des fractions actives	Caractérisation des fractions
Franek, 2000	Soja et Blé Hybridomes IgG	Sephadex G-15 ou Biogel P2	Boîte 15 mL 2 g/L	Peptides de 2 à 10 acides aminés améliorent l'effet des peptones	Acides aminés totaux
Franek et al., 2004	Blé Hybridomes IgG	Biogel P2	Boîte 15 mL 0,2 ; 0,5 ; 1 et 2 g L ⁻¹	Peptides de 2 à 10 acides aminés ont un effet anti-apoptotique	Acides aminés totaux
Amiot et al., 2004	Lait Kératinocytes	Sephadex G-25 CLHP-ET	Microplaque 6 puits 0,02 ; 0,1 ; 0,2 et 0,3 g/L	Peptides de 300 à 1400 Da améliorent l'effet de la peptone de lait	Identification de la séquence de 15 peptides contenus dans la fraction active
Farges et al., 2005	Colza CHO-C5 γ -IFN	Ultrafiltration 3 et 1 kDa Nanofiltration 500 Da	Microplaque 96 puits, Spinner 250 mL, Réacteur 1 L, 4 g/L	Fraction de PM inférieur à 5000 Da améliore l'effet de la peptone de colza	Poids moléculaire, Matière azotée totale, Acides aminés libres, Composés phénoliques
Chun et al., 2006	Soja CHO	Ultrafiltration 10, 5 et 3 kDa	Erlen. 250 mL Spinner 500 mL 2 ; 4 ; 6 ; 8 et 12 g/L	Fractions de faibles PM ont un effet équivalent aux peptones de soja	Aucune
Mendonça et al., 2007	EXL, Lactalbumine, NZCase Sf9	Ultrafiltration 30 kDa Sephadex G-10	Erlen. 100mL 5 g/L	Fractions de l'EXL de PM inférieur à 30 kDa et supérieur à 700 Da ont un meilleur effet que l'EXL	Aucune
Shen et al., 2007	EXL SF9 β -galactosidase	Précipitation alcoolique	Erlen. 125 mL 1 ; 2 ; 3 et 4 g/L	Effet de la combinaison de la fraction la plus hydrophobe et la plus soluble a un effet équivalent à l'EXL	Glucides, Azote total, Acides aminés totaux Profils PI-CLHP
Michiels et al., 2011	Soja CHO-320 γ -IFN	DEAE Sepharose Superdex 30	Erlen. 25 mL 2 g/L peptides	Fraction chargée positivement et de PM intermédiaire améliore l'effet de la peptone de soja	Activité antioxydante

4.2- Molécules actives des hydrolysats

4.2.1- Peptides et acides aminés

Le bénéfice des hydrolysats sur les différents paramètres d'un procédé de culture (croissance, mort, production et métabolisme) a été mis en évidence dans le chapitre précédent (Cf chapitre 3). D'après les travaux de fractionnement, les molécules à l'origine de l'effet des hydrolysats en culture de cellule seraient en majorité des peptides composés de deux à 10 acides aminés environ. Deux hypothèses sont mises en avant pour expliquer leur effet promoteur sur la croissance et la production de protéines recombinantes : un effet nutritionnel (Schlager, 1996 ; Nyberg et *al.*, 1999 ; Heidemann et *al.*, 2000) ou un effet biologique spécifique (Rasmussen et *al.*, 1998 ; Franek et *al.*, 2000 ; Chun et *al.*, 2006 ; Deparis et *al.*, 2003 ; Farges-Haddani et *al.*, 2006, Franek & Katinger, 2002).

Les adeptes de l'effet nutritionnel admettent que l'hydrolysate est équivalent à un mélange d'acides aminés libres reconstitué dans les mêmes proportions (Heidemann et *al.*, 2000 ; Nyberg et *al.*, 1999). Par contre, d'autres études ont montré qu'un mélange d'acides aminés, équivalent à celui apporté par une peptone, ne permettait pas d'atteindre les performances de la peptone (Bonarius et *al.*, 1996 ; Farges et *al.*, 2008 ; Sung et *al.*, 2004 ; Burteau et *al.*, 2003). De plus, des fractions obtenues par CLBP-ET et contenant une quantité similaire de matière azotée, mais des peptides différents, n'ont pas les mêmes effets suggérant la présence de peptides spécifiques à l'origine de l'activité (Franek et *al.*, 2000). Par conséquent, de nombreux auteurs font l'hypothèse de la présence de peptides promoteurs de la croissance cellulaire ou anti-apoptotiques (Franek et *al.*, 2000 ; Franek et *al.*, 2004 ; Sung et *al.*, 2004 ; Burteau et *al.*, 2003 ; Farges et *al.*, 2008). Malgré ces hypothèses, l'influence des hydrolysats sur les mécanismes de mort cellulaire ne reste encore que partiellement étudiée.

Afin de démontrer l'effet spécifique des peptides, Franek et *al.* ont étudié l'influence d'oligopeptides synthétiques, de 3 à 6 acides aminés, sur la culture de cellules d'hybridomes (Franek & Katinger, 2002 ; Franek et *al.*, 2003 ; Franek & Fussenegger, 2005). Leurs résultats démontrent un effet promoteur de la croissance cellulaire ou de la production d'anticorps, variable en fonction de la composition des oligopeptides, comme suggéré par les travaux de fractionnement (Tableau 11). Certains peptides stimulent uniquement la concentration maximale de cellules (Gly-Gly-Gly-Gly, Gly-Phe-Gly...), d'autres améliorent la concentration maximale de cellules et la production de protéines

(Ala-Ala-Ala-Ala, Ser-Ser-Ser, Thr-Thr-Thr...), et certains n'ont un effet que sur la production spécifique de protéines (Gly-Lys-Gly, Lys-Lys-Lys). L'influence de cette dernière catégorie sur les phases du cycle cellulaire a été étudiée (Franek et *al.*, 2003). En effet, des travaux mettent en évidence l'intérêt de bloquer la transition entre la phase G1 et la phase S pour améliorer la production spécifique de protéines recombinantes (Ibarra et *al.*, 2003 ; Sunley & Butler, 2010) (Cf. partie 2.2.1). Néanmoins, aucune corrélation entre stimulation de la production induite par les peptides et phase du cycle cellulaire n'a pu être mise en évidence (Franek et *al.*, 2003). D'autre part, l'influence des peptides a été évaluée sur les cinétiques de cellules viables et mortes non lysées, en cultures discontinues et semi-continues (Franek & Fussenegger, 2005). Les peptides améliorent légèrement la viabilité cellulaire au cours de la culture suggérant une activité anti-apoptotique.

Tableau 11. Influence de peptides synthétiques sur la croissance cellulaire et la production de protéines recombinantes (nd correspond à non défini).

Auteurs	Cellules/ Protéines recombinantes/ Concentration d'ajout	Peptides	Concentration maximale par rapport au milieu de référence (%)	
			Cellules	Protéines
Franek & Katinger, 2002	Hybridomes Anticorps monoclonaux 2 g/L	Oligoalanine (3 et 4)	+ 40	+25
		Oligoglycine (3 à 5)	+ 60	+ 0
		Ser-Ser-Ser	+ 40	+ 20
		Ala-Ala-Ala	+ 40	+ 30
		Thr-Thr-Thr	+ 30	+ 40
		Gly-Lys-Gly	- 10	+ 40
		Gly-Hys-Gly	- 80	+ 60
Franek et <i>al.</i> , 2003	Hybridomes Anticorps monoclonaux 2 g/L	Gly-Lys-Gly	+ 0	+ 60
		Gly-Lys-Gly-Ala-Ala	+ 10	+ 60
		Lys-Lys-Lys	+ 10	+ 30
		Gly-His-Lys	+ 10	+ 30
		Gly-Lys	+ 20	+ 30
		Gly-Phe-Gly	+ 30	+ 0
Franěk & Fussenegger 2005	CHO SEAP recombinante 0,5 ; 1 et 2 g/L	Gly-Gly-Gly-Gly	+ 15	+ 0
			+ 66	+ 0
			+ 44	+ 0
		Gly-Lys-Gly	+ 0	+ 50
			+ 0	+ 60
			+ 0	+ 60

Bien que ces études ne permettent que de comprendre très partiellement le mode d'action des peptides, elles mettent en évidence l'impact de leur composition sur leur activité stimulante de la croissance cellulaire ou de la production. Par ailleurs, d'autres activités spécifiques de peptides, telles que des activités antioxydantes (Ajibola et *al.*, 2011 ; Pownall et *al.*, 2011), d'attachement cellulaire (Ruoslahti, 1996), ou de transport de

macromolécules (Schmidt et *al.*, 2010) ont été décrites dans la littérature et pourraient aussi être bénéfiques pour la croissance et la survie cellulaires.

En revanche, l'ajout de composés nutritionnels pourrait également conduire à l'amélioration de l'efficacité du métabolisme énergétique et ainsi améliorer la phase de croissance. En effet, les cellules possèdent des transporteurs spécifiques des di et tri peptides (pep-T1 et pep-T2) qui sont moins énergivores que ceux des acides aminés libres (Daniel et *al.*, 1992). Ces transporteurs permettent le transport des peptides indépendamment de leur séquence et de leur charge. Les peptides introduits dans la cellule sont alors rapidement hydrolysés par des peptidases cytosoliques. Ils pourront ainsi être intégrés comme éléments nutritifs via le cycle TCA ou alimenter l'anabolisme. Ceci pourrait expliquer les effets des hydrolysats sur le métabolisme énergétique mis en évidence dans le paragraphe 3.2.2. Néanmoins, il a été montré que certaines lignées de cellules CHO n'expriment que faiblement ces transporteurs (Fujisawa et *al.*, 2006). En outre, une étude a montré que les di-peptides pouvaient aussi être hydrolysés en acides aminés dans le milieu extracellulaire avant leur assimilation par les cellules (Christie & Butler, 1994).

D'autre part, l'ajout d'acides aminés sous forme de di-peptides dans la formulation du milieu de culture pourrait améliorer leurs propriétés physico-chimiques et ainsi les performances de culture. Par exemple, l'ajout de glutamine sous forme de di-peptides, tels que Ala-Gln ou Gly-Gln, a permis d'améliorer sa stabilité au cours de la culture et de diminuer la production d'ions ammonium (Christie & Butler, 1994 ; Christie & Butler, 1999). De plus, une étude récente a suggéré la possibilité d'améliorer les performances de culture en augmentant la concentration de tyrosine dans le milieu de culture via son ajout sous forme de di-peptides tels que Tyr-His et Tyr-Lys, plus solubles que la tyrosine sous forme libre (Kang et *al.*, 2012).

4.2.2- Autres molécules

Bien que les effets des hydrolysats soient principalement attribués à leur contenu en peptides et acides aminés, ils contiennent d'autres constituants tels que des vitamines, des bases azotées ou des glucides, connus pour leurs effets positifs sur la culture de cellules de mammifères (Cf. parties 1.3.6.1 et 3.1.1). Par exemple, une limitation en vitamines provoque une diminution de la vitesse de croissance et du temps de survie des cellules (Kurano et *al.*, 1990 ; Kim et *al.*, 2006). De même, l'adénine monophosphate stimule la

production spécifique de protéines recombinantes en ralentissant la croissance cellulaire (Carvalho et al., 2003 ; Carvalho et al., 2011). Par ailleurs, le tréhalose contenu dans les EXL stabilise les membranes cellulaires et permet d'améliorer la cryoconservation des cellules (Chakraborty et al., 2011), la résistance à des stress tels que l'électroporation (Mussauer et al., 2001) et la résistance à des contraintes hydrodynamiques.

Alors que les milieux de culture de base contiennent déjà des vitamines, minéraux, bases azotées et glucose (Cf. partie 1.3.6.1), aucune étude n'a comparé l'apport des hydrolysats, par rapport à ces composés des milieux de base. Il serait donc intéressant de mieux caractériser la composition des hydrolysats pour discuter de l'intérêt des autres molécules que les peptides. La reconstitution de mélanges de ces molécules, ou leur isolation par fractionnement permettraient de mieux comprendre leur rôle dans un procédé de culture.

4.3- Conclusion

Les procédés de fractionnement (filtration, précipitation et chromatographie) permettent d'isoler des molécules selon leurs propriétés physico-chimiques. L'étude de l'influence de fractions générées par ces procédés sur la culture de cellules a abouti à une meilleure caractérisation des molécules actives contenues dans les hydrolysats (Tableau 10). Selon différents travaux, des peptides constitués de 2 à 10 acides aminés semblent à l'origine de l'effet des hydrolysats. De plus, les molécules chargées positivement pourraient être plus spécifiquement impliquées dans la réponse cellulaire. Par ailleurs, les études montrent l'importance de tester différentes concentrations d'ajout des fractions sur la culture des cellules, pour s'affranchir de l'effet potentiellement inhibiteur dû à leur enrichissement en biomolécules.

Certains auteurs ont amélioré la caractérisation des fractions par l'analyse de leur composés (séquence des peptides, glucides, acides aminés...) (Tableau 10). Ainsi, des fractions peuvent présenter des activités différentes, malgré des quantités d'azote similaires, suggérant l'existence de peptides bioactifs spécifiques. D'autre part, la reconstitution de mélanges de molécules, simplifiés et caractérisés (acides aminés, peptides), s'avère une stratégie intéressante pour identifier les molécules actives et leur mode d'action sur la culture de cellules. Enfin, une étude complète des cinétiques de cultures (croissance, mort, production et métabolisme) est nécessaire pour mieux appréhender le mode d'action des fractions d'hydrolysats dans une culture.

Ainsi, une stratégie globale s'avère nécessaire pour mieux caractériser les molécules actives contenues dans un hydrolysats et évaluer leur mode d'action dans un procédé de culture (Figure 30). Elle fait intervenir : (i) des méthodes de caractérisation, (ii) des procédés de fractionnement, (iii) la reconstitution de biomolécules et (iv) l'étude de l'interaction des hydrolysats sur les paramètres cinétiques d'un procédé de culture de cellules.

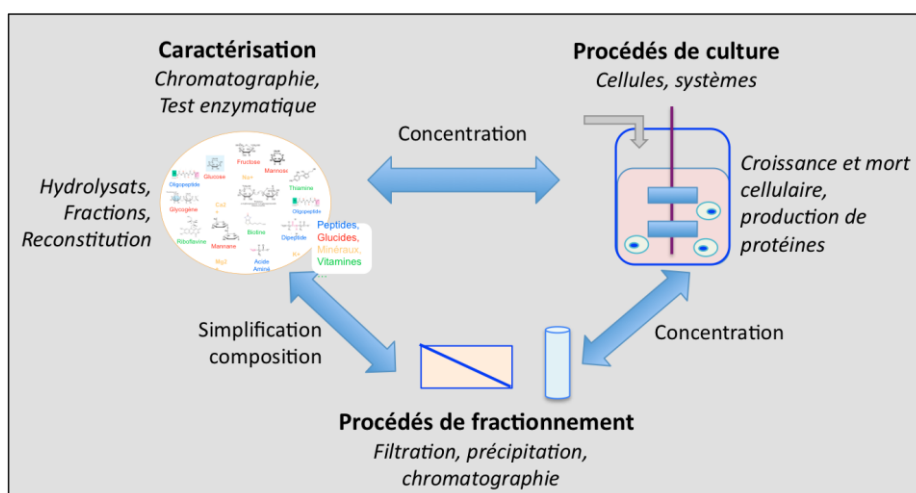


Figure 30. Stratégie de caractérisation des molécules actives contenues dans un hydrolysats et évaluation de leur rôle dans un procédé de culture de cellules animales.

Matériel & Méthodes

MATERIEL ET METHODES

1- CULTURE DES CELLULES.....	90
1.1- LIGNEE CELLULAIRE	90
1.2- MILIEUX DE CULTURE.....	90
1.2.1- Milieu BDM.....	90
1.2.2- Milieu RPMI	92
1.3- CONSERVATION DE LA LIGNEE CELLULAIRE	94
1.3.1- Constitution des banques de cellules	94
1.3.2- Congélation des cellules.....	94
1.3.3- Décongélation des cellules.....	94
1.4- CULTURE DES CELLULES CHO-AMW	94
1.4.1- Phase d'expansion cellulaire.....	94
1.4.2- Culture dans différents systèmes	95
1.5- ANALYSES DES CELLULES	98
1.5.1- Numération automatisée en plaque 96-puits.....	98
1.5.2- Concentration des cellules viables et mortes	98
1.5.3- Concentration des cellules lysées.....	99
1.5.4- Analyse des cellules apoptotiques.....	100
1.6- DOSAGES DES SUBSTRATS ET DES PRODUITS	101
1.6.1- Glucose.....	101
1.6.2- Glutamine	101
1.6.3- Lactate.....	102
1.6.4- Ions ammonium.....	102
1.6.5- Osmolarité.....	103
1.6.6- Anticorps monoclonal recombinant.....	103
1.7- CALCUL DES VITESSES SPECIFIQUES ET DES RENDEMENTS	104
1.7.1- Paramètres de croissance cellulaire	104
1.7.2- Paramètres caractéristiques des métabolites et des produits.....	105
2- PROCEDES DE FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT DE LEVURE.....	107
2.1- NANOFILTRATION TANGENTIELLE.....	107
2.1.1- Unité de filtration	107
2.1.2- Mode opératoire.....	107
2.1.3- Fractionnement de l'EXL	108
2.1.4- Dessalage des fractions.....	109
2.2- CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE BASSE PRESSION.....	109
2.2.1- Echange d'ions.....	109
2.2.2- Exclusion de taille.....	111
2.2.3- Interactions hydrophobes.....	111
2.2.4- Procédé de fractionnement séquentiel.....	113
2.3- PREPARATION DES PRODUITS.....	114
2.3.1- Concentration.....	114
2.3.2- Lyophilisation.....	114
3- CARACTERISATION DES HYDROLYSATS DE LEVURE ET DES FRACTIONS	115
3.1- MATIERE PROTEIQUE	115
3.1.1- Profils de poids moléculaire des peptides.....	115
3.1.2- Acides aminés	115
3.2- MATIERE GLUCIDIQUE.....	116
3.2.1- Glucides totaux et libres.....	116
3.2.2- Tréhalose	116
3.3- MATIERE NUCLEIQUE	117

1- Culture des cellules

1.1- Lignée cellulaire

La lignée cellulaire CHO-AMW productrice de l'anticorps humain IgG1 anti-rhésus D (anti-RhD) a été utilisée au cours de notre étude. Cette lignée nous a été fournie par le Dr. Florian Wurm (EPFL-Lausanne). Elle a été générée par transfection des ADNc codant pour l'anticorps IgG1 anti-rhésus D humain et la dihydrofolate réductase (DHFR) dans la lignée CHO-DG44 (Miescher et *al.*, 2000). La lignée CHO DG44 ne possédant pas le gène codant pour la DHFR, ne peut pas proliférer en absence d'hypoxanthine et de thymidine. Ainsi, en cultivant la lignée CHO DG44 recombinée en milieu sans hypoxanthine et thymidine, la pression de sélection a permis d'obtenir la lignée recombinante CHO-AMW. Cette lignée est adaptée à la culture en suspension.

1.2- Milieux de culture

La lignée cellulaire CHO-AMW avait été initialement adaptée, par l'équipe suisse, au milieu commercial chimiquement défini proCHO5, supplémenté par 5 mM de glutamine (De Jesus et *al.*, 2004). Sa composition étant confidentielle, pour les travaux de cette thèse, la lignée cellulaire CHO-AMW a été adaptée aux milieux de culture BDM (Basal Defined Medium) et BDM/RPMI dans un ratio 1 :9 (vol/vol). Les cellules ont été transférées directement du milieu proCHO5 dans le milieu BDM puis adaptées par plusieurs cultures successives. Par contre, dans le cas du milieu BDM/RPMI, les cellules ont été transférées du milieu proCHO5 dans le milieu étudié et utilisées pour les études cinétiques sans adaptation préalable. Selon les études, les milieux de culture ont été supplémentés ou non avec différentes concentrations d'hydrolysats de levure, de fractions de ces hydrolysats ou encore de mélanges de molécules présents dans les hydrolysats.

1.2.1- Milieu BDM

Le BDM est un milieu sans sérum et sans protéine dont la composition a été optimisée pour la croissance d'hybridomes (Schneider, 1989). Il est composé d'un mélange des milieux : IMDM (réf. CM1SCO0001, Eurobio), Ham's F12 (réf. CM1H1200K-BP, Eurobio) et NCTC-135 (réf. CM11H3500-01, Eurobio) dans un ratio 5 :5 :1 (vol/vol/vol). Il est aussi supplémenté par 0,1 % (g/ 100 mL) de pluronic F-68 (réf. P-1300, Sigma), 500 μ M de citrate de fer (réf. 3388, Sigma), 750 μ M d'éthanolamine (réf. E-0135, Sigma) et 5

mM de glutamine (réf. CSTGLU00-0U, Eurobio). La composition détaillée de ce milieu est présentée dans le Tableau 12.

Tableau 12. Composition du milieu de culture BDM sans suppléments (concentrations exprimées en mg/L)

	HAM F12 (5 vol)	Milieu Iscove (5 vol)	NCTC (1 vol)	PF-BDM
ACIDES AMINES				
L-alanine	9,0	25,0	31,5	18,1
L-arginine	211	69,0	31,2	128,4
L-asparagine	15,0	25,0	9,9	18,8
Acide L-aspartique	13,3	30,0	9,9	20,3
L-cystéine	25,0	0,0	0,0	11,2
L-cystine	0,0	70,0	10,5	32,3
Acide L-glutamique	14,7	75,0	8,3	41,0
L-glutamine	0	0	135,7	877,2
L-glycine	7,5	30,0	13,5	18,0
L-histidine	23,0	42,0	19,7	30,9
Hydroxy-L-proline	0	0	4,1	0,4
Isoleucine	3,9	105,0	18,0	50,4
L-leucine	13,0	105,0	20,4	54,7
L-lysine	36,5	146,0	38,4	85,3
L-méthionine	4,5	30,0	4,4	15,9
L-ornithine	0	0	9,4	0,8
L-phénylalanine	5,0	66,0	16,5	33,3
L-proline	34,5	40,0	6,1	34,0
L-sérine	10,5	42,0	10,8	24,5
L-aurine	0	0	4,2	0,4
L-thréonine	11,9	95,0	18,9	49,6
L-tryptophane	2,0	16,0	17,5	9,7
L-tyrosine	5,4	84,0	16,4	41,6
L-valine	11,7	49,6	25,0	7,5
SELS INORGANIQUES				
CaCl ₂	0	0	200	18
CaCl ₂ , 2H ₂ O	44	219	0	118
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,0025	0	0	0,001
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,834	0	0	0,374
KCl	224	330	400	284
KNO ₃	0	0,076	0	0,034
MgSO ₄	0	200	200	108
MgCl ₂ , 6H ₂ O	122	0	0	55
NaCl	7600	4500	6800	6036
NaHCO ₃	1176	3024	0	1883
NaH ₂ PO ₄	142	109	122	123,5
NaSeO ₃ , 5H ₂ O	0	0,017	0	0,008
ZnSO ₄	0,86	0	0	0,386
VITAMINES				
A (rétinol)	0	0	0,250	0,022
Acide p-aminobenzoïque	0	0	0,125	0,011
a-tocophérol phosphate	0	0	0,025	0,002
B1 (thiamine)	0,3	4	0,025	1,930
B2 (riboflavin)	0,04	0,4	0,025	0,200
B5 (calcium panthothénate)	0,48	4	0,025	2,011
B6 (pyridoxine)	0,06	0	0,0625	0,033
B8 (biotine)	0,0073	0,013	0,025	0,011
B9 (acide folique)	1,3	4	0,025	2,38
B12 (cyanocobamine)	1,4	0,013	10	1,530
C (acide ascorbique)	0	0	50	4,48

Chlorure de choline	14	4	1,25	8,18
Cobalamine	0	0	0	0,000
D2 (calciférole)	0	0	0,25	0,022
Menadione	0	0	0,25	0,022
Nicotinamide	0	4	0	1,9
Niacinamide	0,036	0	0,0625	0,022
PP (niacine)	0	0	0,0625	0,006
Pyridoxal HCl	0	4	0,0625	1,8
Piridoxine HCl	0,06	/	0,0625	0,033
Inositol	18	7,2	0,125	11,3
COFACTEURS ET PRECURSEURS NUCLEOTIDIQUES				
Coenzyme A	0	0	2,5	0,224
Diphosphopyridine nucléotide	0	0	7	0,628
Flavine Adénine				
Dinucléotide	0	0	1	0,090
Triphosphopyridine nucléotide	0	0	1	0,090
Coccarboxylase	0	0	1	0,090
Glutathion, monosodium	0	0	10	0,90
Déoxyadénosine	0	0	10	0,90
Déoxyguanosine	0	0	10	0,90
Déoxycytidine, HCl	0	0	10	0,90
Hypoxanthine	4	0	0	1,80
5-Méthylcytidine	0	0	0,1	0,01
Thymidine	0,7	0	10	1,21
Uridine triphosphate	0	0	1	0,09
AUTRES COMPOSES				
Acide L-amino-n-butyrique	0	0	5,5	0,49
Acétate de sodium	0	0	50	4,48
Acide linoléique	0,084	0	0	0,04
Acide thiotactique DL-68	0,2	0	0	0,1
D-Glucosamine, HCl	0	0	3,9	0,6
D-Glucuronolactone	0	0	1,8	0,2
Glucuronate de sodium,				
H ₂ O	0	0	1,8	0,2
HEPES	0	5958	0	2672
Putrescine	0,161	0	0	0,072
Pyruvate de sodium	110	110	0	98,6
Rouge de phénol	1,2	15	20	9,6
Tween 80	0	0	12,5	1,1
D-Glucose	1802	4500	1000	2955

1.2.2- Milieu RPMI

Le milieu RPMI-1640 (réf. CM1RPM00-01, Eurobio) est dérivé du milieu Roswell Park Memorial Institute. De la glutamine est ajoutée afin d'obtenir une concentration initiale de 5 mM. La composition détaillée de ce milieu est présentée dans le Tableau 13.

Tableau 13. Composition du milieu de culture RPMI sans suppléments (concentrations exprimées en mg/L)

	RPMI
ACIDES AMINÉS	
L-arginine	200,0
L-asparagine	50,0
Acide L-aspartique	20,0
L-cystine	50,0
Acide L-glutamique	20,0
L-glycine	10,0
L-histidine	15,0
Hydroxy-L-proline	20,0
Isoleucine	50,0
L-leucine	50,0
L-lysine	40,0
L-méthionine	15,0
L-phénylalanine	15,0
L-proline	20,0
L-sérine	30,0
L-thréonine	20,0
L-tryptophane	5,0
L-tyrosine	20,0
L-valine	20,0
SELS INORGANIQUE	
Ca(NO) ₃ HO	100
KCl	400
MgSO ₄ HO	100
NaCl	6000
NaHCO ₃	2000
NaHPO ₄	800
VITAMINES	
Acide p-aminobenzoïque	1,0
B1 (thiamine)	1,0
B2 (riboflavine)	0,2
B5 (calcium panthothénate)	0,3
B6 (pyridoxine)	1,0
B8 (biotine)	0,2
B9 (acide folique)	1,0
B12 (cyanocobamine)	0,005
Chlorure de choline	3,0
Nicotinamide	1,0
Pyridoxal HCl	1,0
Inositol	35,0
COFACTEURS ET PRECURSEURS NUCLEOTIDIQUES	
Glutathion monosodium	1
AUTRES COMPOSÉS	
Rouge de phénol	5
D-Glucose	2000

1.3- Conservation de la lignée cellulaire

1.3.1- Constitution des banques de cellules

Tout d'abord, une banque primaire constituée de 10 cryules a été réalisée avec des cellules CHO-AMW cultivées dans le milieu proCHO5 après 1 passage en boîte de culture et 3 passages en fiole d'Erlenmeyer. Puis, à partir d'une cryule de cette banque primaire, 10 cryules ont été réalisées dans le milieu proCHO5 et 10 autres avec des cellules cultivées dans le milieu BDM après 1 passage en boîte de culture et 5 passages en flacon agité. Ces deux banques cellulaires constituent les banques de travail.

1.3.2- Congélation des cellules

Les cellules sont conservées dans l'azote liquide (-196°C). Préalablement à la congélation, 1 à 2 x 10⁷ cellules sont mises en suspension dans 1 mL de milieu de culture contenant 10% de DMSO (Prolabo) et 10 % de sérum de veau fœtal (vol/vol) (réf. CVFSVF00-01, Eurobio). Les cellules sont alors congelées dans des tubes cryogéniques (Nunc). La congélation est réalisée à l'aide de l'appareil Nicool LM 10 par paliers successifs, 25 minutes à -11,5°C, 10 minutes à -61°C, puis immersion pendant 1 minute dans l'azote liquide (-196°C).

1.3.3- Décongélation des cellules

La décongélation est réalisée en plaçant le tube cryogénique dans un bain-marie thermostaté à 37°C pendant moins d'une minute. Après décongélation, les cellules sont reprises dans 10 mL de milieu de culture frais préalablement chauffé à 37°C. L'ensemble est centrifugé à 800 tr/min pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé, pour supprimer le DMSO et le sérum, et le culot cellulaire est remis en suspension dans 15 mL de milieu de culture à 37°C, avant d'être transféré en boîte de culture (T75).

1.4- Culture des cellules CHO-AMW

1.4.1- Phase d'expansion cellulaire

Après décongélation, les cellules sont cultivées en mode statique en boîtes de culture placées dans un incubateur régulé à 37°C et 5 % de CO₂ (Sanyo). Les bouchons des boîtes permettent les échanges gazeux. Après 48 heures de culture, le contenu de la boîte de culture est centrifugé à 800 tr/min pendant 5 minutes, le culot cellulaire est repris dans du

milieu frais et les cellules viables sont dénombrées à l'aide d'une cellule de Thoma. Les cellules sont alorsensemencées à une concentration de $2,5 \times 10^6$ cellules/mL dans du milieu frais en fiole d'Erlenmeyer (Corning). La fiole est remplie pendant 1 minute d'un mélange de 5 % de CO₂ et 95 % d'air. Elle est ensuite rebouchée hermétiquement et positionnée sur une table d'agitation orbitale (IKA) de 30 mm d'amplitude placée dans une étuve régulée à 37°C. La vitesse d'agitation est fixée à 110 tr/min. Le volume utile de la fiole est égal au cinquième de sa contenance maximale. Avant chaque étude cinétique, deux passages supplémentaires, d'une durée de 48 à 60 heures sont réalisés pour assurer l'amplification des cellules. Les cellules sont transférées au moment de la phase exponentielle de croissance. Cette procédure, favorise un état cellulaire initial constant pour démarrer les études cinétiques.

1.4.2- Culture dans différents systèmes

1.4.2.1- Cultures agitées en fiole d'Erlenmeyer

Les cellules, initialement amplifiées dans le milieu BDM, sont ensemencées en fiole d'Erlenmeyer de 500 mL contenant du milieu BDM avec ou sans suppléments (hydrolysats de levure, fractions ou mélanges). Le suivi cinétique de la culture est réalisé via un prélèvement de 7 mL de suspension cellulaire une à deux fois par jour jusqu'à la mort des cellules (5 à 7 jours). Après chaque prélèvement, les fioles sont remplies pendant 1 minute d'un mélange d'air/CO₂ dans un ratio de 95/5 (vol/vol). La majorité des études cinétiques en fiole d'Erlenmeyer a été effectuée en mode discontinu. Dans certaines études, des ajouts de substrats ou d'hydrolysats de levure ont été réalisés après 40 ou 48 heures.

1.4.2.2- Cultures en bioréacteur agité

Des études cinétiques ont aussi été effectuées en bioréacteur de 2 L de type cuve agitée (SGI), avec un volume utile de 1 L (12 cm de diamètre et 11 cm de hauteur de liquide) (Figure 31). Le bioréacteur est équipé d'un mobile d'agitation à pales inclinées et régulé pour l'aération, la température et le pH. L'aération, régulée à 50 % de la saturation en air, s'effectue par un diffuseur de gaz conique (sparger) ou par le ciel du réacteur. Elle est contrôlée par un système de type PID couplé à une sonde à O₂ dissous stérilisable (Ingold). L'étalonnage de la sonde pour le 100 % d'oxygène dissous s'effectue dans le milieu BDM stérile en présence d'air. La température est régulée à 37°C par de l'air chaud dans

l'enveloppe de la cuve et une sonde de température. Le pH est contrôlé par un PID couplé à une sonde à pH stérilisable (Ingold). Cette sonde est étalonnée avant stérilisation à l'aide de solutions commerciales de pH 4 et 7. Lorsque le pH est inférieur à la valeur de consigne (pH = 7,4), la régulation actionne la pompe d'injection de soude 0,2 N. Les cultures sont agitées à 60 rpm. Tous ces paramètres sont contrôlés en ligne à l'aide du système Biocontroller (ADI 1030, Applikon) et du logiciel BioExpert (Applikon).

Avant la mise en œuvre de la culture, le réacteur contenant du PBS est stérilisé dans un autoclave (25 minutes, 121°C, 1 bar). Puis, le PBS est soutiré stérilement et 800 mL de milieu de culture BDM frais, supplémenté ou non avec les hydrolysats de levure, sont introduits stérilement dans le réacteur par surpression à l'aide d'air contenant 5 % de CO₂. La température est réglée à 37°C, puis la sonde à oxygène est étalonnée avant la mise en œuvre de la régulation d'oxygène dissous à 50 %. Puis, les cellules, initialement amplifiées dans 200 mL de milieu BDM, sont introduites stérilement dans le réacteur à une concentration de $2,5 \times 10^5$ cellules/mL. Le suivi cinétique est alors réalisé via un prélèvement de 10 mL de suspension cellulaire une à deux fois par jour jusqu'à la mort des cellules (5 jours).

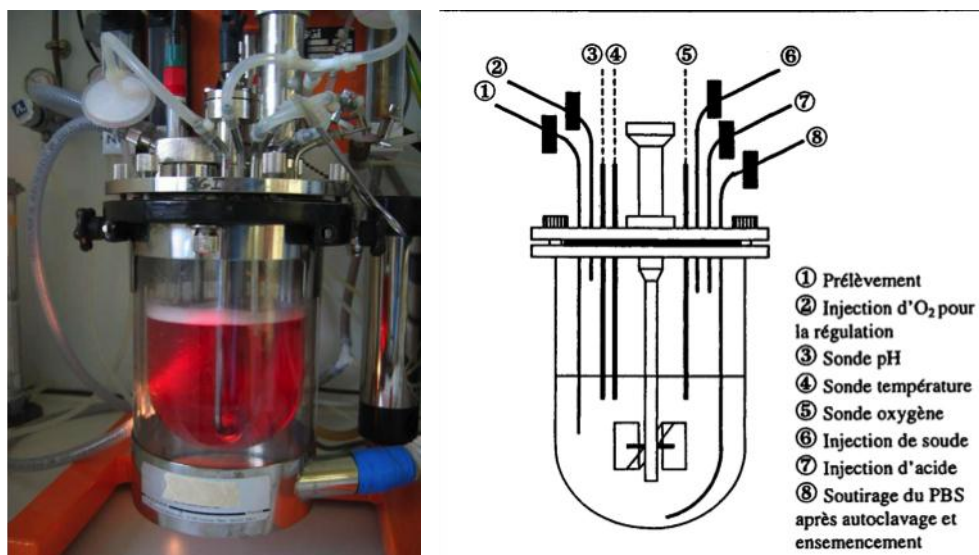


Figure 31. Photographie (à gauche) et représentation schématique (à droite) du bioréacteur 2 L.

1.4.2.3- Cultures statiques en plaque 96-puits

Le suivi cinétique de la croissance de cellules CHO-AMW cultivées en mode discontinu a également été réalisé en plaque de 96 puits (Corning) dans un volume utile de 200 µL.

Avant ensemencement, 20 μL de suppléments à une concentration 10 X, dissous dans du PBS, sont déposés dans les puits de la microplaque. Puis, 180 μL de suspension cellulaire provenant de cellules amplifiées dans le milieu proCHO5 sont ensemencées à une concentration de $0,44 \times 10^5$ cellules/mL dans le milieu RPMI/BDM (90/10).

Une forte évaporation du milieu de culture a été observée dans les puits périphériques ce qui provoque l'augmentation de l'osmolarité (Tableau 14) et l'inhibition de la croissance cellulaire (Figure 32), comme observé par Brinkmann et *al.* (2002). Les puits périphériques n'ont donc pas été utilisés pour les études cinétiques et ont été remplis par 250 μL de PBS. Chaque condition de culture est répétée 6 fois, ce qui permet d'étudier 10 conditions de culture par microplaque.

Tableau 14. Volume de liquide et osmolarité du milieu dans les puits selon leur emplacement sur la microplaque après 8 jours de culture.

	Coin	Bordure	Centre
Volume (μL)	120	150	180
Osmolarité (mOsm/kg)	440	355	310

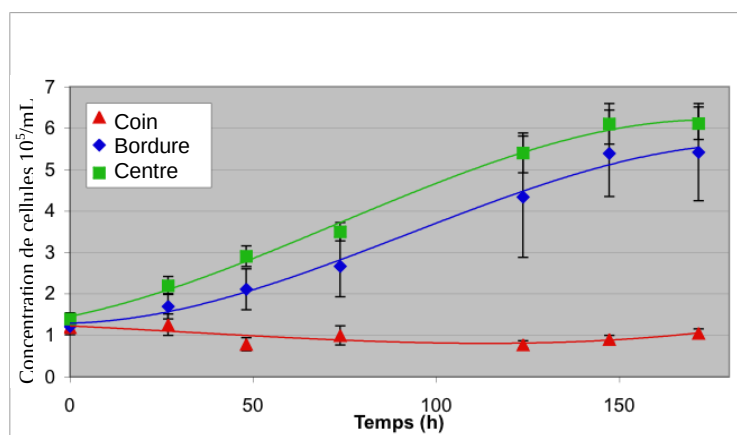


Figure 32. Croissance des cellules CHO en microplaque dans le milieu BDM selon l'emplacement du puits : coin (▲), bordure (◆) et centre (■).

Une fois ensemencées, les microplaques de culture sont placées dans un incubateur régulé à 37°C et 5 % de CO_2 (Sanyo). Le suivi cinétique de la concentration de cellules totales a été réalisé une à deux fois par jour pendant 5 à 7 jours de culture grâce au système de comptage non invasif, Cellscreen® (Innovatis, Germany).

1.5- Analyses des cellules

1.5.1- Numération automatisée en plaque 96-puits

Le Cellscreen® est utilisé pour la numération de cellules en plaques 96-puits. Il permet de quantifier la densité cellulaire grâce à un analyseur d'images à partir de plusieurs images de chaque puits (Figure 33). Les composants de base du système sont : un microscope inversé (IX50, Olympus) équipé d'un objectif 10 X et 4 X, une caméra CCD (KPF100, Hitachi) de 1024 x 1024 pixels et un plateau motorisé x-y. Les images sont analysées par un logiciel de reconnaissance de forme capable de détecter les cellules en suspension dans les puits. La méthodologie de comptage est non invasive et n'impose aucun prélèvement. Pour améliorer la fiabilité du comptage, il est nécessaire de remettre en suspension les cellules avant chaque lecture pour dissocier d'éventuels agrégats, puis de les laisser sédimenter pendant 30 minutes. Chaque condition de culture est reproduite 6 fois et la déviation standard de l'erreur de numération sur 6 puits représente moins de 10 %.

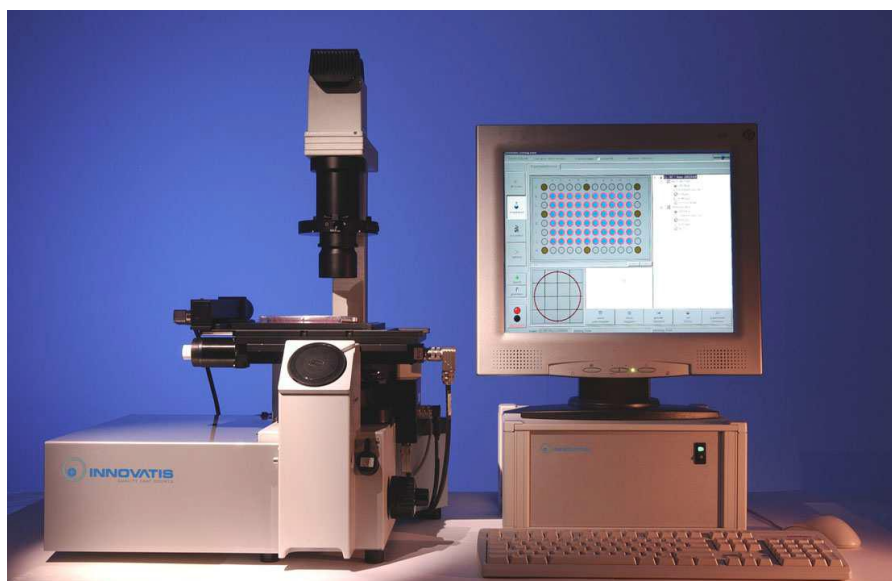


Figure 33. Photographie du Système Cellscreen®.

1.5.2- Concentration des cellules viables et mortes

Après prélèvements, les cellules sont dénombrées à l'aide d'une cellule de Thoma par observation microscopique. Les densités cellulaires présentées dans notre étude résultent de la moyenne obtenue après comptage de six grilles. La viabilité cellulaire est déterminée par coloration des cellules mortes au Bleu Trypan (réf. T8154, Sigma). Un ajout de 10 %

de Bleu Trypan dans la suspension cellulaire permet la coloration en bleu des cellules dont l'intégrité membranaire est endommagée. Les cellules bleues sont donc considérées comme mortes, alors que les cellules qui excluent le colorant sont considérées comme viables.

Le nombre de cellules viables ou bleues est déduit par la formule suivante :

Eq. 1 $C = (N \cdot 10^4 \cdot a)$

C : concentration cellules (cellules/mL)

N : nombre de cellules comptées

a : facteur de dilution

1.5.3- Concentration des cellules lysées

La concentration des cellules lysées est évaluée par mesure indirecte, à partir du dosage de l'activité LDH. Le relargage de la LDH par les cellules a été largement étudié pour estimer la quantité de cellules mortes totales (Racher et *al.*, 1990 ; Legrand et *al.*, 1992 ; Goergen et *al.*, 1993). Les cellules mortes, dénombrées par coloration au Bleu Trypan, relarguent la majorité de leur LDH intracellulaire. La concentration en cellules lysées est donc évaluée par la différence entre la concentration en cellules mortes totales, obtenues à partir de la mesure de l'activité LDH dans le surnageant de culture, et la concentration en cellules mortes dénombrées au Bleu Trypan.

L'activité de la LDH est mesurée par méthode enzymatique (LDH PAP, Ellitech, Salon-de-Provence, France) sur l'automate *Vitalab Selectra E* (Vital Scientific). L'erreur sur la mesure est de l'ordre de 10 %. Selon la méthode décrite par Goergen et *al.* (1993), le contenu intracellulaire en LDH a été déterminé dans les cellules CHO-AMW présentant 100 % de viabilité lors de la phase exponentielle de croissance et pour différentes conditions de milieux de culture. Le contenu intracellulaire en LDH est obtenu par la lyse de 10^5 cellules, réalisée pendant une nuit à 4°C dans une solution de Tween-20 (2 %)/PBS. L'activité intracellulaire moyenne de la LDH dans les cellules CHO a été établie à 30 U/ 10^8 cellules.

Le nombre de cellules lysées est déduit par la formule suivante :

Eq. 2 $C_{lys} = \frac{LDH_{extra}}{LDH_{int ra}} - C_{bleues}$

C_{lys} : concentration de cellules lysées (cellules/mL)

C_{bleues} : concentration de cellules mortes comptées par Bleu Trypan (cellules/mL)

LDH_{extra} : activité LDH dans la surnageant de culture (U/mL)

LDH_{intra} : activité LDH intracellulaire par cellule viable (U/cellule)

1.5.4- Analyse des cellules apoptotiques

La caractérisation et la quantification de l'apoptose des cellules sont réalisées à l'aide du cytomètre Guava EasyCyte (Guava Technologies, France) en utilisant le kit Guava Nexin qui contient deux marqueurs fluorescents : le 7-AAD et l'annexine V. La suspension cellulaire est diluée pour obtenir une concentration entre 10^4 et 10^5 cellules/mL et additionnée de 2 % de BSA pour saturer les sites non spécifiques de liaison des marqueurs fluorescents. Les phases précoces de l'apoptose cellulaire sont détectées par le marquage de la phosphatidyl-sérine membranaire par l'annexine V (Tableau 15). Cette protéine est transloquée à l'extérieur de la membrane cellulaire dans les premières phases de l'apoptose. Les phases tardives de l'apoptose sont mises en évidence par le marqueur 7-AAD, un intercalant de l'ADN qui pénètre dans les cellules lors de la perméabilisation progressive de leur membrane. Les cellules sont incubées 20 minutes à température ambiante dans le noir, puis analysées par le cytomètre. L'acquisition des résultats est réalisée par le module Express Pro, et leur traitement est effectué avec le logiciel Cyflogic (CyFlo Ltd, Finlande). Les paramètres de taille et de granulosité cellulaires sont également mesurés. L'analyse d'une population de cellules témoins, viables à plus de 95 %, permet de ne pas tenir compte des débris cellulaires lors de l'analyse de l'apoptose. Le traitement des données donne accès aux différentes populations cellulaires marquées et donc au pourcentage de cellules apoptotiques précoces et tardives.

Tableau 15. Marquage des différentes populations cellulaires par le kit d'apoptose Guava Nexin®.

Cellules	Annexine-V	7-AAD
Viables	-	-
Apoptotiques précoces	+	-
Apoptotiques tardives	+	+

Des analyses témoins préalables ont été réalisées par induction de l'apoptose et de la nécrose cellulaire, respectivement par l'actinomycine D (40 μ M pendant 48 h) et par chauffage à 95°C pendant 5 minutes. Ces inductions ont été réalisées avec des cellules en phase exponentielle de croissance. Elles ont permis de déterminer les limites des différentes populations cellulaires sur le cytogramme (Figure 34).

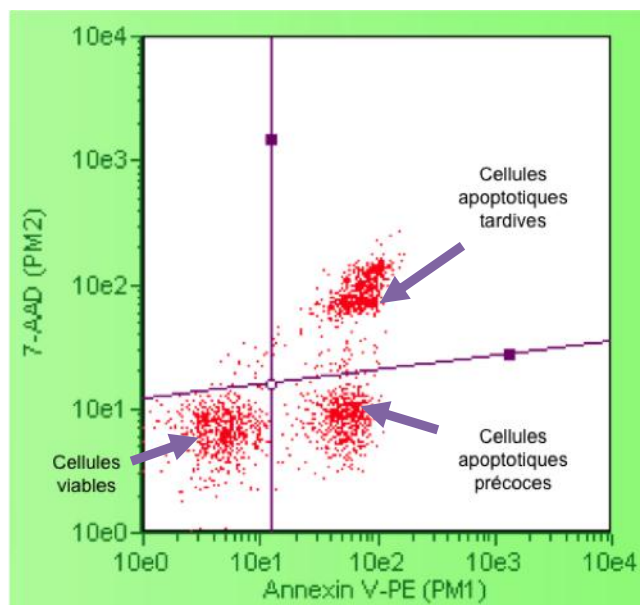
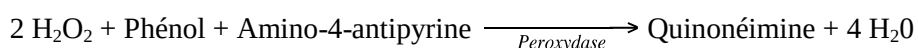
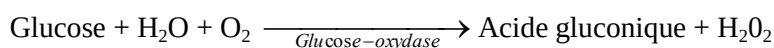


Figure 34. Quantification de l'apoptose précoce et tardive par cytométrie.

1.6- Dosages des substrats et des produits

1.6.1- Glucose

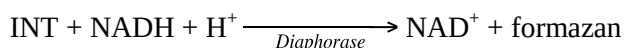
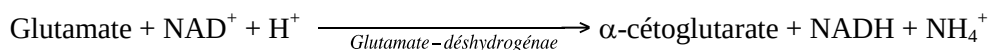
Le dosage du glucose est réalisé à l'aide d'un kit enzymatique (Glucose PAP, réf. GPSL 0500, Elitech, France) et de l'automate Vitalab Selectra E (Vital Scientific, Pays bas), mettant en œuvre les réactions suivantes :



L'apparition de quinonéimine est détectée à 500 nm par spectrophotométrie. L'erreur sur la mesure a été évaluée à moins de 5 %.

1.6.2- Glutamine

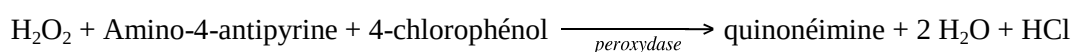
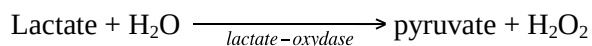
La glutamine est, dans un premier temps, transformée en glutamate grâce à l'asparaginase (réf. A3809, Sigma). Le glutamate est dosé par méthode enzymatique sur plaques 96-puits à partir d'un kit de dosage (réf. 139092, Roche, France), mettant en œuvre les réactions suivantes :



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, entre le glutamate seul et le glutamate total. L'erreur sur la mesure est de l'ordre de 10 %.

1.6.3- Lactate

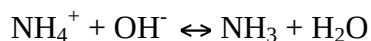
Le dosage du lactate est réalisé à l'aide d'un kit enzymatique (Lactate PAP, réf. 61192, Biomérieux, France) et de l'automate Vitalab Selectra E, mettant en œuvre les réactions suivantes :



L'apparition de quinonéimine est détectée à 500 nm par spectrophotométrie. L'erreur sur la mesure a été évaluée à moins de 5 %.

1.6.4- Ions ammonium

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 0,2 N à 3 mL d'échantillon. Le pH final du mélange 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 :

$$\text{Eq. 3} \quad E = E_o - S * \log(\text{NH}_3)$$

E_o : potentiel de référence (mV),

S : pente de la courbe d'étalonnage,

NH_4 : concentration NH_4 (mM).

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. L'erreur sur la mesure est de l'ordre de 10 %.

1.6.5- Osmolarité

L'osmolarité des milieux de culture est déterminée par un osmomètre (Roebbling, Germany) à partir de solutions standards (réf. W85502, Fisher Bioblock). Le principe de fonctionnement de l'appareil est basé sur la détermination du point de congélation des solutions aqueuses. L'abaissement du point de congélation par rapport à celui de l'eau distillée donne une mesure directe de l'osmolarité. Avant toute mesure, l'appareil est calibré en utilisant de l'eau distillée et une solution standard de 300 mOsm/kg (réf. W85502, Fisher Bioblock).

1.6.6- Anticorps monoclonal recombinant

La technique d'immuno-détection mise en place pour la quantification de l'IgG1 recombinant est un ELISA de type sandwich. Elle utilise deux anticorps polyclonaux qui reconnaissent des épitopes indépendants de l'antigène. Un anticorps IgG humain (réf. 31154, Thermo scientific) dilué dans un tampon (solution de TBS contenant 0,05 % de Tween-20 (vol/vol) et 0,1 % (m/vol) de BSA, pH 7,2-7,4) est utilisé comme standard. L'anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre la chaîne légère kappa des IgG humains (réf. AHI0801, Invitrogen, USA) est dilué dans une solution de PBS (150 ng/mL) et fixé durant une nuit au fond d'une plaque 96 puits (100 µL) (Nunc). Les puits sont rincés 3 fois à l'aide de tampon de lavage (300 µL de solution de PBS contenant 0,05 % de Tween-20 (vol/vol), pH 7,2-7,4). Les sites de fixation non occupés sont saturés durant 1 heure avec un tampon de saturation (200 µL de solution de PBS contenant 1 % de BSA (m/vol) (Fraction V, Sigma)). Après trois rinçages, les échantillons et le standard sont déposés en triplicate sur la plaque 96-puits pour une incubation de 2 heures (200 µL). La concentration du standard est comprise entre 0 et 20000 pg/mL. Afin d'être dans la gamme d'étalonnage, les échantillons sont dilués de 500 à 10000 fois, selon qu'ils proviennent du début ou de la fin de la culture, dans un tampon de dilution (solution de TBS contenant 0,05 % de Tween-20 (vol/vol) et 0,1 % (m/vol) de BSA, pH 7,2-7,4). De plus, différentes dilutions d'un même échantillon sont quantifiées (2 à 4). Après incubation, la microplaque est rincée trois fois avec le tampon de lavage avant le dépôt de l'anticorps de chèvre conjugué à la biotine dirigé contre la chaîne lourde d'IgG humain (réf. H10015, Invitrogen, USA) à une concentration de 100 ng/mL dans 200 µL. La plaque est incubée pendant deux heures à l'obscurité à température ambiante. Après trois rinçages, la peroxidase de radis noir (HRP), conjuguée à la streptavidine (réf. DY998,

R&D Systems) et diluée 200 fois, est ajoutée au complexe anticorps-antigène précédemment formé (200 µL) et laissée en contact pendant 20 minutes. Après 3 lavages, 100 µL d'un mélange d'H₂O₂ et de tétraméthylbenzidine (1 vol/1 vol) (réf. DY999, R&D Systems), sont ajoutés pour une incubation de 20 minutes. La réaction est stoppée par une solution d'H₂SO₄ 2N (50 µL) et l'absorbance est mesurée à 450 nm à l'aide du spectrophotomètre Multiskan MCC/340 (Titertek). De plus, l'absorbance mesurée à 540 ou 570 nm est soustraite aux valeurs obtenues à 450 nm pour s'affranchir des imperfections de la microplaque. L'erreur sur la mesure est de l'ordre de 15 %.

1.7- Calcul des vitesses spécifiques et des rendements

Les courbes d'évolution des données expérimentales au cours du temps sont lissées grâce au logiciel Kypplot (KyensLab Inc., Japon) à l'aide de la fonction « régression spline ». Les vitesses spécifiques et les rendements sont calculés à partir des courbes lissées en utilisant un pas de calcul de 1 h. Les calculs des paramètres cinétiques définis ci-dessous s'appliquent à des cultures réalisées en mode discontinu.

1.7.1- Paramètres de croissance cellulaire

Si X_v est la concentration en cellules viables, X_m la concentration en cellules mortes, r_x et r_d respectivement les vitesses de croissance et de décès cellulaires, les bilans sur les cellules viables et mortes s'écrivent comme suit :

$$\text{Eq. 4} \quad r_x = \frac{dX_v}{dt} + r_d \quad (10^6 \text{ cellules/mL/h})$$

$$\text{Eq. 5} \quad r_d = \frac{dX_m}{dt} \quad (10^6 \text{ cellules/mL/h})$$

$\mu_{\text{réel}}$ et k_d sont respectivement les vitesses spécifiques réelles de croissance et de décès cellulaire. Elles se définissent par :

$$\text{Eq. 6} \quad \mu_{\text{réel}} = \frac{r_x}{X_v} \quad (\text{h}^{-1})$$

$$\text{Eq. 7} \quad k_d = \frac{r_d}{X_v} \quad (\text{h}^{-1})$$

$$\text{Eq. 8} \quad \mu_{\text{app}} = \mu_{\text{réel}} - k_d = \left(\frac{1}{X_v} \right) \left(\frac{dX_v}{dt} \right) \quad (\text{h}^{-1})$$

μ_{app} est définie comme la vitesse spécifique de croissance apparente. Pour plus de lisibilité, dans l'ensemble des travaux elle sera notée μ . La vitesse spécifique maximale de

croissance, $\mu_{\max}$, a été évaluée, soit, à partir de l'évolution de $\mu_{\text{réel}}$ au cours du temps, soit, globalement par la pente de l'évolution logarithmique de la concentration de cellules viables, X_v , au cours du temps.

L'intégrale des cellules viables (ICV) a été calculée avec la méthode des trapèzes avec un pas d'une heure sur différents intervalles de temps :

$$\text{Eq. 9} \quad ICV = \int_0^t X_v(t) * dt \quad (10^8 \text{ cellules.h/mL})$$

1.7.2- Paramètres caractéristiques des métabolites et des produits

En réacteur fermé, les vitesses de consommation de substrat, S, et de produit, P, sont décrites par les bilans suivants, dans l'hypothèse où aucune dégradation ou consommation du produit n'existe.

$$\text{Eq. 10} \quad r_s = \frac{-dS}{dt}$$

$$\text{Eq. 11} \quad r_p = \frac{dP}{dt}$$

Les vitesses spécifiques de consommation de glucose (Glc) et de glutamine (Gln) sont calculées à chaque instant de la culture à partir des courbes expérimentales lissées.

$$\text{Eq. 12} \quad q_{Glc} = -\left(\frac{1}{X_v}\right)\left(\frac{dGlc}{dt}\right) \quad (\mu\text{mol/h}/10^6 \text{ cellules})$$

$$\text{Eq. 13} \quad q_{Gln} = -\left(\frac{1}{X_v}\right)\left(\frac{dGln}{dt}\right) \quad (\mu\text{mol/h}/10^6 \text{ cellules})$$

Les vitesses spécifiques de production de lactate (Lac), d'ions ammonium (NH_4^+) et d'anticorps (IgG) sont calculées avec les équations suivantes :

$$\text{Eq. 14} \quad q_{Lac} = \left(\frac{1}{X_v}\right)\left(\frac{dLac}{dt}\right) \quad (\mu\text{mol/h}/10^6 \text{ cellules})$$

$$\text{Eq. 15} \quad q_{\text{NH}_4^+} = \left(\frac{1}{X_v}\right)\left(\frac{d\text{NH}_4^+}{dt}\right) \quad (\mu\text{mol/h}/10^6 \text{ cellules})$$

$$\text{Eq. 16} \quad p_{IgG} = \frac{1}{X_v} \frac{d[IgG]}{dt} \quad (\mu\text{g/h}/10^6 \text{ cellules})$$

Les rendements de produit généré par rapport au substrat consommé, $Y_{P/S}$, et de cellules formées par rapport au substrat consommé, $Y_{X/S}$, sont calculés selon les formules suivantes de manière globale entre le temps i et $i-1$:

$$\text{Eq. 17} \quad Y_{P/S} = \frac{(P_i - P_{i-1})}{(S_{i-1} - S_i)} \quad (\text{mol/mol})$$

$$\text{Eq. 18} \quad Y_{X/S} = \frac{(X_i - X_{i-1})}{(S_{i-1} - S_i)} \quad (\text{cellules/pmol})$$

Le rendement d'anticorps généré par rapport au nombre de cellules, $Y_{IgG/\text{cellules}}$, est calculé selon la formule suivante de manière globale entre le temps i et $i-1$:

$$\text{Eq. 19} \quad Y_{IgG/\text{cellules}} = \frac{([IgG]_i - [IgG]_{i-1})}{(X_i - X_{i-1})} \quad (\text{pg/cellules})$$

2- Procédés de fractionnement de l'extrait de levure

2.1- Nanofiltration tangentielle

2.1.1- Unité de filtration

Une unité de filtration tangentielle ProScale (Millipore) équipée d'une membrane de nanofiltration, Nanomax 50 (Millipore, Bedford), a été utilisée pour effectuer, d'une part, le fractionnement de l'EXL, et, d'autre part, le dessalage des fractions issues du procédé de fractionnement par chromatographie liquide basse pression (CLBP). L'unité de filtration est constituée de plusieurs éléments : un réservoir d'alimentation, une pompe centrifuge conduisant le liquide d'alimentation vers la membrane, plusieurs vannes manuelles, deux manomètres, l'un sur la ligne d'alimentation et l'autre sur la sortie du rétentat. Le module de filtration permet d'utiliser différents types de membranes (Figure 35). La membrane Nanomax 50 possède un seuil de coupure de 300 à 500 Da et se compose d'une couche en polyamide/polysulfone spiralée de 0,4 m² de surface.

2.1.2- Mode opératoire

Avant l'utilisation de la membrane, l'agent de stockage doit être éliminé. Pour cela, une circulation d'eau déminéralisée est effectuée dans le circuit. A l'issue de cette étape, la perméabilité de la membrane est calculée par la mesure des débits du perméat à différentes pressions transmembranaires (de 1 à 5 bars). Cette opération permet de vérifier l'intégrité et la propreté de la membrane. L'eau est évacuée du système de filtration et le produit à nanofiltrer est introduit dans le réservoir d'alimentation. Puis, le produit est recirculé dans le système fermé pour évacuer l'air du système de filtration. Parallèlement, le système de refroidissement est mis en route pour maintenir une température de 25°C au cours de la nanofiltration. La nanofiltration du produit peut alors commencer. Les paramètres opératoires mis en œuvre sont précisés dans les paragraphes suivants. A l'issue de la filtration, le produit initial est séparé en deux fractions : les molécules retenues par la membrane (rétentat) et les molécules exclues par la membrane (perméat). L'unité de filtration est vidangée et des étapes de nettoyage à l'eau (en circuit ouvert et fermé) et à la soude 0,2 N (en circuit fermé) sont réalisées. La membrane est alors stockée en chambre froide à 4°C.

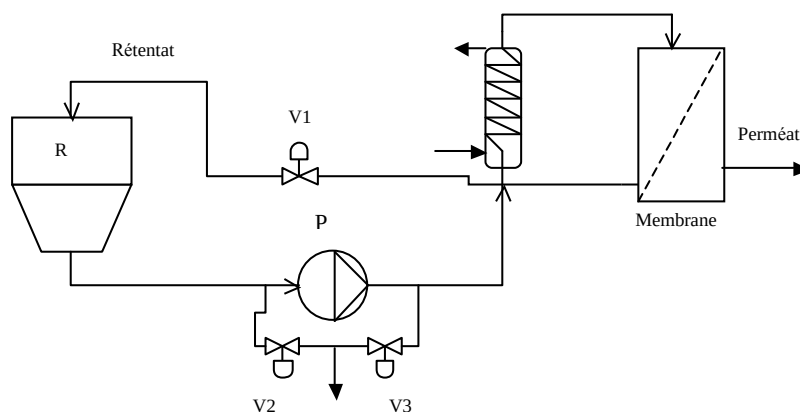


Figure 35. Procédé de fractionnement par nanofiltration tangentielle. (R : réservoir d'alimentation, V : Vannes manuelles, P : pompe).

2.1.3- Fractionnement de l'EXL

Un volume de 4 L d'EXL concentré à 2,5 % (m/vol) a été nanofiltré avec une pression transmembranaire de $6,5 \cdot 10^5$ Pa et une température de 25°C. Après stabilisation du système par recyclage du perméat, une première étape de concentration a été effectuée jusqu'à ce que la cuve d'alimentation ne contienne plus que 2 L de rétentat. Le débit du perméat était alors de 3,6 L/h. Des diafiltrations successives ont ensuite été réalisées pour supprimer la totalité des molécules de faibles PM contenues dans le rétentat. Chaque étape de diafiltration consiste à ajouter 2 L d'eau distillée dans la cuve d'alimentation, puis à concentrer le rétentat jusqu'à ce qu'il n'en reste plus que 2 L. Selon le nombre de diafiltrations, le débit de perméat a augmenté jusqu'à 5,0 L/h. Le nombre de diafiltrations nécessaire a été déterminé grâce aux mesures de conductivité (WTW LF96) et de matière sèche dans le compartiment perméat. A la dernière étape de diafiltration, le rétentat a été concentré dans un volume de 1 L. Les rétentats issus de 2, 5 et 8 étapes de diafiltrations ainsi que le perméat issu de la première étape de concentration ont été lyophilisés (Figure 36).



Figure 36. Perméat (NF-P) et rétentat (NF-R) issus du fractionnement de l'EXL par nanofiltration membranaire après 8 diafiltrations et lyophilisation.

2.1.4- Dessalage des fractions

Les fractions, issues des CLBP d'échange d'ions et d'interactions hydrophobes, contiennent des concentrations importantes en tampons et sels, avec respectivement 20 mM Trizma + 1 M de NaCl et 50 mM Phosphate + 3 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^{2-}$. Le procédé de nanofiltration, mis en œuvre pour fractionner l'EXL, a alors été utilisé pour dessaler ces fractions provenant du rétentat. Les sels monovalents ont un taux de passage plus élevé (80 %) que celui des ions bivalents (60 %). Ce taux de passage diminue à mesure que le taux d'hydratation du sel augmente et donc que sa concentration diminue (Abouzaid et *al.*, 2003). La mesure de la conductivité du perméat a permis de déterminer le nombre de diafiltrations nécessaire pour dessaler les fractions. De même, grâce à des gammes étalons réalisées avec du Trizma, du NaCl, du Phosphate et du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^{2-}$ (Sigma), la concentration en sels retirée dans le perméat à chaque étape de diafiltration a pu être calculée à partir de la mesure de la conductivité.

2.2- Chromatographie liquide basse pression

Des procédés de chromatographie liquide basse pression (CLBP) ont été mis en œuvre pour fractionner le rétentat de l'EXL nanofiltré. L'objectif de ce fractionnement n'était pas d'isoler une molécule unique, mais des mélanges de biomolécules partageant un même critère physico-chimique : charge électrique, taille ou hydrophobie.

2.2.1- Echange d'ions

Dans un premier temps, un criblage a été réalisé en tubes à essais pour choisir la phase stationnaire et le tampon d'équilibrage (nature et pH) de la CLBP d'échange d'ions (EI). 28 conditions ont été testées, avec 2 gels échangeurs de cations (SP et CM Sepharose), 2 gels échangeurs d'anions (Q et DEAE Sepharose) (GE Healthcare, Life Science) et 7 tampons d'équilibrage (Sigma-Aldrich Co., USA) (Tableau 16). 3 mL de gel ont été introduits dans chaque tube. Puis, les échantillons d'EXL nanofiltré, dissous à 2 g/L dans les tampons d'équilibrage, ont été ajoutés après décantation des gels et suppression des surnageants. Après, 10 minutes de temps de contact les surnageants ont été soutirés et leurs absorbances mesurées (à 214 et 280 nm). La comparaison entre l'absorbance des échantillons et des surnageants a permis d'évaluer la quantité relative d'EXL nanofiltré adsorbé sur les différents gels. Puis, les molécules de l'EXL nanofiltré ont été désorbées par l'ajout des tampons d'équilibrage additionnés de 1 M de NaCl. L'absorbance des

surnageants a également été mesurée pour évaluer la quantité de matière qui a été adsorbée sur les gels. Suivant ce protocole, c'est la procédure opératoire utilisant le gel Q Sepharose échangeur d'anions et le tampon Trizma 20 mM à un pH 8 qui a permis de fixer le plus de molécules d'EXL nanofiltré (Tableau 16).

Tableau 16. Choix de la phase stationnaire et du tampon d'équilibrage pour la chromatographie d'échange d'ions.

	Tampon équilibrage		Echangeur cations		Echangeur anions	
	mM	pH	SP	CM	Q	DEAE
Acide Malonique	20	2,0	/	++	/	/
Acide Citrique	20	4,0	/	/	/	/
Acide Malonique	50	5,5	/	/	/	/
Phosphate	50	6,5	/	/	+	+
HEPES	50	7,5	/	/	++	++
Trizma-base	20	8,0	/	/	+++	++
Glycine	20	10,5	/	/	++	++

Des essais ont alors été réalisés sur une colonne (ϕ 1,6 x H 10 cm) avec la phase stationnaire Q Sepharose et le tampon d'équilibrage Trizma 20 mM à pH 8 pour déterminer la charge maximale de la colonne et les conditions d'élution pour la récolte des fractions. Des quantités d'EXL nanofiltré de 15, 22,5, 30, et 37,5 mg ont été déposées sur la colonne équilibrée à un débit de 1 mL/min. L'aire sous la courbe du chromatogramme correspondant au pic de la fraction non retenue a été comparée à celle de la fraction désorbée avec le tampon d'équilibrage additionné de NaCl 1 M. Les résultats ont permis de sélectionner une quantité maximale de 30 mg. Par conséquent, la fraction exclue par la phase stationnaire ne sera pas due à une surcharge de la colonne, mais bien aux propriétés des molécules dont la charge électrique n'aura pas d'affinité avec le gel. Par ailleurs, le gradient d'élution a été déterminé en testant des paliers avec différentes concentrations en NaCl pour désorber des quantités de molécules similaires à celles de la fraction exclue. Finalement, deux paliers ont été retenus, correspondant à des concentrations en NaCl de 0,1 et 1 M dans le tampon d'équilibrage. Les conditions d'élution choisies ont permis la récolte de trois fractions, A.1, A.2 et A.3, qui correspondent aux molécules respectivement cationiques ou neutres, faiblement anioniques ou fortement anioniques. Ces conditions ont été extrapolées dans une colonne de ϕ 10 x H 10 cm, soit une augmentation du volume de

la phase stationnaire par un facteur 40, en vue de récupérer une quantité suffisante de matière pour les essais ultérieurs de culture. Dans ce cas, la quantité d'EXL nanofiltré déposée sur la colonne et le débit ont été multipliés par 40. Les conditions opératoires sont détaillées dans le Tableau 17. A l'issue du fractionnement, les fractions ont été dessalées par le procédé de nanofiltration membranaire, concentrées et lyophilisées (Figure 37).



Figure 37. Fractions A.1 (F1), A.2 (F2) et A.3 (F3) issues du fractionnement de l'EXL nanofiltré par chromatographie liquide d'échange d'anions.

2.2.2- Exclusion de taille

Le procédé de fractionnement de l'EXL nanofiltré par la CLBP d'exclusion de taille (ET) a été développé à petite échelle avec une colonne Sephadex G-15 de ϕ 1,6 x H 75 cm (GE Healthcare, Life Science). Cette phase stationnaire permet la séparation des molécules de PM compris entre 300 et 1500 Da. Une quantité de 45 mg a été déposée sur la colonne équilibrée avec de l'eau déminéralisée à un débit de 0,6 mL/min. Un gradient isocratique a alors été utilisé pour l'élution de l'EXL nanofiltré. Les périodes de récolte des fractions ont été définies afin que chaque aire des fractions sous le chromatogramme soit équivalente. Trois fractions ont été isolées, S.1, S.2 et S.3, correspondant aux molécules de haut, moyen et plus faible PM. Puis, la CLBP-ET a été extrapolée dans une colonne Sephadex G-15 de ϕ 5 x H 75 cm, soit une augmentation du volume de la phase stationnaire par un facteur 10. Ainsi, 450 mg d'EXL nanofiltré ont été déposés sur la colonne équilibrée avec un débit de 6 mL/min d'eau déminéralisée. Le Tableau 17 définit les conditions de séparation pour la récolte des fractions S.1, S.2 et S.3, avant leur lyophilisation.

2.2.3- Interactions hydrophobes

La séparation par CLBP d'interactions hydrophobes (IH) peut-être optimisée en fonction du choix de la phase stationnaire, du pH du tampon d'équilibrage, de la nature du sel et de

sa concentration. Nous avons choisi de travailler avec un gel de phényl sépharose (GE Healthcare, Life Science) équilibré dans un tampon phosphate 50 mM à pH 7,2 avec du sulfate d'ammonium (Sigma). Des tests en tubes à essais ont été réalisés pour définir la concentration en sel (1, 2, 3 et 4 M) ajoutée dans le tampon d'équilibrage, selon le protocole présenté pour le développement de la CLBP-EI. Un tampon d'équilibrage composé de phosphate à 50 mM et de sulfate d'ammonium à 3 M a été nécessaire pour adsorber une quantité significative d'EXL nanofiltré. Ensuite, des tests ont été réalisés sur colonne ϕ 1,6 x H 10 cm équilibrée à 2 mL/min dans le tampon d'équilibrage pour définir la charge maximale de la colonne et les conditions d'élution pour isoler des fractions de quantités équivalentes. Des quantités d'EXL nanofiltré de 15, 22,5, 30 et 37,5 mg ont été déposées sur la colonne. L'aire sous la courbe de la fraction non retenue a été comparée à celle de la fraction désorbée avec le tampon phosphate à 50 mM (sans sulfate d'ammonium). Une quantité maximale de 30 mg a été sélectionnée. De plus, les aires correspondant aux fractions retenue (H.1) et non retenue (H.2) se sont avérées similaires. Nous avons donc choisi de séparer l'EXL nanofiltré en deux fractions. Puis, ces conditions ont été extrapolées sur une colonne de ϕ 5 x H 10 cm de phényl sépharose, soit une augmentation du volume de la phase stationnaire par un facteur 10. Les conditions de séparation pour la récolte des fractions H.1 et H.2 sont détaillées dans le Tableau 17. Les fractions récoltées ont été dessalées par nanofiltration membranaire, concentrées et lyophilisées.

Tableau 17. Conditions opératoires de fractionnement de l'EXL nanofiltré par les procédés de chromatographie basses pression.

Méthode de séparation	Colonne	Éluant	Mode d'élution	Débit (mL/min)	Volume récoltés	Fraction
CLBP-EI	Q Sepharose H 10 cm, Φ 10 cm	A: Trizma 20 mM, pH 8	0 - 1179 mL: 100 % A	40	394-1807 mL	A.1
		B: Trizma 20 mM + 1 M NaCl, pH 8	1572 - 2751 mL: 90 % A, 10 % B		1807-3378 mL	A.2
			2751 - 5109 mL: 100 % B		3378-4321 mL	A.3
CLBP-IH	Phenyl Sepharose H 10 cm, Φ 5 cm	A: Phosphate 50 mM, (NH ₄) ₂ SO ₄ 3 M, pH 7.2	0-590 mL: 100 % A	20	99-590 mL	H.1
		B: Phosphate 50 mM, pH 7.2	590-1080 mL: 100 % B		590-1080 mL	H.2
CLBP-ET	G-15 Sephadex H 75 cm, Φ 5 cm	Eau déminéralisée	0-850 mL: Isocratic	6	527-560 mL	S.1
					560-618 mL	S.2
					618-824 mL	S.3

2.2.4- Procédé de fractionnement séquentiel

Un procédé de fractionnement séquentiel a été réalisé avec des étapes successives de CLBP EI, IH et ET comme décrit dans la Figure 38. Les mêmes conditions de séparation que celles mises au point pour le fractionnement de l'EXL nanofiltré en une étape de CLBP ont été utilisées (Tableau 17). Au total, 18 passages de CLBP-EI ont été réalisés pour obtenir une quantité suffisante de matière pour les étapes ultérieures. Chaque fraction issue de la CLBP-EI a été fractionnée par 10 passages de CLBP-IH. Finalement, chaque fraction issue de la CLBP-IH a été fractionnée par une étape de CLBP-ET.

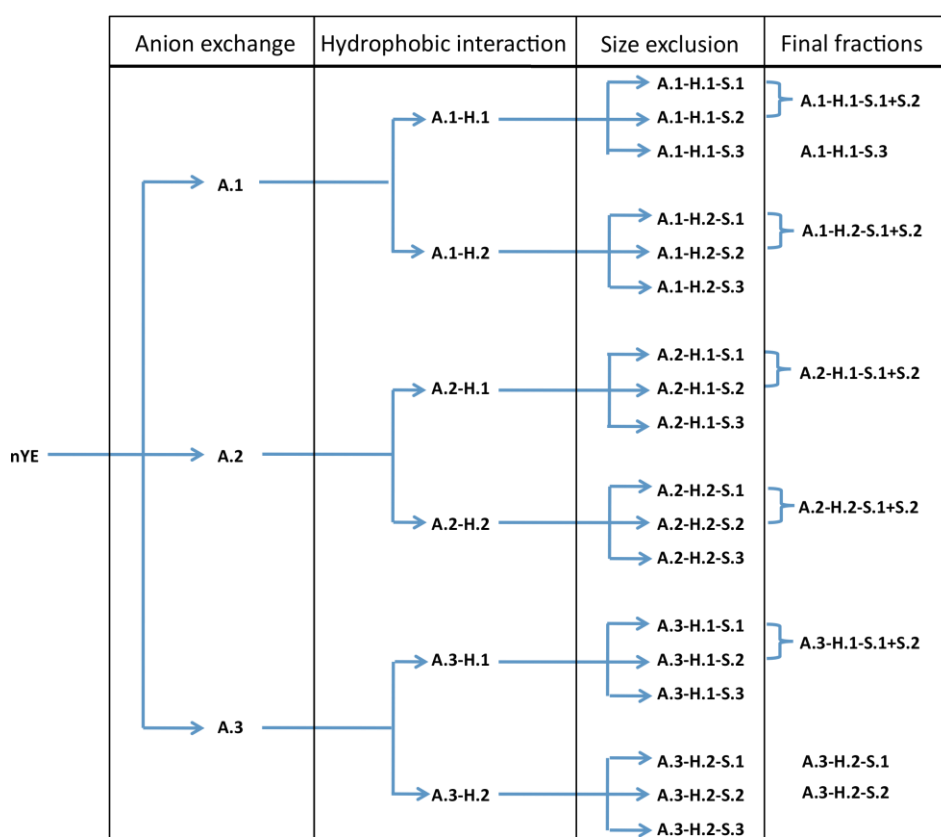


Figure 38. Diagramme des étapes du procédé de fractionnement incluant séquentiellement l'étape de CLBP-EI (A.x), CLBP-IH (A.x - H.y) et CLBP-ET (A.x - H.y - S.z).

2.3- Préparation des produits

2.3.1- Concentration

Une étape de concentration des fractions est réalisée avec un évaporateur rotatif, rotavap® (Büchi labor-technik AG, Suisse). Le principe de cet appareil est basé sur la distillation à basse température sous vide partiel. L'échantillon est placé dans le ballon qui est mis en rotation pour éviter des bulles d'ébullition trop grosses ou mousseuses, puis la pression est diminuée grâce à une trompe à eau et la solution est chauffée à 37 °C pour accélérer l'évaporation.

2.3.2- Lyophilisation

Le lyophilisateur (Cambridge Biosystems, Angleterre) est composé d'une enceinte frigorifique pouvant être mise sous vide et d'un piège frigorifique. Les fractions sont congelées à -80°C avant d'être introduites dans l'enceinte du lyophilisateur. La réfrigération (-50°C) et la pompe à vide sont alors mises en marche. L'eau à l'état solide est sublimée à l'état gazeux, puis piégée. Les étapes de lyophilisation durent de 1 à 4 jours selon la quantité d'eau à évaporer.

3- Caractérisation des hydrolysats de levure et des fractions

3.1- Matière protéique

3.1.1- Profils de poids moléculaire des peptides

La distribution du poids moléculaire des peptides contenus dans les hydrolysats de levure ou les fractions a été obtenue par une chromatographie liquide haute performance d'exclusion de taille (CLHP-ET) selon les conditions détaillées dans le Tableau 18. Cette méthode permet l'obtention d'un profil entre 200 et 7000 Da. Le volume d'injection est de 50 μ L pour des concentrations d'échantillon entre 5 et 20 g/L.

La colonne a été calibrée avec des peptides standards de masse molaire 204,2 ; 238,2 ; 261,3 ; 303,4 ; 379,4 ; 437,5 ; 658,9 et 930 g/mol (Sigma-Aldrich Co., USA) et 811,1 ; 1151,5 ; 1332,6 et 2106,9 g/mol (LCPM-CNRS, France). La droite de calibration a été obtenue en traçant le logarithme de la masse molaire en fonction du temps de rétention (Figure 39).

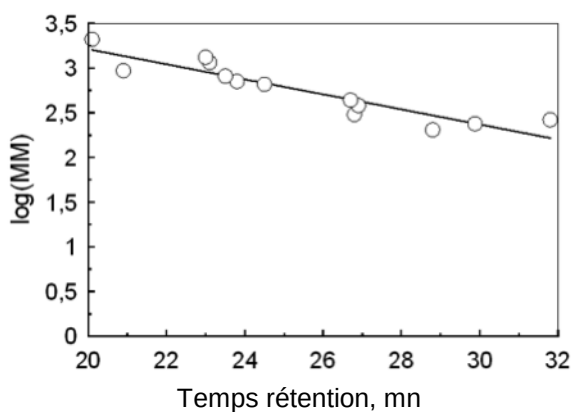


Figure 39. Relation entre la masse molaire (MM) et le temps de rétention de peptides étalons obtenue par CLHP-ET.

3.1.2- Acides aminés

La composition en acides aminés totaux a été déterminée après l'hydrolyse des peptides par de l'acide chlorhydrique 6 N à une température de 110°C pendant 24 h. Les échantillons ont été refroidis à température ambiante, ajustés à pH 4,5 avec de la soude 4 N et filtrés à travers une membrane 0,22 μ m. L'hydrolyse acide entraîne la désamination des groupes amides de l'asparagine et de la glutamine pour donner respectivement l'acide

aspartique et l'acide glutamique ainsi que des ions ammonium. La composition en acides aminés libres a été déterminée à partir des échantillons non hydrolysés.

Les acides aminés ont été dérivatisés avec du 9-fluoroenylméthyl chloroformiate et de l'ortho-phthalaldéhyde, puis analysés par HPLC phase inverse (Shimadzu Corporation) dans les conditions décrites dans le Tableau 18. Le volume d'injection est de 1 µL pour des concentrations d'échantillon entre 1 et 5 g/L. La méthode ne permet pas de détecter la proline et la cystine. Les concentrations d'acides aminés ont été calculées à partir des courbes d'étalonnage réalisées avec un kit d'acides aminés (Sigma-Aldrich Co., USA).

3.2- Matière glucidique

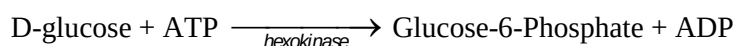
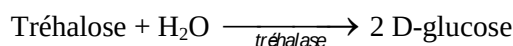
3.2.1- Glucides totaux et libres

La composition en glucides a été déterminée après hydrolyse des polysaccharides par de l'acide chlorhydrique 2 N à une température de 104°C pendant 4 h. Les solutions ont été diluées 25 fois dans de l'eau déminéralisée et filtrées à travers une membrane 0,22 µm. La composition en monosaccharides a été déterminée à partir des échantillons non hydrolysés.

Les monosaccharides ont été analysés par HPLC d'échange d'ions (Metrohm, Suisse) selon les conditions décrites dans le Tableau 18. Le volume d'injection est de 20 µL pour des concentrations d'échantillon entre 1 et 5 g/L. La concentration de glucose et de mannose, principaux monosaccharides contenus dans les polysaccharides des hydrolysats de levure, a été calculée à partir de courbes d'étalonnages préparées avec des solutions standards (Sigma-Aldrich Co., USA).

3.2.2- Tréhalose

Le tréhalose a été quantifié à partir d'un kit enzymatique (réf. K-TREH, Mégazyme, Irlande), mettant en œuvre les réactions suivantes :



L'apparition de NADPH est détectée à 340 nm par spectrophotométrie.

3.3- Matière nucléique

La composition en acides nucléiques totaux a été déterminée après hydrolyse par de l'acide perchlorique (HClO_4) à 60 % à une température de 95°C pendant 70 mn. Les solutions ont été neutralisées dans du phosphate d'ammonium ($(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$) à 2 M et filtrées à travers une membrane de 0,22 μm .

Les bases azotées (adénine, cytosine, uracile, guanine, thymine et hypoxanthine) ont été analysées par HPLC en phase inverse (Dionex) dans les conditions décrites dans le Tableau 18. Le volume d'injection est de 20 μL pour des concentrations d'échantillon entre 5 et 10 g/L. Les concentrations de bases azotées ont été calculées à partir de courbes d'étalonnages préparées avec des solutions standards (Sigma-Aldrich Co., USA).

Tableau 18. Conditions opératoires de l'analyse par CLHP du profil des poids moléculaires des peptides et de la concentration des acides aminés, monosaccharides et bases azotées.

Molécules analysées	Méthode de séparation	Gel et Colonne	Eluants	Mode d'élution	Débit (mL/min)	Détecteur
Peptides	Exclusion de taille	Superdex peptide HR 10/30	H_2O / Acetonitrile/ Acide trifluoroacétique (60/40/0,1, v/v/v)	0-30 mL: Isocratique	0,6	UV (214 and 226 nm)
Acides aminés	Phase inverse	Hypersil 5 μm C18	A: Acétate de sodium 20 mM triéthylamine 0,024 % tétrahydrofurane 0.5 % at pH 7.2 B: ACN/Méthanol/100 mM acétate de sodium (40/60/20, v/v/v) at pH 7.2	0-17 mL: 100 % A 17-18 mL: 40 % A, 60 % B 18-25 mL: 100 % B	1	Fluorimètre (475 nm)
Mono-saccharides	Echange d'ions	Metrosep CARBI 250 mm*4,5 mm	Acétate de sodium 50 mM, NaOH 250 mM	0-25 mL: Isocratique	1,25	Amperomètre
Bases azotées	Phase inverse	LiChroCart 250-4 LiChrospher 100 RP-18 endcapped 5 μm	A: $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 20 mM at pH 4 B: Acétonitrile/ Méthanol/ Tétrahydrofuran (50/40/100, v/v/v)	0-2,4 mL: 100 % A 2,4-4,8 mL: 97 % A, 3 % B 4,8-15,2 mL: 75 % A, 25 % B 15,2-20 mL: 100 % B	0,8	UV (260 nm)

Résultats & discussion

Chapitre 1

Comparaison de l'influence de divers hydrolysats de levure sur la culture de cellules CHO productrices d'anticorps

COMPARAISON DE L'INFLUENCE DE DIVERS HYDROLYSATS DE LEVURE SUR LA CULTURE DE CELLULES CHO PRODUCTRICES D'ANTICORPS

1- INTRODUCTION.....	124
2- INFLUENCE DE LA COMPOSITION ET DE LA CONCENTRATION DES HYDROLYSATS DE LEVURE EN FIOLE D'ERLENMEYER.....	125
2.1- COMPOSITION DES HYDROLYSATS DE LEVURE	125
2.2- CROISSANCE ET DECES CELLULAIRES	126
2.3- PRODUCTION DE L'IGG1 ANTI-RHD.....	128
2.4- CONSOMMATION DU GLUCOSE ET PRODUCTION DU LACTATE	131
2.5- CONSOMMATION DE GLUTAMINE ET PRODUCTION D'IONS AMMONIUM	136
2.6- CONCLUSION	140
3- INFLUENCE DE L'AJOUT DE GLUCOSE, DE GLUTAMINE OU DE MELANGES D'HYDROLYSATS EN COURS DE CULTURE EN FIOLE D'ERLENMEYER.....	141
3.1- INFLUENCE DE L'AJOUT DE GLUCOSE ET GLUTAMINE SUR LA CROISSANCE CELLULAIRE.....	141
3.2- INFLUENCE DE MELANGES D'HYDROLYSATS SUR LA CROISSANCE CELLULAIRE ET LA PRODUCTION D'IGG1 ANTI-RHD.....	143
3.3- CONCLUSION	146
4- INFLUENCE DE L'AJOUT DE MELANGES D'HYDROLYSATS DE LEVURE : COMPARAISONS ENTRE FIOLE ET REACTEUR CONTROLE	148
4.1- INTRODUCTION.....	148
4.2- MANUSCRIT.....	149
4.3- PRINCIPALES CONTRIBUTIONS DU MANUSCRIT	167
5- CONCLUSION DU CHAPITRE 1	168

1- Introduction

Dans cette partie nous proposons d'étudier l'influence d'hydrolysats de levure sur les performances d'un procédé de culture de cellules CHO productrices d'un anticorps monoclonal. Nous souhaitons notamment déterminer l'impact des conditions d'utilisation de ces hydrolysats sur la réponse cellulaire. Ces conditions incluent la composition des hydrolysats, leur concentration, le moment d'ajout et l'utilisation de mélanges. De même, nous évaluons les effets en cours de culture d'ajouts de glucose et de glutamine conjointement à l'extrait de levure. Finalement, nous extrapolons en réacteurs contrôlés les conditions opératoires présentant les résultats les plus probants en systèmes de culture non contrôlés.

Afin de déterminer les principaux mécanismes d'action des hydrolysats de levure, la démarche suivie intègre les conditions de culture et leur impact sur la réponse cellulaire (Figure 40).

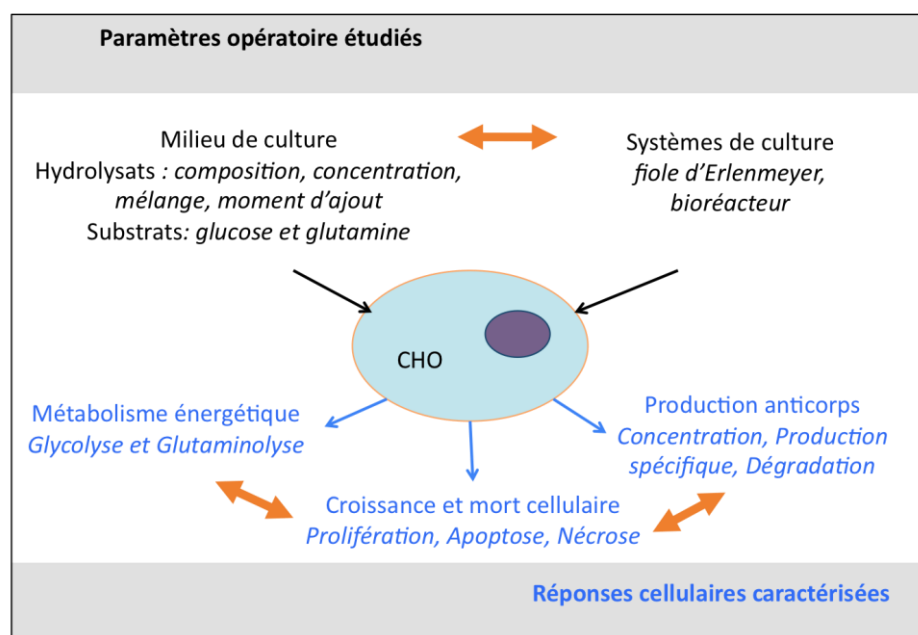


Figure 40. Paramètres opératoires étudiés et réponses cellulaires caractérisées lors de l'étude de l'influence d'hydrolysats de levure sur le procédé de culture de cellules CHO productrices d'un anticorps monoclonal.

2- Influence de la composition et de la concentration des hydrolysats de levure en fiole d'Erlenmeyer

La lignée cellulaire CHO-AMW productrice de l'anticorps IgG1 anti-rhésus D (anti-RhD) a été utilisée au cours de notre étude (Miescher et *al.*, 2000). Elle a initialement été adaptée à la culture en suspension dans le milieu commercial proCHO5 chimiquement défini (De Jesus et *al.*, 2004). La composition du milieu de culture commercial étant confidentielle, nous avons choisi d'adapter la lignée cellulaire CHO-AMW au milieu de culture BDM, sans protéine et chimiquement défini qui correspond au milieu de référence (Schneider, 1989).

2.1- Composition des hydrolysats de levure

Les trois hydrolysats utilisés dans notre étude sont issus de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'extrait de levure (EXL) correspond à la fraction soluble de l'autolyse de la levure, alors que les peptones P.A et P.B sont issues d'un procédé d'hydrolyse d'extrait protéique de levures plasmolysées. La composition des principales biomolécules des hydrolysats est présentée en Figure 41-A. Les trois hydrolysats contiennent majoritairement de la matière azotée, mais également de la matière glucidique et nucléique. L'EXL est plus riche en composés non peptidiques avec 7 % de matière nucléique, contre 1,5 et 3 % respectivement pour les peptones P.A et P.B. De même, l'EXL contient 10 % de matière glucidique, quantité similaire à celle de la peptone P.A avec 9,5 % contre seulement 2 % dans la peptone P.B. Par ailleurs, l'EXL contient une forte quantité d'acides aminés libres (36 %) et seulement 23 % de peptides, alors que la peptone P.B contient 16 % d'acides aminés libres et 59 % de peptides. Enfin, la peptone P.A présente environ 1 % d'acides aminés libres et 70 % de peptides. Les profils de poids moléculaire des peptides, obtenus par CLHP d'exclusion de taille, indiquent que le poids moléculaire moyen des peptides de l'EXL est plus faible que celui des peptones (Figure 41-B). Ainsi, ces résultats mettent bien en évidence l'effet du procédé d'obtention des hydrolysats sur le degré d'hydrolyse des protéines. Les hydrolysats contiennent également d'autres molécules, non analysées telles que des vitamines, des sels et des éléments traces. Par exemple, d'après le fournisseur, l'EXL contient jusqu'à 15 % de sels et 0,25 % de vitamines (données non fournies pour les peptones).

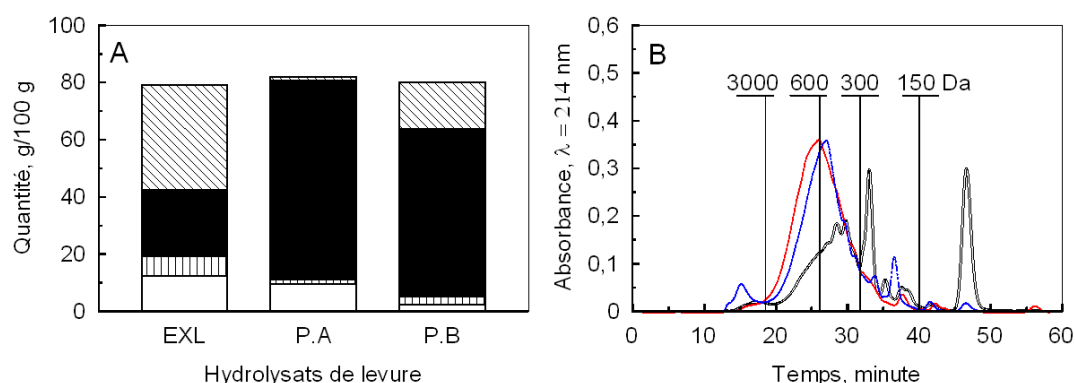


Figure 41. (A) Composition de l'EXL et des peptones P.A et P.B en glucides totaux ($\square$), acides nucléiques ($\square$), peptides ($\blacksquare$) et acides aminés libres ($\square$). (B) Profils de distribution de poids moléculaire des peptides de l'EXL (—), des peptones P.A (—) et P.B ($\cdots$) analysés par CLHP d'exclusion de taille.

2.2- Croissance et décès cellulaires

L'influence de l'EXL et des peptones P.A et P.B, ajoutés au milieu de culture de référence aux concentrations de 1 ou 4 g/L, sur les cinétiques de croissance et de décès de cellules cultivées en fiole d'Erlenmeyer est présentée Figure 42. Les cellules viables cultivées dans le milieu de référence atteignent une densité maximale de $2,9 \cdot 10^6$ cellules/mL au bout d'environ 120 h. Durant les 50 premières heures, l'ajout d'hydrolysats n'a pas d'effet apparent sur la croissance cellulaire. Cependant, après 90 h, il permet d'atteindre des concentrations maximales de cellules viables supérieures à celle obtenue sans ajout. Les cultures réalisées en présence de l'EXL, ajouté aux concentrations de 1 et 4 g/L, atteignent les plus hautes concentrations maximales de cellules viables avec respectivement $5,1$ et $5,0 \cdot 10^6$ cellules/mL, soit une augmentation d'environ 70 % par rapport au milieu de référence. De même, les cellules cultivées dans le milieu de référence avec ajout des peptones P.B et P.A atteignent respectivement une concentration maximale de cellules viables de $4,5$ et $3,9 \cdot 10^6$ cellules/mL, quelle que soit leur concentration d'ajout. Ainsi, la composition de l'hydrolysats conditionne la concentration maximale de cellules viables, ce qui est en accord avec une précédente étude (Chun et *al.*, 2007). En revanche, leur concentration d'ajout a peu d'influence dans la gamme testée. Ces effets variés des hydrolysats sur la prolifération cellulaire pourraient être liés à leur degré de dégradation, avec un effet plus positif lorsque ce degré est plus élevé. Cependant, la multiplication de la concentration des peptones par un facteur 4, même si elle augmente la proportion de molécules de plus petites tailles, ne provoque pas d'amélioration de la croissance cellulaire. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat : soit, les peptones de levure ne

contiennent pas certaines molécules spécifiques de l'EXL ; soit, elles contiennent des molécules inhibitrices de la croissance cellulaire.

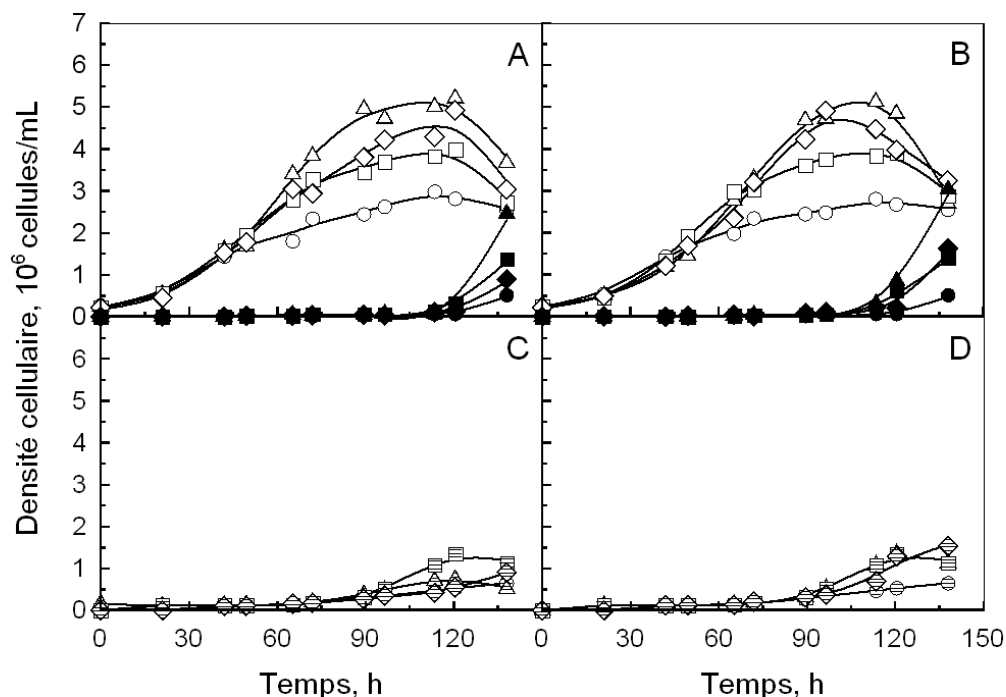


Figure 42. Evolution des concentrations de cellules viables (symboles ouverts) et de cellules mortes (symboles fermés) et lysées (symboles hachés) au cours de cultures discontinues de cellules CHO-AMW cultivées dans le milieu de référence (O), supplémentées avec l'EXL (Δ), la peptone P.A ($\square$) ou la peptone P.B ($\diamond$) ajoutées à 1 g/L (A et C) et 4 g/L (B et D).

Lors de la phase active de croissance, aucune cellule morte n'est détectée indiquant une viabilité cellulaire maximale quel que soit le milieu utilisé. Après 70 h de culture, l'apparition de cellules lysées coïncide avec le début de la phase stationnaire de croissance. L'EXL et la peptone P.B, ajoutées à 1 g/L, n'ont pas d'effet sur la quantité de cellules lysées par rapport au milieu témoin avec une quantité finale d'environ $0,7 \cdot 10^6$ cellules/mL. L'EXL et la peptone P.B diminuent donc légèrement la proportion de cellules lysées. Par contre, la présence de peptone P.A est responsable d'une augmentation de cellules lysées avec $1,2 \cdot 10^6$ cellules/mL. De plus, l'ajout des hydrolysats à 4 g/L induit une augmentation du nombre de cellules lysées identique à la peptone P.A ajoutée à 1 g/L. La fin de la phase stationnaire de croissance est concomitante à l'apparition des cellules mortes non lysées, c'est à dire après 120 h pour toutes les cultures.

Ainsi, dans notre modèle d'étude, l'amélioration de la concentration cellulaire par l'ajout d'hydrolysats ne semble pas liée à un effet protecteur ou anti-apoptotique prévenant les

cellules de la mort cellulaire, comme certains auteurs en ont fait l'hypothèse (Schlaeger, 1996 ; Farges-Haddani et al., 2006 ; Franek et al., 2000). En effet, les hydrolysats stimulent la prolifération cellulaire, ce qui se traduit après environ 45 h par une vitesse spécifique de croissance qui se maintient à une valeur plus élevée que dans la culture de référence (Figure 43 et Tableau 19). Ce résultat pourrait provenir de l'ajout de substances nutritionnelles limitantes dans le milieu de culture de référence, de l'ajout de facteurs de croissance stimulant la division cellulaire ou de la présence de molécules améliorant le métabolisme cellulaire. Cependant, les hydrolysats n'augmentent pas la vitesse maximale de croissance, calculée à $0,040 \text{ h}^{-1}$ pour toutes les cultures. Différentes études confirment que l'ajout d'hydrolysats ne permet pas d'améliorer la vitesse spécifique de croissance de cellules CHO (Sung et al., 2004 ; Burtéau et al., 2003 ; Kim & Lee, 2009).

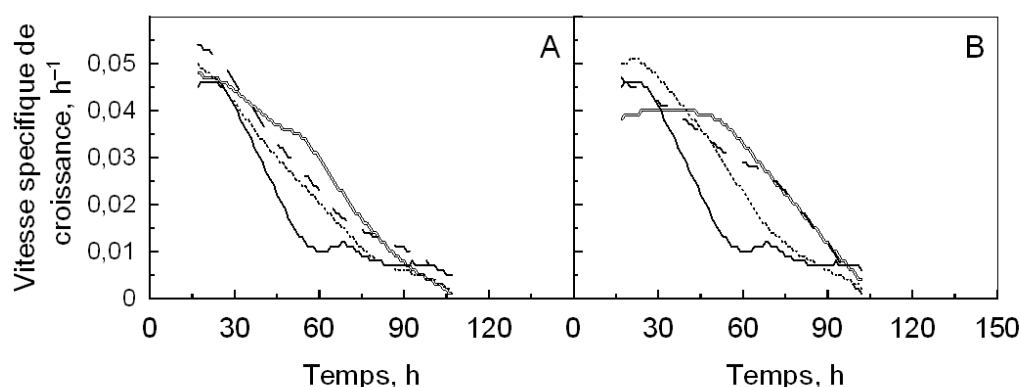


Figure 43. Vitesses spécifiques de croissance des cellules CHO-AMW cultivées dans le milieu BDM (—), avec ajout de l'EXL (==), la peptone P.A (.....) ou la peptone P.B (---), aux concentrations de 1 g/L (A) et 4 g/L (B).

2.3- Production de l'IgG1 anti-RhD

Les cinétiques de la production d'IgG1 anti-RhD (IgG) par les cellules CHO-AMW au cours de cultures discontinues effectuées dans le milieu de référence ou avec ajout d'hydrolysats sont présentées Figure 44. La concentration maximale d'IgG est obtenue aux environs de 90 h, soit en fin de phase de croissance et peu après l'apparition de la lyse cellulaire. A 1 g/L, la peptone P.B n'augmente pas la quantité d'IgG produite avec une concentration maximale d'IgG de 80 mg/L identique à celle obtenue dans le milieu de référence, alors que l'EXL et la peptone P.A permettent d'obtenir respectivement des concentrations maximales d'IgG de 90 mg/L et 105 mg/L. De plus, l'ajout de L'EXL ou

de P.B et P.A à 4 g/L, augmente de façon significative la concentration maximale d'IgG aux valeurs respectives de 115, 120 et 140 mg/L.

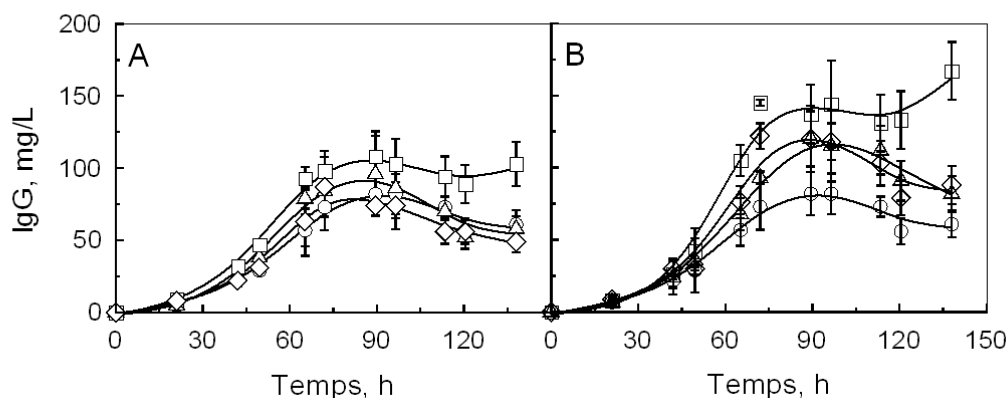


Figure 44. Evolution de la concentration d'IgG1 anti-RhD au cours de cultures discontinues de cellules CHO-AMW cultivées dans le milieu de référence (O), avec l'ajout de l'EXL (△), la peptone P.A (□) ou la peptone P.B (◇), aux concentrations de (A) 1 g/L et (B) 4 g/L.

Les corrélations entre les concentrations d'IgG produit et de cellules viables, observées avant 90 h, lors des différentes cultures sont présentées Figure 45. Le rendement de production d'IgG ($Y_{IgG/cellule}$) exprimé en pg/cellule est constant au cours des cinétiques (coefficient de corrélation supérieur à 0,9), mais varie selon les conditions de milieux (Tableau 19). La production d'IgG est donc couplée à la phase de croissance pour toutes les conditions opératoires. Le rendement de production obtenu dans le milieu de référence est de 36 pg/cellule. Lorsque les hydrolysats sont ajoutés à 1 g/L, le rendement en présence de P.A (33 pg/cellule) est proche du milieu de référence, alors qu'il est plus faible en présence de P.B et d'EXL (21 pg/cellule). A 4 g/L, la peptone P.A augmente le rendement (44 pg/cellule), alors que la peptone P.B et l'EXL le diminuent (34 et 28 pg/cellule respectivement) mais dans des proportions plus faibles que l'ajout de 1 g/L.

De nombreux travaux ont montré que l'inhibition de la croissance par la diminution de la température et du pH (Trummer et *al.*, 2006 ; Yoon et *al.*, 2006 ; Kim et *al.*, 2006), l'augmentation de l'osmolarité (Kimura & Miller, 2000 ; Zhu et *al.*, 2005), ou la présence d'agents chimiques (Sunley & Butler, 2011), pouvait favoriser la production de protéines recombinantes. En effet, en favorisant la transition de la phase G1 à G0, la division cellulaire est stoppée, ce qui augmente la productivité des cellules (Sunley & Butler, 2010). Par contre, dans notre étude, l'accroissement de la production d'anticorps en présence de la peptone P.A ne résulte pas d'un effet inhibiteur de la croissance cellulaire.

De plus, l'ajout de 4 g/L d'hydrolysats dans le milieu de culture augmente l'osmolarité seulement d'environ 20 mOsm/kg, ce qui confirme la faible influence des hydrolysats sur l'osmolarité du milieu de culture (Kim & Lee, 2009 ; Michiels *et al.*, 2011). Ainsi, plus probablement, l'augmentation de la production d'anticorps résulte de la présence dans cette peptone de molécules spécifiques stimulant la productivité des cellules CHO-AMW. Différents travaux ont aussi montré que les hydrolysats stimulent la production spécifique de protéines recombinantes sans inhiber la croissance cellulaire (Burteau *et al.*, 2003 ; Sung *et al.*, 2004 ; Kim & Lee, 2009 ; Michiels *et al.*, 2012).

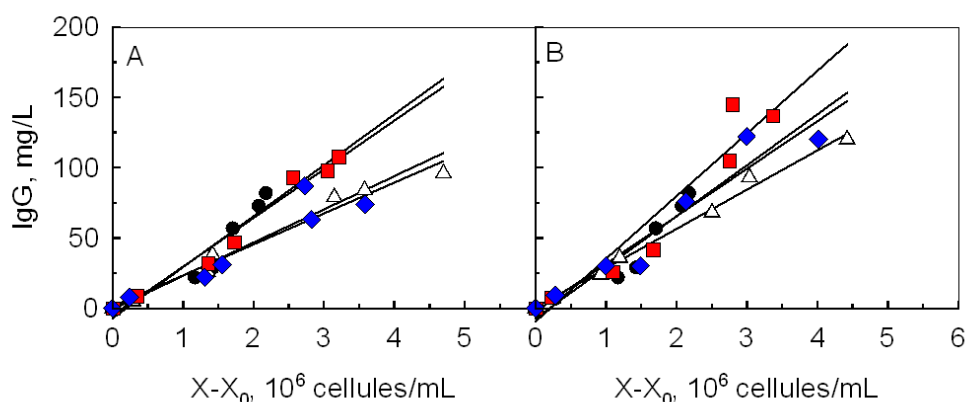


Figure 45. Corrélations entre les concentrations de cellules viables et la concentration d'IgG1 anti-RhD au cours de cultures discontinues de cellules CHO-AMW cultivées (●) ou avec ajout d'EXL (△), la peptone P.A (■) ou la peptone P.B (◆), aux concentrations de (A) 1 g/L et (B) 4 g/L.

D'autre part, pendant la phase stationnaire de croissance et l'apparition de la lyse cellulaire, la concentration d'IgG produits diminue de l'ordre de 20 à 30 mg/L pour la culture de référence sans ajout ou avec ajout d'EXL ou de peptone P.A. Cette action pourrait provenir de l'action des protéases intracellulaires relarguées lors de la lyse cellulaire (Hansen *et al.*, 1997). Néanmoins, l'ajout de la peptone P.A ne montre pas cette diminution et induit même une augmentation peu significative de la concentration d'IgG en fin de culture. Or, l'ajout de certains polypeptides peut inhiber l'activité des protéases et prévenir la dégradation des protéines recombinantes (Hansen *et al.*, 1997). Cependant, l'ajout d'EXL (Sung *et al.*, 2004) ou d'une peptone de soja (Michiels *et al.*, 2011) n'a montré aucun effet protecteur contre cette dégradation. Dans notre étude, seule la peptone la plus riche en polypeptides permet de prévenir de la dégradation de l'IgG. Ainsi, il est vraisemblable que certains polypeptides présents dans la peptone P.A, confèrent un effet protecteur contre l'action éventuelle de protéases sur l'anticorps produit.

Tableau 19. Vitesse spécifique de croissance (μ) et rendement de production d'IgG ($Y_{\text{IgG/cellules}}$), au cours de culture discontinues de cellules CHO-AMW cultivées dans le milieu de référence ou avec ajout d'EXL et des peptones P.A et P.B aux concentrations de 1 g/L et 4 g/L.

Paramètres	Phase de culture	Contrôle	Extrait de levure		Peptone P.A		Peptone P.B	
			1 g/L	4 g/L	1 g/L	4 g/L	1 g/L	4 g/L
μ (h^{-1})	0 - 48 h	0,040	0,040	0,035	0,040	0,040	0,040	0,040
	48 - 72 h	0,013	0,040	0,035	0,040	0,040	0,040	0,040
	72 - 96 h	0,00	0,010	0,015	0,00	0,020	0,010	0,020
$Y_{\text{IgG/cellules}}$ (pg/cellules)	0 - 96 h	36	21	28	33	44	21	34

2.4- Consommation du glucose et production du lactate

Les cinétiques de consommation du glucose et de production du lactate sont présentées dans la Figure 46. La concentration de glucose décroît parallèlement à la croissance cellulaire pour devenir nulle en fin de phase stationnaire. Les profils de concentration de glucose et de production du lactate sont similaires quels que soit le milieu de culture durant les 50 premières heures de culture. Le lactate produit est réutilisé à partir d'environ 65 h de culture et l'ajout d'hydrolysats semble favoriser sa consommation. Ceci rejoint des précédentes études montrant que l'ajout d'hydrolysat dans des cultures de cellules CHO favorisait la consommation du lactate en fin de phase de croissance (Burteau et *al.*, 2003 ; Babcock et *al.*, 2011). Enfin, nos résultats montrent une quantité maximale de lactate produite plus faible, d'environ 1 mM, en présence d'hydrolysats malgré une concentration cellulaire plus élevée.

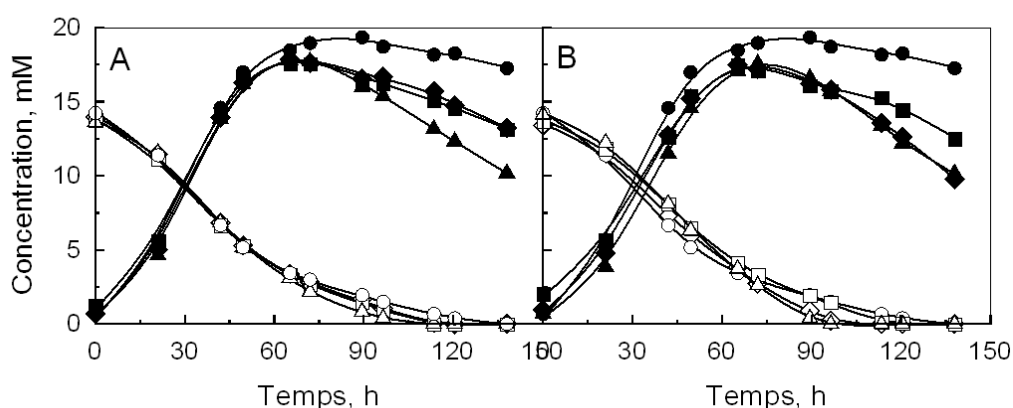


Figure 46. Evolution des concentrations de glucose (symboles ouverts), de lactate (symboles fermés), au cours de cultures discontinues de cellules CHO-AMW dans le milieu de référence (○), avec ajout de l'EXL (△), la peptone P.A (□) ou la peptone P.B (◇), aux concentrations de (A) 1 g/L et (B) 4 g/L.

Les vitesses spécifiques de consommation de glucose (q_{Glc}) et de production de lactate (q_{Lac}) sont présentées Figure 47. Les vitesses spécifiques de consommation du glucose sont maximales en début de phase de croissance ($\approx 0,30 \mu\text{mol/h}/10^6$ cellules) et diminuent rapidement pour être très faibles ($\approx 0,10 \mu\text{mol/h}/10^6$ cellules) à partir de 50 heures et jusqu'à la fin de la phase stationnaire (environ 115 h). Les vitesses spécifiques de production du lactate (q_{Lac} maximales $\approx 0,60 \mu\text{mol/h}/10^6$ cellules) suivent les mêmes profils au cours de la phase de croissance. Les vitesses spécifiques de consommation de glucose et de production de lactate sont plus élevées que celles rapportées dans la littérature qui varient respectivement entre 0,15 et 0,25 $\mu\text{mol/h}/10^6$ cellules et entre 0,20 et 0,40 $\mu\text{mol/h}/10^6$ cellules selon les lignées CHO (Farges-Haddani et *al.*, 2006 ; Clincke et *al.*, 2011 ; Sung et *al.*, 2004 ; Lao & Toth, 1997). Durant toute cette phase, le métabolisme du glucose ne semble pas influencé par la présence des hydrolysats. Après 60 h de culture, le lactate est consommé à des vitesses faibles entre 0,01 et 0,04 $\mu\text{mol/h}/10^6$ cellules (Figure 48). L'ajout d'1 g/L d'hydrolysat augmente légèrement la vitesse spécifique de consommation du lactate, alors que l'ajout de 4 g/L a un effet plus significatif suggérant un effet des hydrolysats sur la consommation de lactate selon leur concentration d'ajout.

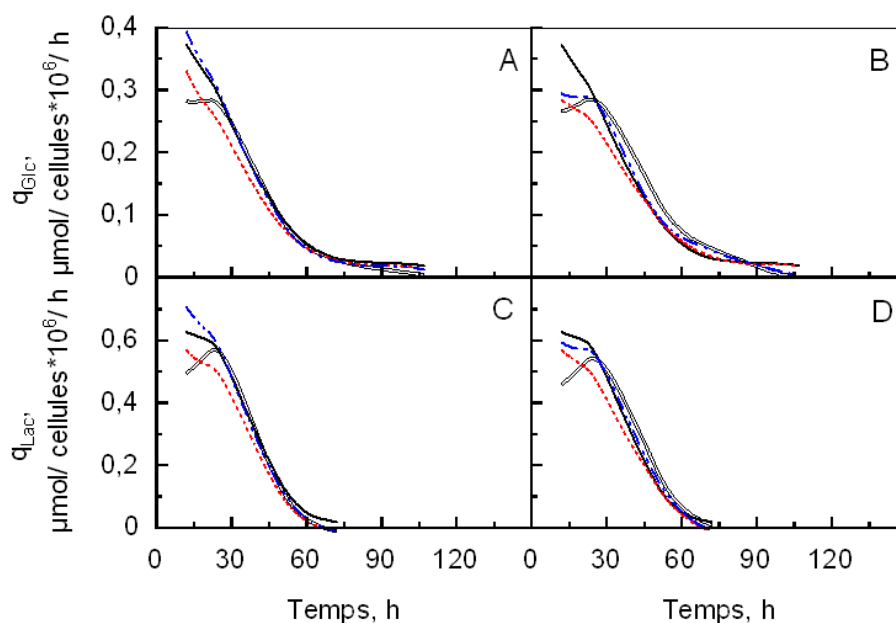


Figure 47. Vitesses spécifiques de consommation (A et B) du glucose et de production (C et D) de lactate, au cours de cultures discontinues de cellules CHO dans le milieu de référence (—) ou avec ajout d'extrait de levure (—), peptone P.A (.....) ou peptone P.B (— · —) à la concentration de 1 g/L (A, C) et 4 g/L (B, D).

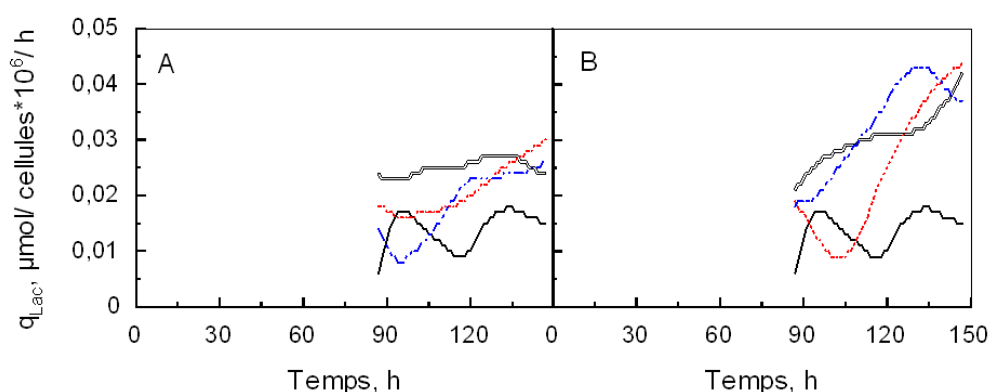


Figure 48. Vitesses spécifiques de consommation du lactate, au cours de cultures discontinues de cellules CHO cultivées dans le milieu de référence (—) ou avec ajout d'EXL (—), de peptone P.A (.....) ou de peptone P.B (— · —) aux concentrations de 1 g/L (A) et 4 g/L (B).

Le rendement global de lactate produit par glucose consommé ($Y_{Lac/Glc}$) présenté dans le Tableau 20 a été calculé à partir des corrélations de la Figure 49. Le rendement $Y_{Lac/Glc}$ permet d'évaluer la quantité de glucose intégrée dans le cycle oxydatif et celle convertie en lactate. Pendant les 50 premières heures, pour toutes les conditions de culture $Y_{Lac/Glc}$ est de 1,8 mol/mol, ce qui correspond à 90 % du glucose converti en lactate, et est caractéristique d'un métabolisme énergétique peu efficace. Ce rendement est plus élevé que ceux rapportés dans la littérature (entre 1,2 à 1,6 mol/mol selon les lignées CHO) (Lao & Toth, 1997 ; Farges-Haddani et al., 2006 ; Sung et al., 2004). En effet, l'assimilation rapide du glucose génère une activité glycolytique élevée qui se traduit par une production d'énergie réalisée principalement via la glycolyse et la production de lactate. Après 50 h, $Y_{Lac/Glc}$ s'annule indiquant que la quasi totalité du glucose est intégrée au cycle TCA, avant de devenir négatif lors de la consommation du lactate.

Différentes études ont montré qu'en ralentissant la consommation du glucose, il était possible de diminuer $Y_{Lac/Glc}$. Les principaux paramètres pour ralentir la consommation des glucides sont la nature et la concentration en glucides (Altamirano et al., 2006 ; Wilkens et al., 2011) ainsi que le pH du milieu de culture (Yoon et al., 2005). Dans notre étude, lors de la transition du métabolisme, la concentration du glucose restant dans les milieux est supérieure à 5 mM. Elle n'est donc pas limitante pour les cellules. Par contre, les cultures réalisées en fioles d'Erlenmeyer n'ont pas été contrôlées en pH. Bien que ce paramètre n'ait pas été suivi, le rouge de phénol contenu dans le milieu de culture a effectivement indiqué des variations de pH au cours de la culture. Il est donc fort probable

que la baisse du pH lors de l'accumulation d'environ 20 mM de lactate soit à l'origine du changement de métabolisme cellulaire quelle que soit la condition de culture.

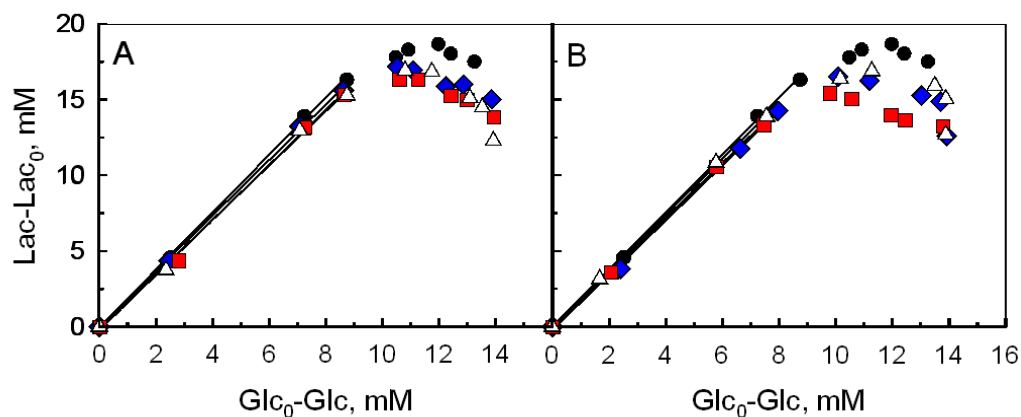


Figure 49. Corrélations entre le lactate produit et le glucose consommé, au cours de cultures discontinues de cellules CHO cultivées dans le milieu de référence (●) ou avec ajout d'EXL (△), la peptone P.A (■) ou la peptone P.B (◆), aux concentrations de (A) 1 g/L et (B) 4 g/L.

La corrélation entre la quantité de cellules produites et la consommation en glucose a été tracée pour déterminer le rendement $Y_{\text{cellules/Glc}}$ exprimé en cellules/pmol (Figure 50 et Tableau 20). Durant les 50 premières heures de culture, $Y_{\text{cellules/Glc}}$ est similaire quelles que soient les conditions de culture (entre 0,16 et 0,20 cellules/pmol) (Figure 50-A et Figure 50-B). Après 50 heures, $Y_{\text{cellules/Glc}}$ reste quasiment constant dans le milieu de référence (0,24 cellules/pmol), mais augmente significativement en présence d'hydrolysats (de 0,31 à 0,60 cellules/pmol selon leur nature).

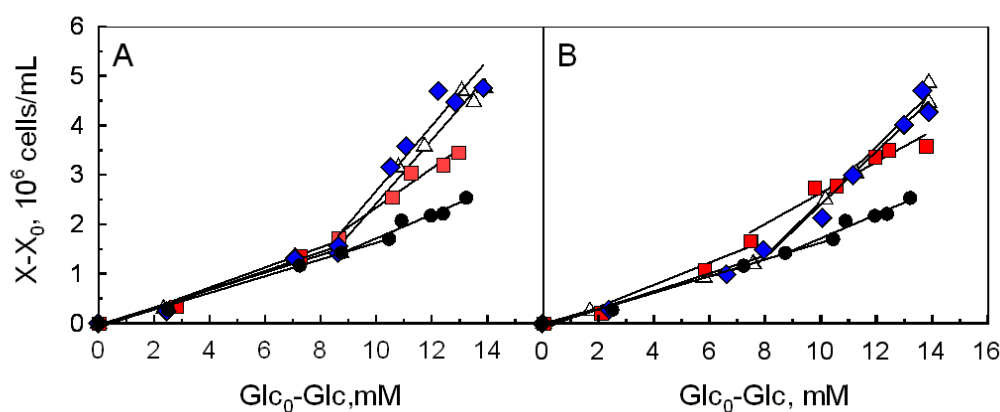


Figure 50. Corrélations entre les cellules viables (X) et le glucose consommé (Glc), au cours de culture discontinues de cellules CHO-AMW dans le milieu de référence (○), ou avec l'ajout de l'EXL (△), la peptone P.A (■) ou la peptone P.B (◆), aux concentrations de (A) 1 g/L et (B) 4 g/L.

Ainsi, la diminution du rendement $Y_{\text{Lac/Glc}}$, indicateur du changement du métabolisme énergétique, intervient en même temps qu'une meilleure utilisation du glucose pour la production de cellules. En revanche, dans la culture de référence, ce changement de métabolisme intervient à la fin de la phase exponentielle de croissance, malgré une utilisation efficace du glucose (Figure 50). Ce résultat est à comparer à une étude indiquant que le métabolisme de cellules CHO en phase stationnaire de croissance, dans un milieu chimiquement défini, était principalement oxydatif (Sengupta et *al.*, 2011). Pourtant, alors que la glycolyse était énergétiquement efficace (peu de pyruvate converti en lactate), la majorité du glucose était dirigée vers la voie des pentoses phosphate résultant en une faible production de cellules. Une hypothèse avancée par les auteurs, est la nécessité des cellules à produire du NADPH (via la voie des pentoses phosphates) pour se protéger des stress oxydatifs (Sengupta et *al.*, 2011). De manière intéressante, l'ajout d'hydrolysats permet justement le maintien de la phase exponentielle de croissance lors du changement de métabolisme observé. Ceci laisserait donc supposer la présence de composés antioxydants dans les hydrolysats.

De même, le lactate semble jouer un rôle de substrat à partir de 65 h jusqu'à la fin de la phase de croissance (Figure 46). De nombreuses études ont montré que le lactate ne serait pas un simple métabolite secondaire, mais pourrait être utilisé comme substrat du cycle TCA (Altamirano et *al.*, 2006 ; Ma et *al.*, 2009 ; Luo et *al.*, 2012 ; Gagnon et *al.*, 2011 ; Wilkens et *al.*, 2011). Une activité glycolytique trop faible n'assurant pas l'alimentation du cycle TCA en pyruvate est à l'origine de la reconversion du lactate en pyruvate (Ma et *al.*, 2009 ; Wilkens et *al.*, 2011). De manière générale, la consommation du lactate permet essentiellement de participer au maintien de la phase stationnaire comme nous l'observons dans la culture de référence (Altamirano et *al.*, 2006 ; Ma et *al.*, 2009 ; Wilkens et *al.*, 2011). En revanche, une étude a montré que certaines conditions de culture, comme l'ajout de cuivre, permettaient le maintien de la phase de croissance cellulaire en améliorant l'efficacité du métabolisme oxydatif (Luo et *al.*, 2012). Les hydrolysats pourraient donc améliorer la cinétique de croissance en améliorant la capacité du métabolisme oxydatif à fournir l'anabolisme en précurseurs métaboliques et en énergie.

Tableau 20. Principaux paramètres cinétiques caractéristiques du métabolisme énergétique cellulaire, ($Y_{\text{cellules/Glc}}$, LaC_{max} , $Y_{\text{Lac/Glc}}$) calculés au cours de cultures discontinues de cellules CHO-AMW dans le milieu de référence, ou avec ajout d'EXL, de peptones P.A ou P.B à 1 g/L et 4 g/L.

Paramètres	Phase de culture	Référence	Extrait de levure		Peptone P.A		Peptone P.B	
			1 g/L	4 g/L	1 g/L	4 g/L	1 g/L	4 g/L
$Y_{\text{cellules/Glc}}$ (cellule/pmol)	0 - 48 h	0,17	0,18	0,16	0,20	0,22	0,19	0,18
	48 - 96 h	0,24	0,64	0,53	0,39	0,31	0,50	0,53
LaC_{max} (mM)	72 h	19,3	17,8	17,8	17,9	17,6	17,9	17,5
$Y_{\text{Lac/Glc}}$ (mM/mM)	0 - 48 h	1,80	1,80	1,85	1,80	1,80	1,85	1,80

2.5- Consommation de glutamine et production d'ions ammonium

Les cinétiques de consommation de la glutamine et de production des ions ammonium sont présentées dans la Figure 51. La concentration de la glutamine décroît parallèlement à la croissance cellulaire pour s'annuler en fin de phase de croissance. Les profils de concentration de la glutamine sont similaires quel que soit le milieu de culture. Par contre, la production d'ions ammonium dans le milieu de référence est un peu plus faible qu'en présence d'hydrolysats ajoutés à 1 g/L (Figure 51-A) et plus significativement lorsqu'ils sont ajoutés à 4 g/L (Figure 51-B).

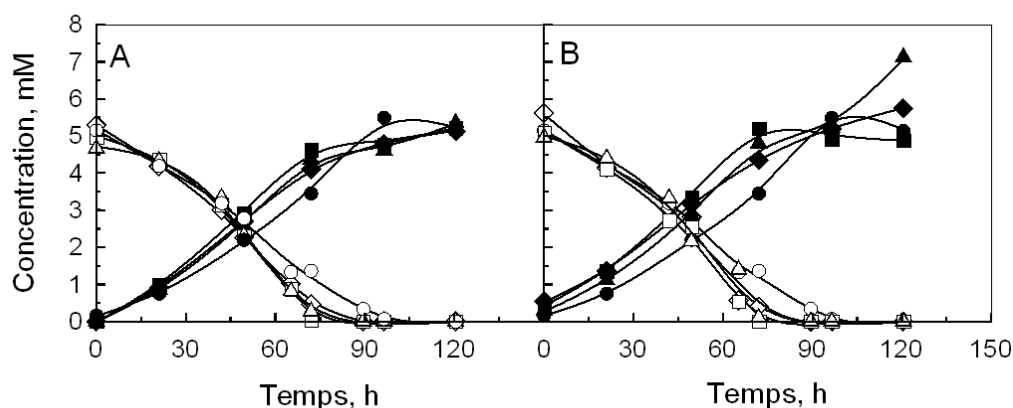


Figure 51. Evolution des concentrations de glutamine (symboles ouverts) et d'ions ammonium (symboles fermés), au cours de cultures discontinues de cellules CHO-AMW dans le milieu de référence (○), avec ajout de l'EXL (△), la peptone P.A (□) ou la peptone P.B (◇), aux concentrations de (A) 1 g/L et (B) 4 g/L.

L'ajout d'hydrolysats augmente globalement les vitesses spécifiques de consommation de glutamine et de production d'ions ammonium lors des 60 premières heures de culture (Figure 51). De plus, la multiplication par un facteur 4 de la quantité d'hydrolysat ajoutée augmente plus significativement ces vitesses spécifiques. Une étude a montré qu'une

surcharge nutritionnelle, en acides aminés et vitamines, d'un milieu chimiquement défini favorisait effectivement la consommation de glutamine et la production d'ions ammonium par les cellules NSO (Castillo et *al.*, 2011). La glutaminolyse alimente le cycle TCA au niveau de l' α KG compensant ainsi un apport limité du cycle au niveau de l'embranchement citrate qui est caractéristique des lignées continues (Altamirano et *al.*, 2000). Cependant, une glutaminolyse suractive peut aussi être à l'origine de l'engorgement du cycle TCA qui est alors régulé grâce à la transformation du malate en pyruvate (Altamirano et *al.*, 2006 ; Godia et *al.*, 2006). Ceci a pour conséquence la production de fortes concentrations en ions ammonium, lactate et alanine qui sont connus pour être inhibiteurs de la croissance cellulaire. Dans notre étude, seule la concentration d'ions ammonium est augmentée, alors que la concentration en lactate tend à diminuer lorsque les hydrolysats sont ajoutés. Ainsi, la stimulation de la glutaminolyse par les hydrolysats semble favorable à la croissance cellulaire.

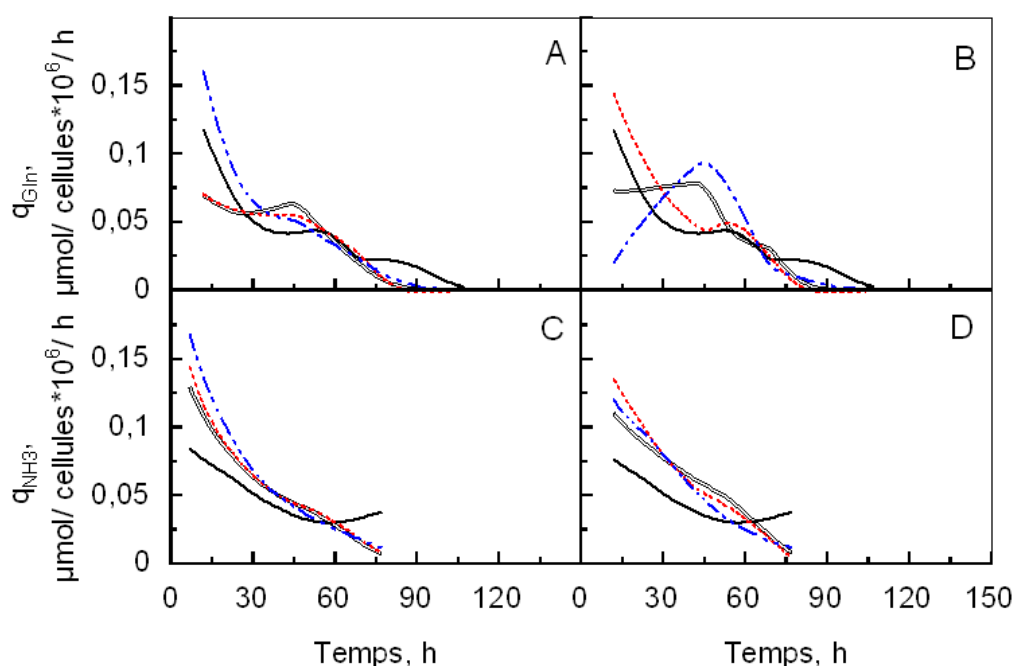


Figure 52. Vitesses spécifiques de consommation (A et B) de la glutamine et de production (C et D) d'ions ammonium, au cours de cultures discontinues de cellules CHO dans le milieu de référence (—) ou avec ajout d'extrait de levure (==), peptone P.A (.....) ou peptone P.B (-.-.-) à la concentration de 1 g/L (A, C) et 4 g/L (B, D).

Le rendement de la production d'ions ammonium par rapport à la consommation de glutamine a été calculé afin de déterminer le rendement global $Y_{NH_4/Gln}$ exprimé en mol/mol (Figure 53 et Tableau 21). Le rendement $Y_{NH_4/Gln}$ est constant au cours de la phase de croissance, avec un coefficient directeur de la corrélation entre 0,9 et 1,0

mol/mol et identique pour tous les milieux. Cependant, les hydrolysats apportent de la glutamine intégrée dans les peptides et dont le métabolisme génère aussi la formation d'ions ammonium. Ainsi, il est probable que la quantité d'ions ammonium produits par glutamine totale consommée soit plus faible en présence d'hydrolysats. De plus, la production d' α KG à partir d'une mole de glutamine via la glutamate déshydrogénase génère deux moles d'ions ammonium. Nos résultats suggèrent donc la production d' α KG via l'alanine amino transaminase ou l'aspartate amino transférase. Les dosages de l'alanine et de l'aspartate permettraient d'évaluer la part d'ions ammonium utilisée pour la production d'acides nucléiques.

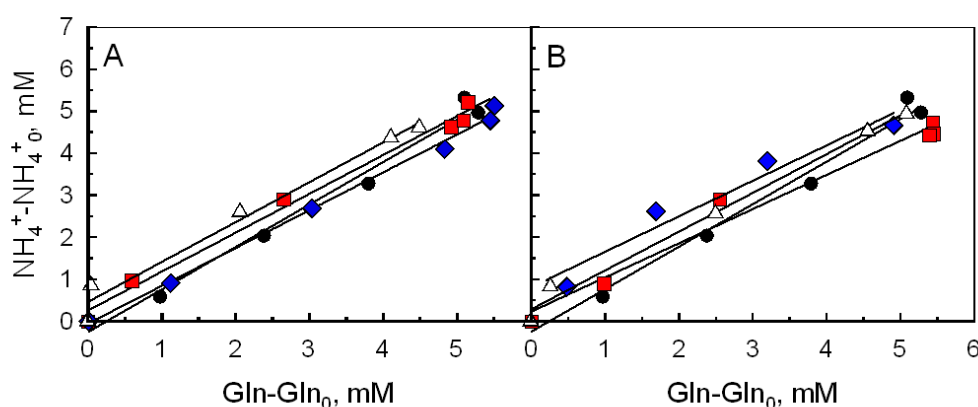


Figure 53. Corrélations entre les ions ammonium produits et le glutamine consommée, au cours de cultures discontinues de cellules CHO cultivées dans le milieu de référence (●) ou avec ajout d'EXL (△), la peptone P.A (■) ou la peptone P.B (◆), aux concentrations de (A) 1 g/L et (B) 4 g/L.

Le rendement $Y_{\text{cellules/Gln}}$ est constant pendant la phase de croissance au cours des cultures réalisées dans le milieu de référence ou les milieux supplémentés avec la peptone P.A à 1 ou 4 g/L (Figure 54). La peptone P.A améliore ce rendement de 0,45 à 0,65 cellules/pmol quelle que soit sa concentration par rapport à la culture de référence. La peptone P.B et l'EXL augmentent $Y_{\text{cellules/Gln}}$ jusqu'à des valeurs situées entre 0,60 et 0,80 cellules/pmol. De plus, lorsque la glutamine devient limitante dans les milieux de culture (autour de 1 mM), le rendement $Y_{\text{cellules/Gln}}$ augmente de manière significative (entre 1,9 et 3,6 cellules/pmol), suggérant l'utilisation d'une nouvelle source d'acides aminés apportée par les hydrolysats. En effet, une étude a montré la nécessité de prendre en compte l'apport des acides aminés contenus dans les peptides pour expliquer le métabolisme de cellules CHO supplémentées par un hydrolysat d'origine animale (Nyberg et al., 1999). Cependant, dans notre étude nous observons des effets différents selon le degré

d'hydrolyse des hydrolysats. Ainsi, la présence de peptides de plus petites tailles ou d'acides aminés contenus dans l'EXL et la peptone P.B pourrait expliquer le maintien d'une croissance cellulaire après la déplétion partielle de la glutamine libre. De plus, le rendement $Y_{NH_4/Gln}$ n'étant pas augmenté en fin de culture, l'utilisation de cette source azotée n'induit probablement pas de production significative d'ions ammonium. Les petits peptides ont déjà été décrits comme une source énergétique plus efficace que les acides aminés libres (Daniel et *al.*, 1992). De même, la substitution de la glutamine par des dipeptides, tels que l'alanine-glutamine et la glycine-glutamine, est efficace pour la croissance cellulaire et permet la réduction de la production d'ions ammonium (Christie & Butler, 1994 ; Petiot et *al.*, 2010).

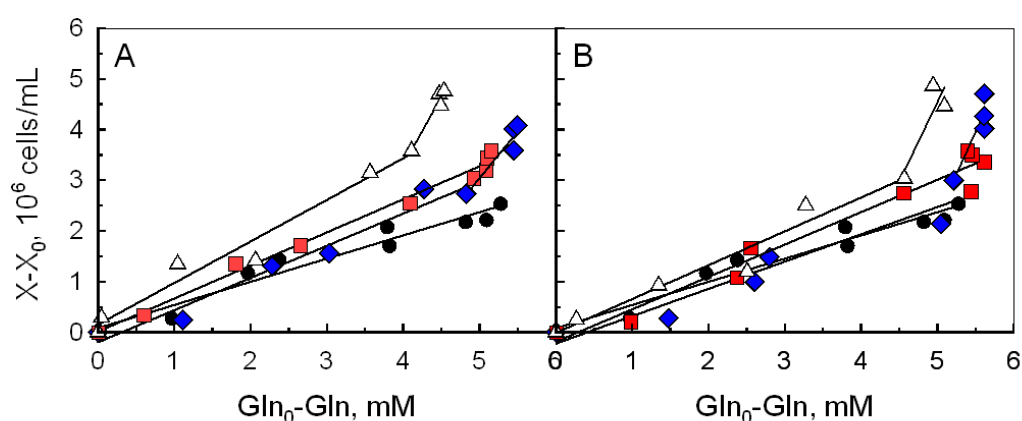


Figure 54. Corrélations entre les cellules viables (X) et la glutamine consommée (Gln), au cours de culture discontinues de cellules CHO-AMW dans le milieu de référence (○), ou avec l'ajout de l'EXL (△), la peptone P.A (■) ou la peptone P.B (◆), aux concentrations de (A) 1 g/L et (B) 4 g/L.

Tableau 21. Principaux paramètres cinétiques caractéristiques du métabolisme énergétique cellulaire, ($Y_{cellules/Gln}$, NH_{4max} , $Y_{NH_4/Gln}$), calculés au cours de cultures discontinues de cellules CHO-AMW dans le milieu de référence, ou avec ajout d'EXL, de peptones P.A ou P.B aux concentration de 1 g/L et 4 g/L.

Paramètres	Phase de culture	Référence	EXL		Peptone P.A		Peptone P.B	
			1 g/L	4 g/L	1 g/L	4 g/L	1 g/L	4 g/L
$Y_{cellules/Gln}$ (cellules/pmol)	0 - 72 h	0,45	0,81	0,67	0,65	0,64	0,63	0,45
	72 - 96 h	0,45	2,89	3,12	0,65	0,64	1,84	3,69
NH_4^+ max (mM)	96 h	5,3	4,8	5,1	4,7	5,1	4,7	5,3
$Y_{NH_4/Gln}$ (mM/mM)	0-96 h	1,00	0,95	0,90	0,90	0,80	0,90	0,85

2.6- Conclusion

Dans un premier temps, notre étude a permis de caractériser l'influence des hydrolysats et de leur concentration d'ajout sur des indicateurs du procédé, tels que $X_{\max}$, $\mu_{\max}$, $IgG_{\max}$ et $Y_{IgG/cellule}$, au cours de cultures discontinues de cellules CHO-AMW productrices d'IgG1 anti-RhD, cultivées en fiole d'Erlenmeyer. Les principaux effets sont résumés dans la Figure 55. Nos résultats soulignent l'influence des procédés de fabrication des hydrolysats sur leur activité en culture cellulaire. En effet, l'EXL, avec le degré d'hydrolyse le plus élevé, présente l'effet le plus favorable sur la croissance cellulaire, alors que la peptone P.A, possédant le degré d'hydrolyse le plus bas, favorise l'augmentation de la concentration d'IgG. D'autre part, nous avons montré que, bien que l'ajout de 1 g/L d'hydrolysats soit suffisant pour améliorer la croissance cellulaire, une concentration de 4 g/L est nécessaire pour stimuler la production d'IgG.

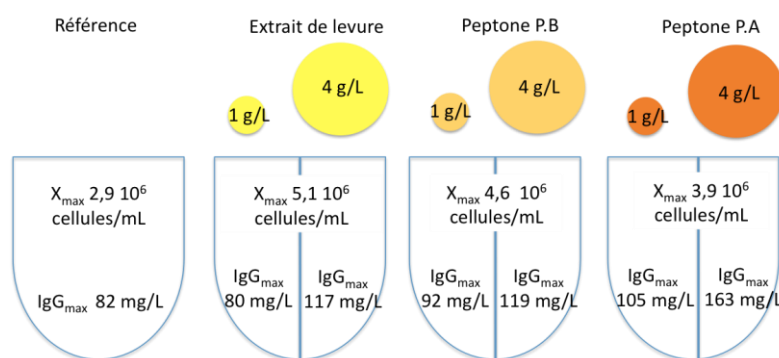


Figure 55. Synthèse des résultats sur l'influence de la nature et de la concentration d'ajout d'hydrolysats de levure sur la concentration maximale de cellules viables ($X_{\max}$) et d'IgG1 anti-RhD ($IgG_{\max}$), aux cours de cultures discontinues de cellules CHO-AMW.

Les effets sur les cinétiques de consommation des principaux substrats (limitation, q_{Glc} , q_{Gln}) et de la production des principaux métabolites secondaires ($Lac_{\max}$, $NH_4^+_{\max}$, q_{Lac} , q_{NH_4}) ont été étudiés et les principaux rendements métaboliques ont été calculés ($Y_{Lac/Glc}$, $Y_{NH_4/Gln}$, $Y_{cellule/Glc}$, $Y_{cellule/Gln}$). Quelles que soient les conditions de culture, le métabolisme énergétique évolue vers un mode plus oxydatif à partir de 50 h de culture. Cependant, alors que ce changement de métabolisme induit le début de la phase stationnaire des cellules cultivées dans le milieu de référence, l'ajout d'hydrolysats permet de maintenir la phase exponentielle de croissance. Les hydrolysats favorisent donc le métabolisme énergétique lorsqu'il est essentiellement oxydatif, suggérant une action au niveau du cycle TCA. De plus, l'EXL et la peptone P.B, contiennent de la matière azotée permettant de remplacer partiellement la glutamine et de réduire la quantité d'ions ammonium produits.

Ainsi, les hydrolysats de levure ajoutés au milieu de culture de référence présentent des effets spécifiques sur les cellules CHO selon leur nature et leur concentration concernant la croissance, la production et le métabolisme énergétique. Cependant, la présence d'hydrolysats ne permet pas de retarder la mort cellulaire qui reste corrélée à la déplétion en glutamine et glucose. Afin d'améliorer les résultats, une stratégie de mélange des hydrolysats et d'ajout de glucose ou glutamine en cours de culture est évaluée dans la partie suivante.

3- Influence de l'ajout de glucose, de glutamine ou de mélanges d'hydrolysats en cours de culture en fiole d'Erlenmeyer

3.1- Influence de l'ajout de glucose et glutamine sur la croissance cellulaire

Dans la partie précédente, l'EXL, ajouté à 1 g/L, a permis de favoriser la prolifération cellulaire. De plus, l'arrêt de la croissance et la mort cellulaire sont apparus concomitants à la déplétion en glutamine et en glucose. C'est pourquoi, l'ajout de glutamine et/ou de glucose au cours de la phase exponentielle de croissance a été envisagé pour lever ces limitations. Le glucose et la glutamine ont été ajoutés à respectivement 15 mM et 4 mM, séparément ou simultanément, après 48 heures de culture dans le milieu de référence supplémenté par 1 g/L d'EXL. Les suivis cinétiques des cellules viables et mortes sont présentés dans la Figure 56.

Les résultats ne montrent aucun effet positif des ajouts de glucose ou glutamine au cours de la phase de croissance (48 h), dans le milieu de référence additionné de 1 g/L d'EXL, ni sur la concentration maximale de cellules par rapport à la culture en présence d'EXL seul (Tableau 22). Au contraire, l'ajout de glutamine, avec ou sans glucose, induit la diminution des concentrations maximales de cellules viables à environ $4,0 \cdot 10^6$ cellules/mL. Une concentration inhibitrice d'ions ammonium est vraisemblablement responsable de cette inhibition. En effet, les suivis cinétiques de métabolites secondaires présentés dans la partie précédente (Figure 51) ont mis en évidence une concentration de 5 mM d'ions ammonium en fin de phase de croissance. De plus, le rendement de production d'ions ammonium par mole consommée de glutamine a été évalué aux alentours de 0,9 mol/mol. Ainsi, l'ajout supplémentaire de glutamine, au cours de la culture, peut conduire à une concentration d'ions ammonium supérieure à 8 mM, concentration décrite comme inhibitrice pour la croissance cellulaire de cellules CHO (Hansen & Emborg, 1994).

Tableau 22. Concentration maximale de cellules viables ($X_{\max}$), et intégrale des cellules viables (ICV) exprimé pour 10^8 cellules h au cours de culture de cellules CHO AMW dans le milieu de référence, avec ajout d'EXL à 1 g/L, ou avec ajout d'EXL à 1 g/L complétement par 15 mM de glucose (Glc) et/ou 4 mM de glutamine (Gln) à partir de 48 heures de culture.

			Référence	Extrait de levure, 1 g/L		
				/	Glc, 15 mM	Gln, 4 mM
X _{max}	10 ⁶ cellules/mL	3,3	5,1	4,8	3,9	4,2
ICV	10 ⁸ cellules/mLxh	3,9	4,7	5,5	4,1	4,5

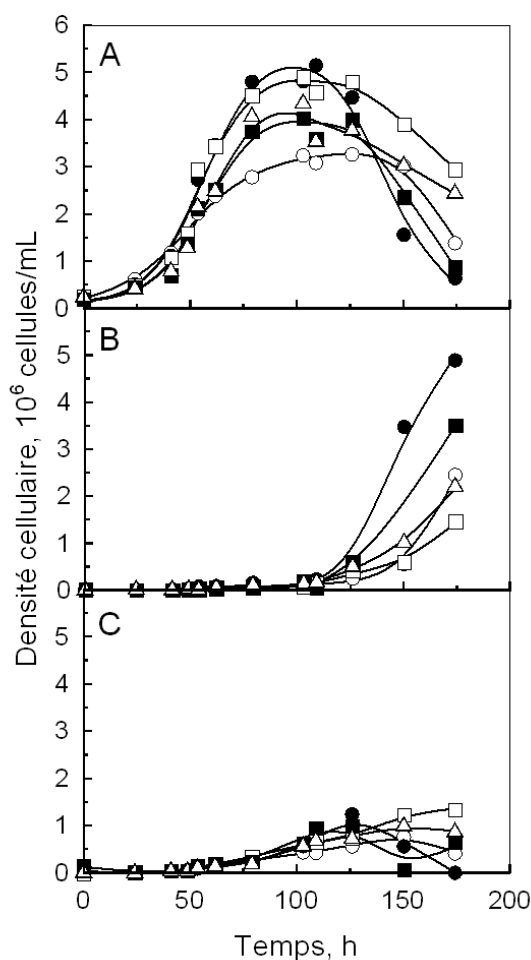


Figure 56. Evolution des concentrations de cellules (A) viables, (B) mortes et (C) lysées au cours de culture de cellules CHO-AMW en fiole d'Erlenmeyer dans le milieu de référence (○), avec ajout de 1 g/L d'EXL initialement (●) et complétement, après 48 h, par des quantités de glucose (□), glutamine (■), ou glucose et glutamine (△) équivalentes à des concentrations finales de 15 mM en glucose et 4 mM en glutamine.

L'ajout de glucose après 48 h diminue légèrement la concentration maximale de cellules viables ($4,8 \cdot 10^6$ cellules/mL) par rapport à l'EXL seul. Cependant, il permet d'améliorer l'intégrale des cellules viables de $4,7$ à $5,5 \cdot 10^8$ cellules.h/mL par rapport à l'EXL seul. De même, l'ajout de glucose combiné à la glutamine améliore faiblement l'intégrale des

cellules viables par rapport à l'ajout de la glutamine seule, de $4,1$ à $4,5 \cdot 10^8$ cellules.h/mL. L'apparition des cellules mortes non lysées est plus tardive dans les conditions avec ajout de glucose. Ainsi, l'ajout du glucose permet d'allonger la phase stationnaire de croissance et de retarder la mort cellulaire. Ces résultats confirment le fait que la déplétion en glucose implique la fin de la phase de croissance. Cependant, l'accumulation des métabolites secondaires ne permet pas d'améliorer la concentration cellulaire maximale en dépit du retard de la mort cellulaire. Finalement, compte tenu de l'effet peu significatif de l'ajout de substrats en cours de culture sur les cinétiques de croissance cellulaire, les effets sur la production d'IgG n'ont pas été analysés.

3.2- Influence de mélanges d'hydrolysats sur la croissance cellulaire et la production d'IgG1 anti-RhD

Dans la partie précédente, l'ajout d'EXL à 1 g/L et de la peptone P.A à 4 g/L a permis d'obtenir les meilleures performances en ce qui concerne, respectivement, la concentration cellulaire et la concentration d'IgG. Plusieurs autres travaux ont aussi mis en évidence des effets variés de différents hydrolysats sur les performances de culture (Burteau et *al.*, 2003 ; Sung et *al.*, 2004). Un mélange d'hydrolysats pourrait donc combiner ces effets pour obtenir de meilleures performances. D'ailleurs, les fabricants de milieux de culture proposent déjà des mélanges d'hydrolysats prêts à l'emploi (Kim et *al.*, 2006). Cependant, une seule étude de la littérature rapporte un plan de mélange pour démontrer l'intérêt de combiner un EXL avec des peptones de soja et de blé (Kim & Lee, 2009). C'est pourquoi, dans cette partie, nous nous sommes intéressés aux mélanges des hydrolysats de levure pour évaluer leur potentiel effet synergique. Le mélange de l'EXL avec la peptone P.A ou P.B a été étudié. L'EXL à 1 g/L a été ajouté initialement. Les peptones ont été ajoutées, soit initialement, soit après 40 heures de culture. Les cinétiques de croissance cellulaire et de production d'IgG1 anti-RhD sont présentées Figure 57 et Figure 58.

Le mélange de l'EXL et des peptones, quel que soit le moment d'addition, aboutit à une concentration maximale de cellules viables plus faible que l'EXL seul. Les peptones semblent donc inhiber l'effet positif de l'EXL, et ceci même lors d'un ajout en cours de phase de croissance. Cependant, le mélange de l'EXL et de P.A augmente la quantité maximale de cellules viables à $4,5 \cdot 10^6$ cellules/mL par rapport à la peptone P.A seule ($3,9 \cdot 10^6$ cellules/mL) (Figure 57 et Tableau 23). En revanche, le mélange de l'EXL et de P.B n'améliore pas la quantité maximale de cellules viables par rapport à P.B seul ($4,5 \cdot 10^6$

cellules/mL contre $4,2 \cdot 10^6$ cellules/mL respectivement) quel que soit le moment d'ajout de la peptone P.B.

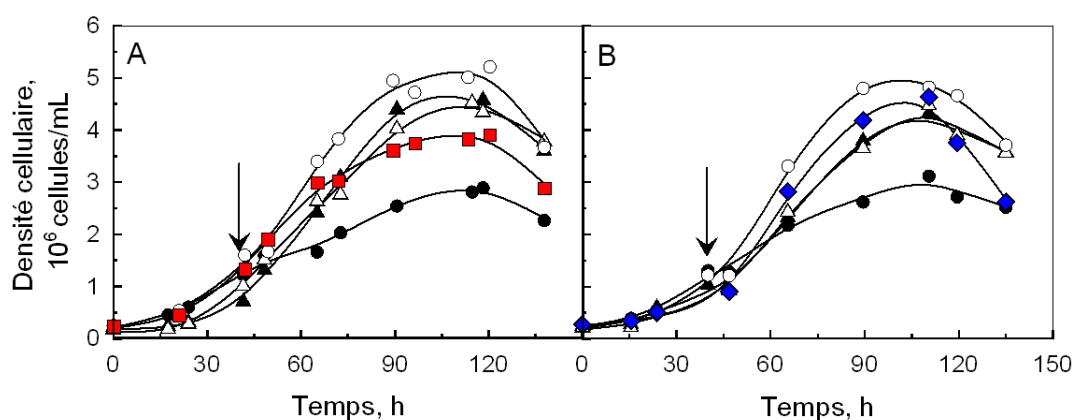


Figure 57. Evolution des concentrations de cellules CHO-AMW cultivées dans le milieu de référence (●), avec ajout de 1 g/L d'EXL (○), dans le milieu de référence complémenté initialement par : (A) 4 g/L peptone P.A (■), 1 g/L d'EXL + 4 g/L de peptone P.A (▲) et 1 g/L d'EXL + 4 g/L de peptone P.A complémenté après 40 h (△). (B) : 4 g/L peptone P.B (◆), 1 g/L d'EXL + 4 g/L de peptone P.B (▲) et 1 g/L d'EXL + 4 g/L de peptone P.B complémenté après 40 h (△).

Ce mélange d'EXL et de P.A, ajouté en début de culture, augmente la concentration maximale d'IgG à 240 mg/L, par rapport à celle de 160 mg/L obtenue avec la peptone P.A seule (Figure 58 et Tableau 23). En revanche, l'ajout de P.A après 40 h, dans le milieu contenant l'EXL, ne permet pas d'atteindre une valeur aussi élevée. Ce résultat démontre la spécificité de la peptone P.A à stimuler la production d'anticorps dès le début de la croissance. Par contre, le mélange d'EXL et de la peptone P.B ne permet aucune amélioration de la production d'IgG.

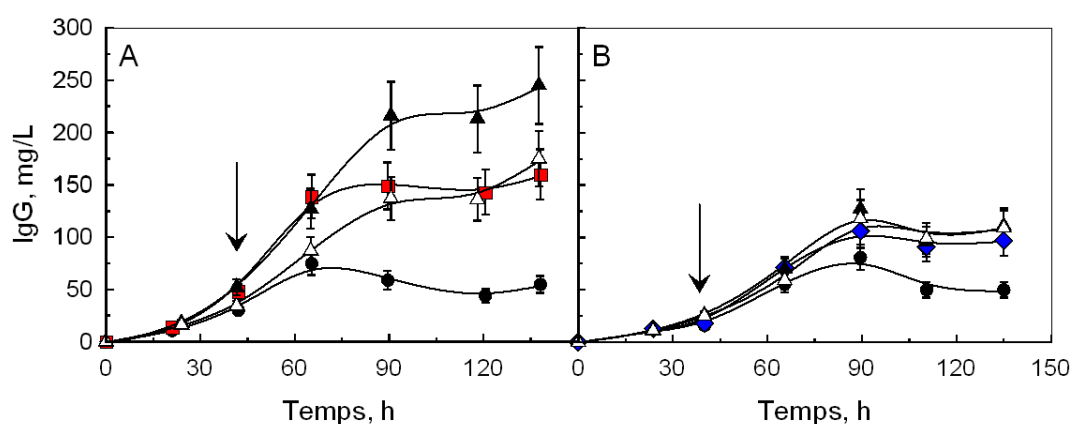


Figure 58. Cinétiques de production d'IgG1 anti-RhD réalisées au cours de cultures de cellules CHO-AMW cultivées dans le milieu de référence (●), dans le milieu de référence complétement initialement par : (A) 4 g/L peptone P.A (■), 1 g/L d'EXL + 4 g/L de peptone P.A (▲) et 1 g/L d'EXL + 4 g/L de peptone P.A complétement après 40 h (△). (B) : 4 g/L peptone P.B (◆), 1 g/L d'EXL + 4 g/L de peptone P.B (▲) et 1 g/L d'EXL + 4 g/L de peptone P.B complétement après 40 h (△).

La corrélation entre la concentration d'IgG et la quantité de cellules viables est linéaire lors de la phase de croissance (Figure 59). La sensibilité des mesures ne permet pas de déterminer de manière fiable les rendements de production au début de la phase de croissance. L'ajout du mélange de l'EXL et P.A améliore le rendement de production de 45 à 50 pmol/cellule par rapport à la peptone P.A ajoutée seule (Tableau 23). Par contre, l'ajout tardif de peptone P.A induit la diminution de ce rendement à 35 pmol/cellule. La peptone P.B ne modifie pas le rendement observé dans le milieu de référence avec respectivement 28 et 30 pmol/cellule. Le mélange de l'EXL et P.B n'a pas d'effet significatif sur ce rendement.

Tableau 23. Concentration maximale de cellules viables ($X_{\max}$) et d'IgG1 anti-RhD ($IgG_{\max}$), et rendement d'anticorps par cellules ($Y_{IgG/cellule}$), au cours de culture de cellules CHO-AMW dans le milieu de référence, avec ajout de 4 g/L de peptone P.A ou P.B, ou avec ajout de 1 g/L d'extrait de levure et de 4 g/L de peptones P.A ou P.B, ajoutées en début ou après 40 heures de culture.

	Contrôle	P.A	EXL +		P.B	EXL +	
			P.At ₀	P.A t ₄₀		P.Bt ₀	P.Bt ₄₀
$X_{\max}$ (cellules 10 ⁶ /mL)	2,9	3,9	4,6	4,5	4,5	4,3	4,2
$IgG_{\max}$ (mg/L)	71	160	241	175	100	118	110
$Y_{IgG/cellules}$ (pg/cellule)	30	45	50	35	28	36	32

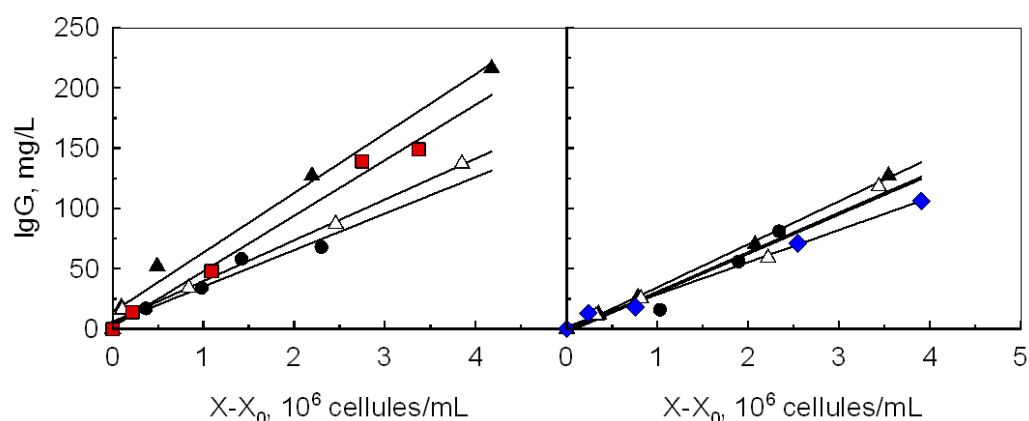


Figure 59. Relations entre la production d'IgG anti-RhD1 et la quantité de cellules viables établis au cours de culture de cellules CHO-AMW dans le milieu de référence (●), dans le milieu de référence complémenté initialement par : (A) 4 g/L peptone P.A (■), 1 g/L d'EXL + 4 g/L de peptone P.A (▲) et 1 g/L d'EXL + 4 g/L de peptone P.A complémenté après 40 h (△). (B) 4 g/L peptone P.B (◆), 1 g/L d'EXL + 4 g/L de peptone P.B (▲) et 1 g/L d'EXL + 4 g/L de peptone P.B ajouté à après 40 heures de culture (△).

3.3- Conclusion

Dans cette partie, deux stratégies ont été évaluées pour améliorer la croissance cellulaire et la production d'anticorps recombinant. La première stratégie consistait à lever les limitations en glucose et glutamine observées précédemment. Cependant, les résultats montrent que l'ajout de ces seuls deux composés ne suffit pas. Dans un second temps, nous avons évalué l'effet de mélanges d'hydrolysats. Les résultats ont démontré un effet synergique entre l'EXL et la peptone P.A, induisant une amélioration significative de la quantité d'anticorps produite (+ 90 %) par rapport à la peptone seule. Cette stratégie permet donc un gain de 190 % par rapport au milieu de référence pour la production de l'IgG (Figure 60).

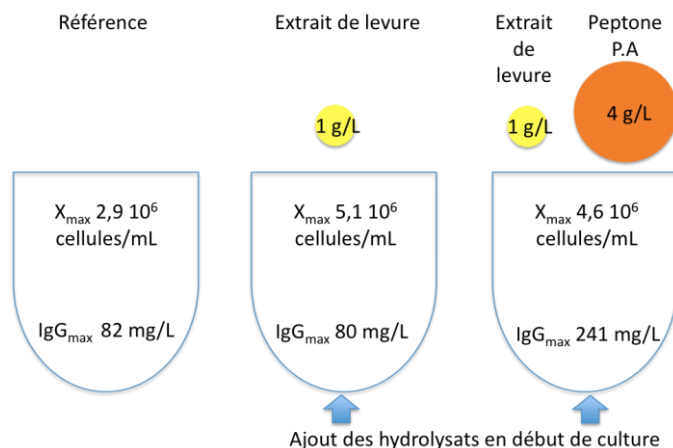


Figure 60. Synthèse des résultats permettant les meilleures performances de culture de cellules CHO en fiole d'Erlenmeyer.

Au cours de cette partie, nous avons mis en évidence des conditions de supplémentation du milieu de culture par des hydrolysats de levure permettant d'améliorer la production cellulaire par 70 % et la concentration d'anticorps par 190 %, par rapport à un milieu de référence chimiquement défini, dans le cas de cultures en fiole d'Erlenmeyer. Dans la partie suivante, nous proposons d'extrapoler ces résultats en bioréacteur agité et contrôlé, et de comparer de manière approfondie les résultats à ceux obtenus en flacons non-contrôlés.

4- Influence de l'ajout de mélanges d'hydrolysats de levure : comparaisons entre fiole et réacteur contrôlé

4.1- Introduction

Les résultats des précédentes parties ont permis de définir des conditions d'utilisation d'hydrolysats de levure permettant d'améliorer les performances de culture de cellules CHO productrices d'IgG. De plus, l'impact des hydrolysats de levure sur les paramètres cinétiques de culture a permis d'avancer certaines hypothèses concernant leur rôle dans le procédé de culture. Néanmoins, un changement de métabolisme au cours de la phase de croissance a été observé quel que soit le milieu de culture. La baisse du pH pourrait, en partie, expliquer ce changement de métabolisme. Ainsi, en vue de mieux comprendre l'influence des hydrolysats sur les paramètres cinétiques de culture, nous proposons de réaliser des cultures dans un réacteur contrôlé en pH et O₂ dissous.

Les travaux de cette partie, présentés sous forme d'article, ont été soumis à la revue *Cytotechnology*. Dans un premier temps, l'article reprend, sous forme de criblage, les résultats présentés dans les parties 2 et 3.2 de ce chapitre. Puis, nous approfondissons et comparons l'effet des conditions opératoires sélectionnées sur les paramètres cinétiques de cultures de cellules CHO-AMW productrices d'IgG cultivées en fiole d'Erlenmeyer et en bioréacteur. Ces résultats devraient permettre de valider l'intérêt de l'ajout des hydrolysats dans un système de culture contrôlé et mieux comprendre leur rôle sur la réponse cellulaire.

4.2- Manuscrit

Combination of yeast hydrolysates to improve CHO cell growth and IgG production

Mathilde Mosser^{1,2,3}, Isabelle Chevalot^{1,2}, Eric Olmos^{1,2}, Fabrice Blanchard^{1,2}, Romain Kapel^{1,2}, Eric Oriol³, Ivan Marc^{1,2}, Annie Marc^{1,2}

¹ CNRS, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UPR- 3349, 2 avenue de la forêt de Haye, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

² Université de Lorraine, ENSAIA, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, 2 avenue de la forêt de Haye, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

³ Bio Springer, 103 rue Jean Jaurès, 94704 Maisons-Alfort, France

Abstract

Many studies underlined the great benefits of hydrolysates used as additives in animal free media on cell culture performances. However, to precisely define hydrolysate feeding strategies, a deeper understanding of their effect on cell growth and protein production is required. In the present study, the effect of addition of one yeast extract and two yeast peptones in a chemically defined medium was first assessed on cell culture performances. Interestingly, specific effects were found depending on the degree of degradation of yeast hydrolysates. The yeast extract at 1 g/L increased the maximal cell density by 70 %, while a mixture of yeast extract (1 g/L) and yeast peptone (4 g/L) increased IgG production by 190 %. These conditions were then evaluated on the CHO cell kinetics all over cultures. Hydrolysates extended the cell growth phase in Erlenmeyer flask and increased the maximal growth rate in bioreactor, while no cell death prevention was observed. However, cell growth stimulation induced by hydrolysates addition was linked with energetic metabolism improvement suggesting that they promote oxidative pathway. Furthermore, hydrolysates provided an additional source of substrate that supported cell growth despite glutamine limitation. Besides, yeast peptone exhibited a higher positive effect on IgG productivity and protected IgG from degradation.

Keywords Yeast extract, yeast peptone, CHO cell culture, IgG recombinant protein, energetic metabolism, bioreactor.

Introduction

Currently, mammalian cells such as chinese hamster ovary (CHO) cells are the most common expression systems to produce recombinant monoclonal antibodies (Butler, 2005). Initially, mammalian cells were grown in culture media supplemented with bovine serum, but its high cost and lot-to-lot variability encouraged the development of

substitutes such as purified proteins, recombinant proteins (Froud 1999) or hydrolysates from animal proteins (Schlaeger 1996). Nevertheless, the risk of contamination by viruses, mycoplasma or prions from animal supplement led to a strong demand for media formulations free from animal components (Grillberger et al. 2009). Then, the search for culture media that most closely replicated the benefits of animal-derived sera without their biosafety risks provoked a growing interest in the use of plant peptones (Heidemann et al. 2000; Burteau et al. 2003; Farges et al. 2008) or yeast extracts (YE) (Sung et al. 2004; Kim & Lee 2009).

Yeasts are produced by oxydative process. Therefore, unlike plant peptones which depend on the vegetal source, climate, geography and protein extraction process, the YE production can be better controlled to reach repeatable lot-to-lot composition. In fact, the influence of three different YE lots was already assessed on recombinant CHO cell culture without showing any variation of the cell culture performances (Sung et al. 2004). Yeast hydrolysate is used as a generic name including YE and peptones. More precisely, YE correspond to the water-soluble fraction of the autolyzed yeast, whereas peptones represent the soluble fraction of proteins hydrolysed by exogenous enzymes. Interestingly, while YE and plant protein peptones were widely used, no study reported the influence of yeast peptones on mammalian cell culture. However, not only the source of hydrolysates (Sung et al. 2004; Kim & Lee 2009), but also the manufacturing process (Chun et al. 2007) may affect cell growth and protein production. Furthermore, hydrolysates mixtures, concentrations and times of addition are also operating conditions that potentially impact cell culture (Sung et al. 2004; Chun et al. 2007; Kim & Lee 2009).

The mechanisms of hydrolysates action on cells remain unclear. On one hand, some results suggested the presence of growth factor-like and anti-apoptotic peptides from plant protein hydrolysates (Burteau et al. 2003; Farges et al. 2008; Franek & Katinger 2002) or YE (Sung et al. 2004). However, few works studied hydrolysate impact on cell death mechanisms. On the other hand, other studies concluded on nutritional efficiency of plant hydrolysates as amino acid sources (Heidemann et al. 2000; Nyberg et al. 1999). Nevertheless, the addition of nutritional as well as “bioactive” compounds may improve the efficiency of energetic cell metabolism. In fact, it was shown in kidney brush border membrane that the uptake of di- and tri-peptides by specific transporters followed by intracellular hydrolysis, could represent an energetically more efficient mechanism than the uptake of free amino acids (Daniel et al. 1992). Furthermore, metabolic flux analysis

showed that a hydrolysate obtained from an animal source promoted the entry of pyruvate to TCA cycle (Bonarius et al. 1996). Other studies underlined that hydrolysates improved cell growth without increasing carbon source consumption and lactate production (Ballez et al. 2004; Chun et al. 2007), while ammonia production was slightly increased (Burteau et al. 2003). Moreover, some authors underlined the potential use of lactate as a source of carbon after glucose depletion, triggered by plant hydrolysates (Burteau et al. 2003). These observations suggested that hydrolysates could influence the cell metabolism depending on the culture phase. Nevertheless, very few works focused on the influence of hydrolysates on cell energetic metabolism by using detailed kinetics studies.

In the present study, one YE and two yeast peptones were evaluated as medium additives for the production of a monoclonal antibody by CHO cells. The content of yeast hydrolysates in main biomolecules was first characterized to highlight their different compositions. Then, the effect of various concentrations of each yeast hydrolysate was assessed on maximal cell and IgG concentrations. Moreover, the combination of yeast hydrolysates and the time of their addition in culture were investigated to evaluate some synergic effects on culture performances. Finally, the influence of the chosen optimal conditions were analyzed on the kinetics of the cell growth, death, IgG production and metabolism of CHO cells cultivated in Erlenmeyer flask as well as in bioreactor. On the basis of the results, the mechanisms of hydrolysate action on cellular responses were discussed.

Material and methods

Yeast hydrolysates

The yeast extract (YE) and the yeast peptones A and B (P.A and P.B) were provided by Bio Springer (Maisons-Alfort, France). The extract corresponds to the water-soluble fraction of the autolyzed yeasts, whereas peptones represent the soluble fraction of yeast proteins hydrolyzed after exogenous enzyme addition. The term hydrolysate is used as a generic name including yeast extracts and peptones.

Cell culture

CHO-AMW cell line producing a recombinant IgG1 anti-human RhD antibody was provided by Dr. F. Wurm (EPFL-Lausanne) (Miescher et al. 2000). Cells were adapted to grow in suspension in PF-BDM, a protein free and chemically defined medium (Schneider 1989), 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. PF-BDM medium was supplemented with 750 μ M ethanolamine (Sigma, France), 500 μ M ferric citrate (Sigma, France) with 1/1 Fe:citrate ratio, 0.1 % PF-68 (Sigma, France) and 4 mM glutamine (Eurobio, France). CHO-AMW cells were routinely cultivated at 37°C in 125 mL Erlenmeyer flasks (Corning, The

Netherlands) with 25 mL working volume and orbitally shaken at a frequency of 110 rpm. The headspace of the flasks was initially purged with a mixture of air-CO₂ (95 % / 5 %). The cells were split every 3–4 days and seeded at a density of 0.2 10⁶ cells/mL.

For screening and kinetics studies, CHO-AMW cells were grown in complete PF-BDM with or without hydrolysate supplementation. They were cultivated in batch mode in 500 mL Erlenmeyer flasks (Corning, The Netherlands) with 100 mL working volume, orbitally shaken at a frequency of 110 rpm at 37°C. The headspace of the flasks was purged once a day with a mixture of air-CO₂ (95 % / 5 %). Besides, kinetics studies of CHO-AMW were also performed in a sparged and mechanically stirred tank reactor (SGI, France) with a working volume of 1,4 L. Agitation was provided by a pitched-blade turbine ($D = 0.07$ m) at 60 rpm. Dissolved oxygen concentration, pH and temperature were regulated at 50 % of air saturation, 7.4 and 37 °C respectively.

Cell counting and metabolite analyses

Samples were harvested once or twice a day from the Erlenmeyer flask or bioreactor. They were used for immediate cell counting, then centrifuged (1500 rpm, 5 min) and stored at -20 °C for subsequent analyses. Cell density was evaluated by using a hemacytometer, and cell viability was measured by the trypan blue dye exclusion method (six repeated counts per sample). Apoptosis was quantified with the Guava cytometer by the annexin V probe (Guava Technologies, Millipore, Billirica, MA). Lysed cells were estimated through LDH released in the cell culture supernatant with an enzymatic kit (LDH PAP, Ellitech, Salon-de-Provence, France) as described by Clincke et al. (2011).

Glucose, lactate and glutamine concentrations were determined by using enzymatic kits (ELITech, Biomerieux and Roche, respectively), while ammonia concentration was measured with a selective electrode (Orion). IgG titer was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Goat anti-human kappa light chain IgG (Invitrogen, USA) was used for coating well plates and the synthesized anti-human RhD IgG1 was detected with biotin-conjugated goat anti-human gamma chain IgG (Invitrogen, USA). The recombinant human anti-RhD IgG1 produced by CHO-AMW cells was quantified from calibration prepared with a whole human IgG (Thermo scientific, USA).

Specific rates of cell growth (μ), glucose and glutamine consumption (q_{Glc} , q_{Gln}), and lactate and ammonia production (q_{Lac} , q_{NH4}) were calculated as described by Petiot et al. (2010).

Characterization of yeast hydrolysates

Molecular size distribution

The molecular size distribution of the peptides contained in yeast hydrolysates was set out by analytical size exclusion high performance liquid chromatography (SE-HPLC) using a Superdex peptide column coupled to an UV detector (Mosser et al. 2012).

Total and free amino acids

The total amino acid composition of freeze-dried samples was determined after peptide hydrolysis in HCl 6 N at 110 °C for 24 h. The solutions were then cooled at room temperature, adjusted to pH 4.5 with NaOH 4 N and filtered through a membrane of 0.22 μ m pore size. Amino acids were derivatized with 9-fluoroenylmethyl chloroformate and o-phthalaldehyde and analyzed by reverse phase HPLC according to the conditions previously described (Mosser et al. 2012). The amino acid concentrations were calculated from calibration curves performed with an amino acid kit (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA).

Carbohydrates

The carbohydrate composition of freeze-dried samples was determined after polysaccharide hydrolysis in HCl 2 N at 104°C for 4 h. The solutions were diluted 25 times in deionized water and filtered through a membrane of 0.22 µm pore size. Then, monosaccharides were analyzed by ion exchange HPLC according to the conditions previously described (Mosser et al. 2012). The concentration of mannose and glucose, which were the main monosaccharides in yeast polysaccharides, was calculated from calibration prepared with standard solutions (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA).

Nucleic acids

The nucleic acid composition of freeze-dried samples was determined after hydrolysis in HClO₄ 60 % at 95°C for 70 min. The solutions were neutralized in NH₄H₂PO₄ (2 M) and filtered through a membrane of 0.22 µm pore size. Then, the nucleobases (adenine, cytosine, uracile, guanine, thymine and hypoxanthine) were analyzed by reverse phase HPLC according to the conditions previously described (Mosser et al. 2012). The nucleobase concentrations were calculated from calibration performed with standards (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA).

Results and discussion

Operating conditions for yeast hydrolysate supplementation to improve maximal cell and IgG levels

Composition of yeast hydrolysates

The three yeast hydrolysates were characterized by their composition in amino acids, peptides, carbohydrates and nucleic acids (Figure 1-A). The peptones P.A and P.B contained high amounts of total amino acids, either free amino acids or peptides, with 71 % and 76 % of raw material mass respectively, whereas total amino acid content of YE was only 60 %. Besides, YE contained 36 % of free amino acids, while the peptones P.B and P.A only 16 % and 1 % respectively. Furthermore, the molecular size distribution profiles of peptides underlined that YE peptides were shorter than those of peptones (Figure 1-B). Therefore, the protein degradation appeared higher in YE and gradually lower in P.B and P.A. On the other hand, similar quantities of carbohydrates were found in YE and P.A with 10 % and 9.5 % respectively, but only 2 % in P.B. Otherwise, YE exhibited a high level of nucleic acids (7 %) compared to P.A and P.B with only 1.5 and 3 % respectively. Thus, the production process led to a clear effect on the composition of the three yeast hydrolysates.

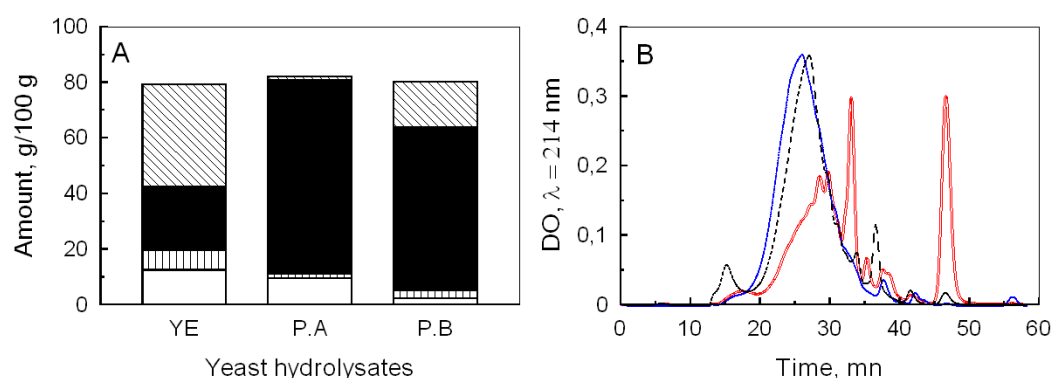


Figure 1. Composition of yeast hydrolysates: (A) carbohydrates ($\square$), nucleic acids ($\square$), peptides ($\blacksquare$) and free amino acids ($\square$) in yeast extract (YE), peptone A (P.A) and peptone B (P.B). (B) Molecular size distribution of peptides from YE (—), P.A (.....) and P.B (---).

Influence of composition and concentration of yeast hydrolysate

The yeast hydrolysates were used as additives in a chemically defined medium to improve CHO-AMW cell growth and IgG production. They were added at a concentration of 1 or 4 g/L. The maximal viable cell ($X_{\max}$) and IgG ($\text{IgG}_{\max}$) concentrations were then compared to the reference culture performed without any supplementation (Figure 2).

The highest $X_{\max}$ was obtained when YE was added at 1 g/L with an increase of 70 % compared with the reference culture, while P.B and P.A only increased it by 50 and 30 % respectively (Figure 2-A). These results underlined that the manufacturing processes of hydrolysates significantly impacted their influence on cell growth. Interestingly, these positive effects increased with the degree of protein degradation. Furthermore, no difference was observed between 1 and 4 g/L of P.A and P.B supplementations. Therefore, despite the higher levels of low molecular size molecules, provided by the increase of peptone concentration, the cell growth could not be improved at the same level than with YE. This suggested that YE contains specific compounds that improved cell growth better than P.A and P.B.

Alternatively, while $\text{IgG}_{\max}$ was not improved at 1 g/L, its level was significantly increased by the addition of hydrolysates at 4 g/L, from 40 to 100 % compared to the reference culture (Figure 2-B). The increase of media osmolarity over 400 mOsm/kg (Ju et al., 2009) and an additional amino acid level (Chua et al. 1994) have already shown a positive effect on protein production and could explain our results with hydrolysate supplementation. However, the addition of 4 g/L of hydrolysates only increased media osmolarity from 300 to 320 mOsm/kg. In fact, a low contribution of soy peptone at 2 g/L

on the medium osmolarity was also reported (Michiels et al. 2011). Furthermore, the highest IgG concentration was obtained with P.A that contained a very low concentration of free amino acids, suggesting a peptide specific effect on recombinant protein production. Thus, the effects of yeast hydrolysate supplementation on cell culture performances depend on their composition as well as their concentration. Furthermore, their effect on the cell growth and the IgG production appeared not to be correlated.

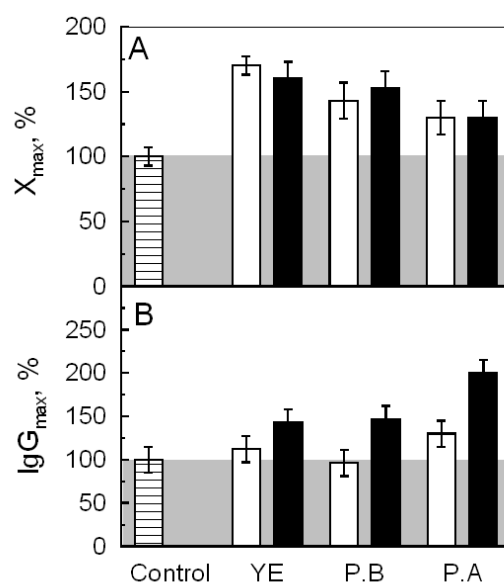


Figure 2. Maximal cell concentration (A) and IgG production (B) of CHO-AMW cells cultivated in Erlenmeyer flasks: without supplementation (▨), with supplementation of 1 g/L (□) or 4 g/L (■) of YE, P.A and P.B. Values were the average $\pm$ standard deviation of three independent experiments.

Yeast hydrolysate mixture and time of supplementation

As highest cell growth and IgG improvements were triggered by the supplementation of 1 g/L YE and 4 g/L peptones respectively, some mixtures were assessed in order to evaluate potential synergistic effects. The peptones were added either at the beginning of the culture or after 40 h, while the YE was added at the beginning of the batch (Figure 3). The mixture of YE and P.B did not increase X_{max} , nor IgG_{max} compared to P.B (4 g/L) alone whatever the time of addition. The mixture of YE and P.A increased X_{max} by 30 % and IgG_{max} by 90 % compared to P.A (4 g/L) alone when added at the initial time. This increase in IgG_{max} was not observed when hydrolysates were added after 40 h, suggesting that P.A exhibited a specific effect on IgG synthesis during the cell growth phase. Furthermore, the mixture of YE with both peptones led to a slight decrease of the cell growth by comparison with YE alone. Consequently, 1 g/L of YE and 1 g/L YE + 4 g/L

P.A added at the beginning of the culture were shown to be good conditions to improve cell growth and IgG production respectively.

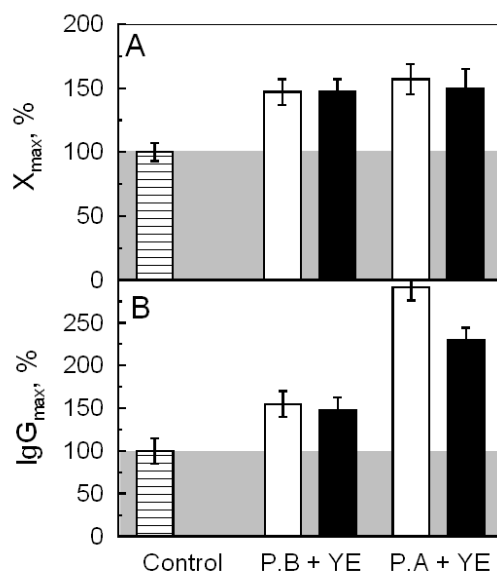


Figure 3. Maximal cell concentration (A) and IgG production (B) of CHO-AMW cells cultivated in Erlenmeyer flasks: without supplementation () , with supplementation of mixture of 1 g/L YE and 4 g/L P.A or P.B at the seeding time () or after 40 hours (). Values were the average $\pm$ standard deviation of three independent experiments.

Effect of yeast hydrolysates on cell culture kinetics in stirred flask and bioreactor

The two previous selected conditions were then used to study the kinetics of cell growth and IgG production. The cultures were performed either in Erlenmeyer flask or in bioreactor (Figure 4).

Kinetics of CHO cell growth and death

Without hydrolysate supplementation, CHO cells cultivated in Erlenmeyer flask reached a maximal density (X_{max}) of $2.9 \cdot 10^6$ cell/mL after 110 h of culture (Figure 4-a). Beside this, CHO cell cultures supplemented with YE or YE + P.A displayed concentrations of $5.1 \cdot 10^6$ cell/mL and $4.7 \cdot 10^6$ cell/mL respectively, after only 90 h. During the first phase of culture (0 to 45 h) cells grew at a similar maximal specific rate of 0.04 h^{-1} whatever culture medium (Table 1). Several studies confirmed that maximal specific growth rates of CHO cells cultivated in Erlenmeyer flasks were not significantly enhanced by addition of YE or plant peptones (Sung et al. 2004; Burtéau et al. 2003; Kim & Lee 2009). However, in the present study, the specific cell growth rate in culture without hydrolysates decreased from

0.04 h⁻¹ to 0.01 h⁻¹ during the phase from 45 to 80 h, while hydrolysates sustained its maximal value until 80 h of culture (Table 1). Interestingly, cell death, measured by trypan blue staining, and lysis, evaluated by released LDH, occurred after 90 h and 60 h of culture respectively, whatever the culture medium (Figure 5-b). Furthermore, the analysis of early and late apoptotic cells, quantified by flow cytometry, underlined that hydrolysates did not prevent cells from apoptosis (Figure 5-a and Figure 5-b). Hence, the variations of the cell specific growth rate observed when hydrolysates were added, did not result from cell death prevention nor from anti-apoptotic effects, contrarily to the hypothesis proposed by other authors (Schlaeger 1996; Farges-Haddani et al. 2006; Franek & Katinger 2002; Franek 2004).

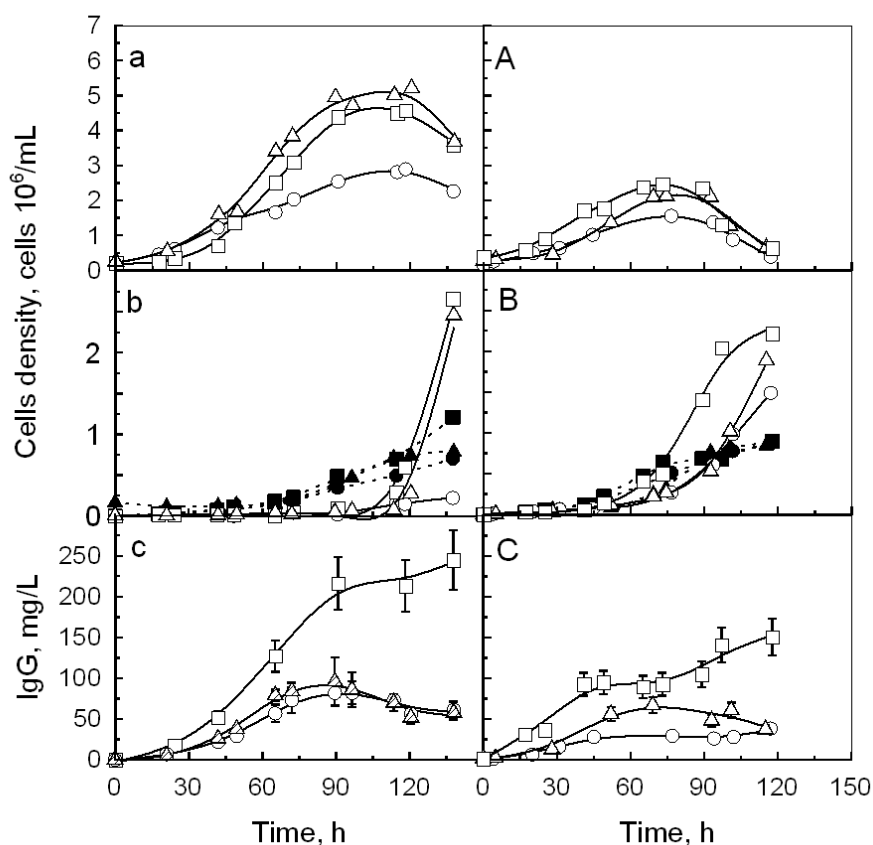


Figure 4. Kinetics of CHO cell cultivated in Erlenmeyer flask (a, b) and bioreactor (A, B): (a, A) viable cells (open symbols) and late apoptotic cells (closed symbols); (b, B) early apoptotic cells, performed without supplementation (○, ●), with 1 g/L YE (△, ▲), or with 4 g/L P.A + 1 g/L YE (□, ■).

In bioreactor, CHO cells cultivated without hydrolysates were able to grow at a maximal specific rate of 0.02 h⁻¹ to reach a maximal density of 1.50 10⁶ cell/mL after 75 h of culture (Figure 4-A and Table 2). Alternatively, cultures supplemented with YE or YE + P.A displayed a maximal specific rate of 0.03 h⁻¹ and reached a maximal cell density of

$2.20 \cdot 10^6$ cell/mL and $2.50 \cdot 10^6$ cell/mL respectively, after 75 h of culture. Therefore, hydrolysates both increased $X_{\max}$ and cell specific growth rates in bioreactor cultures. However, these parameters were significantly lower in bioreactor than in Erlenmeyer flask. Furthermore, higher proportions of dead and lysed cells were measured (Figure 5) and 10 % of late apoptotic cells were detected after only 24 h whatever the culture medium (Figure 5-B). The different hydrodynamic conditions, provoked by mechanical agitation in the bioreactor, may have induced cell death that could partially explain the change in cell behaviour between the two cultures systems. The results also confirmed that yeast hydrolysates seemed not to provide any shear protecting or anti-apoptosis agents. Nevertheless, a few differences of cell metabolism may also be assumed to explain these cell kinetics results.

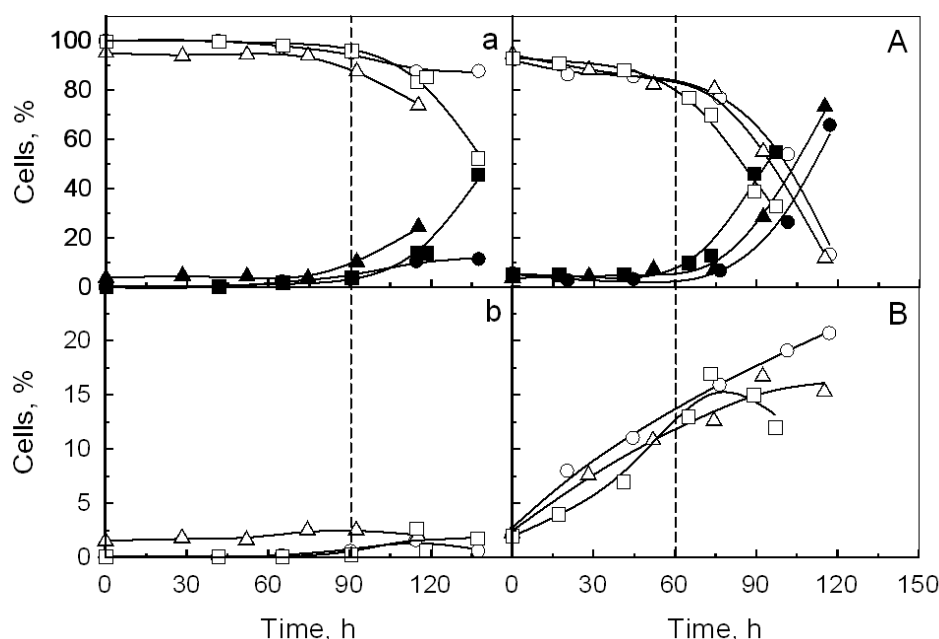


Figure 5. Kinetics of CHO cell cultivated in Erlenmeyer flask (a, b) and bioreactor (A, B): (a, A) viable cells (open symbols) and late apoptotic cells (closed symbols); (b, B) early apoptotic cells, performed without supplementation (○, ●), with 1 g/L YE (△, ▲), or with 4 g/L P.A +1 g/L YE (□, ■).

Kinetics of IgG production

Our results indicated that IgG production occurred during cell growth phase (Figure 4). In Erlenmeyer flask, the maximal IgG level was 80, 90 and 220 mg/L in reference, YE and YE + P.A culture medium respectively, while it was 30, 60 and 120 mg/L in bioreactor (Figure 4-c and Figure 4-C). The ratio of IgG produced per cell was the same in both culture systems, in the medium without hydrolysate (≈ 35 pg/cell) (Table 1 and Table 2). The addition of YE decreased this value down to 25 pg/cell in Erlenmeyer flask culture,

without any effect in bioreactor. On the contrary, the P.A + YE supplementation in both culture systems increased the ratio up to 54 and 65 pg/cell. These last results confirmed the positive effect of P.A combined to YE on the IgG production. It can be hypothesized that the peptone P.A increased the transcription level of IgG as previously observed by addition of yeastolate in CHO cells culture to produce hTPO (Sung et al. 2004). Furthermore, the presence of P.A seemed to induce a slight increase of IgG concentration during cell death phase, whereas a slow decrease was observed without P.A after the end of the growth phase. The release of proteases during cell lysis was already shown to decrease the recombinant protein concentration due to proteolysis (Hansen et al. 1997). In the same time, the addition of a polypeptide (bacitracin A composed of 12 amino acids) in the culture medium was pointed out to prevent recombinant protein degradation by inhibiting protease activity. Other studies underlined that YE (Sung et al. 2004) and soy peptone (Michiels et al. 2011) did not protect recombinant protein from proteolysis. Interestingly, in our experiments, the presence of peptone P.A at 4 g/L was necessary to prevent the decrease of IgG concentration. Thus, it could be assumed that P.A, which is richer in polypeptides than P.B and YE, contains some protease inhibitors.

Effect of yeast hydrolysates on cell energetic metabolism

Glycolysis

In Erlenmeyer flask cultures, the glucose was consumed at a maximal specific rate (q_{Glc}) of about $0.40 \mu\text{mol/h}/10^6$ cell whatever the culture medium (Figure 6-a). Lactate was produced at a maximal specific rate (q_{Lac}) of about $0.60 \mu\text{mol/h}/10^6$ cell and accumulated up to 20 mM. Thus, the lower cell growth rate observed in the absence of hydrolysates was not induced by lactate inhibition. During the first 45 h of culture, a high yield of lactate produced per glucose consumed ($Y_{Lac/Glc}$) of 1.8 mol mol^{-1} was measured (Figure 6-b and Table 1) compared to values from 1.2 to 1.6 mol mol^{-1} commonly reported (Lao & Toth 1997; Farges-Haddani et al. 2006; Sung et al. 2004; Ahn & Antoniewicz 2011). Consequently, about 90 % of the glucose flow was directed toward lactate production instead of integrating the TCA cycle. During this culture phase, a low ratio between produced cells and consumed glucose ($Y_{cell/glc}$) of 0.15 cell/pmol was observed whatever the medium (Figure 6-c and Table 1). However, from 45 h of culture, the lactate production rate decreased faster than the glucose uptake rate, resulting in lower $Y_{Lac/Glc}$ whatever the culture conditions. Furthermore, $Y_{cell/glc}$ was strongly increased to 0.40 and

0.60 cell/pmol in the reference and in the hydrolysate supplemented cultures respectively. It can thus be assumed that cell metabolism shifted from fermentative to oxidative pathway after 45 hours of culture. In reference culture, this metabolism shift was coupled to a decrease of the cell growth rate (from 0.04 to 0.01 h⁻¹) (Table 1). In fact, the shift is often correlated with the end of the exponential cell growth phase (Burky et al. 2007; Wilkens et al. 2011). Interestingly, the addition of hydrolysates maintained the maximal cell specific growth rate (0.04 h⁻¹), despite the metabolism shift. Accordingly, yeast hydrolysates seemed to provide molecules that improve the oxidative metabolism of CHO cells as already reported with meat peptone (Bonarius et al. 1996) or copper addition (Luo et al. 2012).

In bioreactor, whatever the culture conditions, glucose was consumed at a maximum specific rate around 0.30 μmol/h/10⁶ cell all over the cell growth phase (Figure 6-A). The depletion of glucose was correlated with the end of the cell growth phase, suggesting it was a limiting substrate (Figure 4-A and Figure 6-A). In the reference medium or in YE and YE + P.A supplemented conditions, lactate accumulated up to 23, 22 and 21 mM, with a maximal specific production rate of 0.70, 0.60 and 0.50 μmol/h/10⁶ cell respectively. As a consequence, the supplementation of YE and YE + P.A led to a decrease of Y_{Lac/Glc}, from 1.5 in the reference medium, to 1.4 and 1.2 mol/mol respectively (Figure 6-B and Table 2). Furthermore, the hydrolysates addition induced an increase of Y_{cell/glc} from 0.10 to 0.15 cell/pmol compared with the reference culture (Figure 6-C). Therefore, hydrolysates could have contributed to improve pyruvate entry in TCA cycle rather than its lactate conversion as described by Bonarius et al. (1996). On the other hand, in bioreactor cultures performed with pH control, hydrolysates improved the oxidative metabolism from the beginning of cell culture and no shift was observed during the culture. It can be noticed that the pH decrease has been already shown to decrease glucose uptake and to promote the cell oxidative metabolism (Yoon et al. 2005; Kuwae et al. 2005; Burky et al. 2007). Therefore, the pH decrease occurring after 45 h in Erlenmeyer flask culture could have induced the metabolism shift. In this condition, hydrolysates maintained the cell growth phase by supplying oxidative metabolism. This may also partially explain the difference of maximal cell concentration observed between both culture systems.

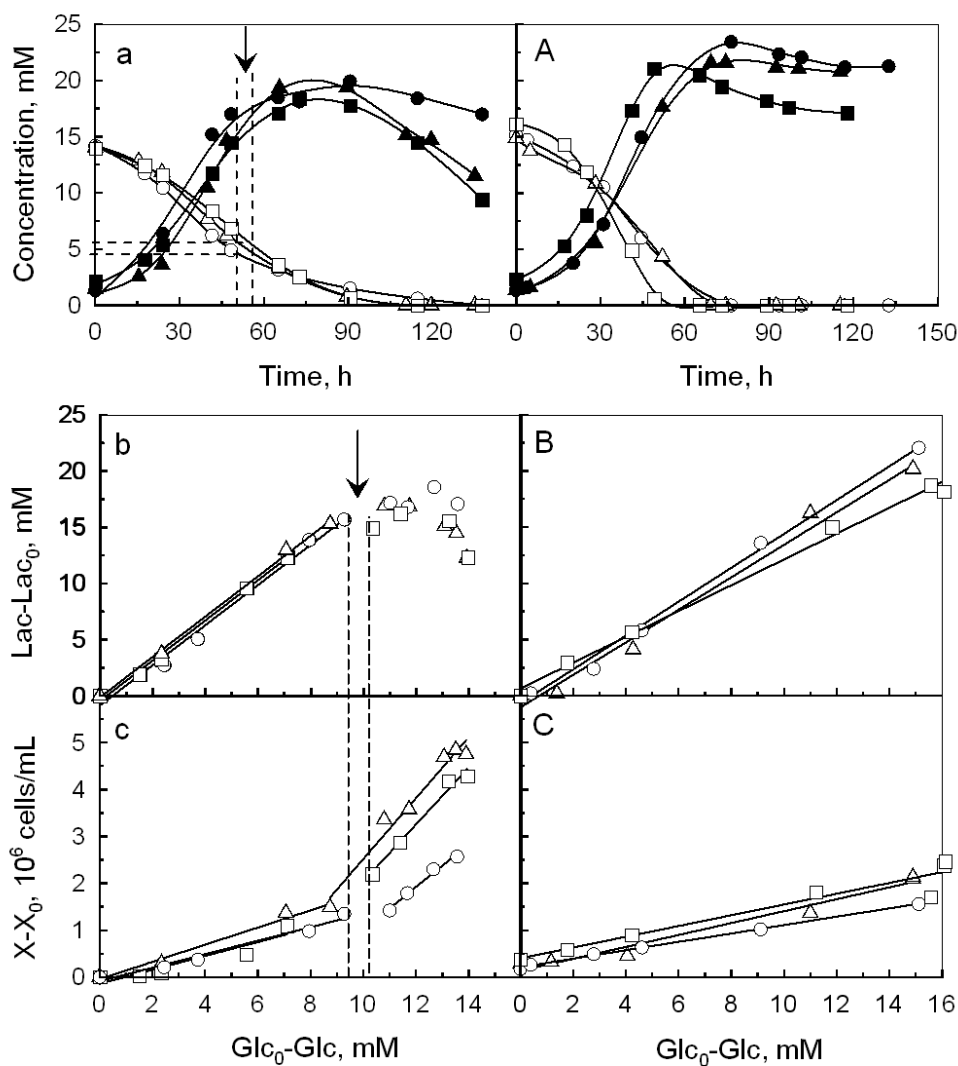


Figure 6. Kinetics of substrate consumption and metabolite production in Erlenmeyer flask (a, b and c) and bioreactor (A, B and C): (a, A) glucose consumption (open symbols) and lactate production (closed symbols); (b, B) correlation between produced lactate and consumed glucose; (c, C) correlation between produced cells and consumed glucose. Cultures performed without supplementation (○, ●), with 1 g/L YE (△, ▲) or with 4 g/L P.A + 1 g/L YE (□, ■). Arrows represent metabolism shift.

Glutaminolysis

In Erlenmeyer flask cultures performed in reference medium, glutamine was consumed at a maximal specific rate (q_{Gln}) of $0.06 \mu\text{mol/h}/10^6 \text{ cell}$, while ammonia accumulated in the medium up to 5.0 mM (Figure 7-a) with a specific production rate (q_{NH_4}) under $0.10 \mu\text{mol/h}/10^6 \text{ cell}$. Media supplemented with YE or YE + P.A promoted an increase of q_{Gln} to $0.08 \mu\text{mol/h}/10^6 \text{ cell}$ and ammonia level reached higher values, 5.3 to 6.8 mM respectively with q_{NH_4} under $0.17 \mu\text{mol/h}/10^6 \text{ cell}$. This increase of ammonia level in presence of protein hydrolysates has been previously described (Burteau et al. 2003).

Therefore, the lower cell specific growth rate in the reference medium could not be attributed to ammonia inhibition. This observation was consistent with a previous study that demonstrated that an ammonia concentration below 8 mM did not inhibit CHO cell growth (Hansen & Emborg 1994). The yield of produced ammonia by consumed glutamine ($Y_{\text{NH}_4/\text{Gln}}$) was 0.9 mol/mol whatever the experimental condition. By contrast, the yield of cell produced by glutamine consumed ($Y_{\text{cell/gln}}$) was increased by the presence of hydrolysates from 0.5 to 0.8 and 0.7 cell/pmol (Figure 7-b). Moreover, hydrolysates drastically increased $Y_{\text{cell/gln}}$ up to 3.8 cell/pmol after 75 hours of culture, since glutamine concentration was becoming limiting in the medium (under 1 mM), suggesting that hydrolysates provided compounds that replaced glutamine to supply TCA cycle. This has already been shown with glutamine substitution by dipeptides containing glutamine (Christie & Butler 1994).

Specific rates of glutamine were similar in bioreactor and in Erlenmeyer flask whatever the culture medium (Figure 7). In absence of hydrolysate, ammonia accumulated up to 3.9 mM (Figure 7-A), with a specific production rate under $0.10 \mu\text{mol/h}/10^6$ cells, and a $Y_{\text{NH}_4/\text{Gln}}$ of 0.5 mol/mol (Figure 7 and Table 2). With supplementation by YE and YE + P.A, ammonia increased up to 4.1 and 5.3 mM respectively, with a specific production under $0.10 \mu\text{mol h}/10^6$ cell and a $Y_{\text{NH}_4/\text{Gln}}$ of 0.7 and 0.8 mol/mol respectively. The higher quantity of nitrogenous source provided by hydrolysates may explain the increase of $Y_{\text{NH}_4/\text{Gln}}$. Furthermore, hydrolysate supplementation increased $Y_{\text{cell/gln}}$ from 0.25 to 0.40 cell/pmol (Figure 7-B). These results underlined that hydrolysates may provide another nitrogen source than glutamine. However, $Y_{\text{cell/gln}}$ remained constant all along the cultures contrarily to the observation in Erlenmeyer flask cultures. This may be explained by the rapid exhaustion of glucose in bioreactor culture, while glutamine was first limiting in Erlenmeyer flask cultures.

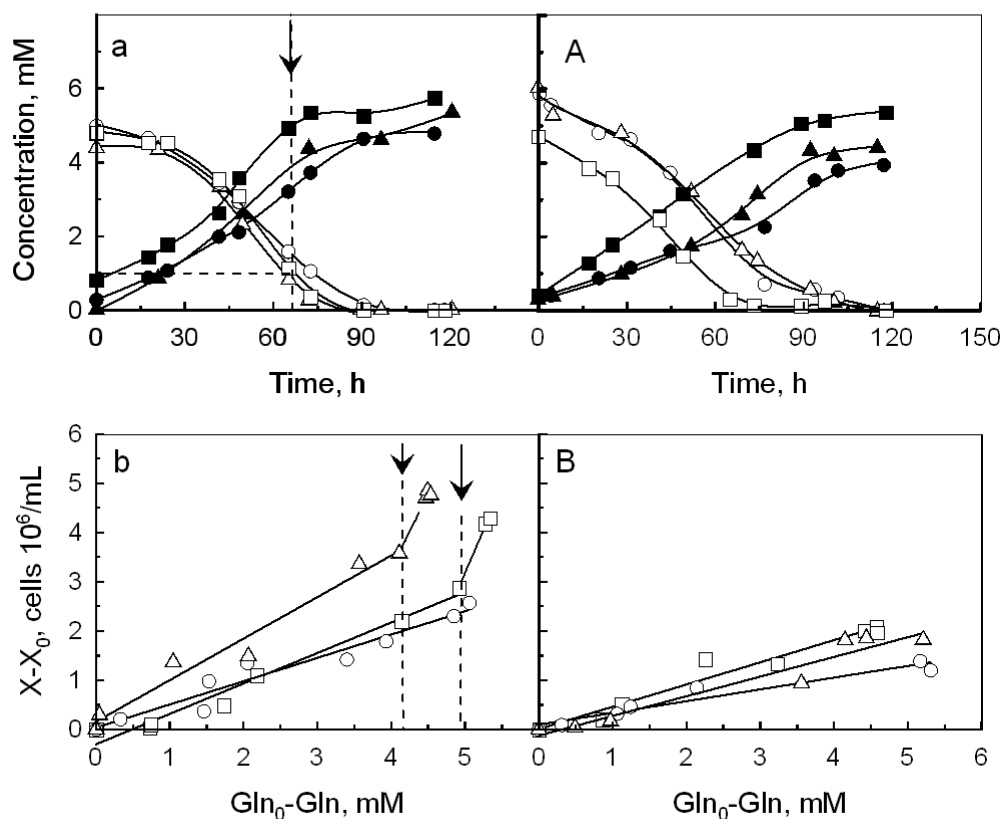


Figure 7. Kinetics of substrate consumption and metabolite production in Erlenmeyer flask (a, b) and bioreactor (A, B): (a, A) glutamine consumption (open symbols) and ammonia production (closed symbols); (b, B) Correlation between produced cells and consumed glutamine. Cultures performed without supplementation (○, ●), with 1 g/L YE (△, ▲), or with 4 g/L P.A + 1 g/L YE (□, ■). Arrows underline the use of another source of substrate that partially replaced glutamine.

Table 1. Specific cell growth rates and metabolic yields of CHO cells cultivated in Erlenmeyer flask, with or without supplementation by yeast hydrolysate.

		Erlenmeyer flasks		
		Culture phase	Control	YE 1 g/L + P.A 4 g/L
μ	(h ⁻¹)	0-45 h	0.04	0.04
		45-80 h	0.01	0.04
$Y_{IgG/cells}$	(pg/cell)	0-90 h	36 ± 4	54 ± 6
$Y_{cell/glc}$	(cell/pmol)	0-50 h	0.15	0.15
		50-90 h	0.45	0.60
$Y_{lac/glc}$	(mol/mol)	0-50 h	1.8	1.8
$Y_{cell/gln}$	(cell/pmol)	0-70 h	0.50	0.85
		70-90 h	0.50	3.90
$Y_{NH4+/gln}$	(mol/mol)	0-90 h	0.9	0.9

Table 2. Specific cell growth rates and metabolic yields of CHO cells cultivated in bioreactor with or without supplementation by yeast hydrolysate.

		Culture phase	Bioreactor		
			Control	YE 1 g/L	YE 1 g/L+ P.A 4 g/L
μ	(h ⁻¹)	0-75 h	0.02	0.03	0.03
$Y_{IgG/cells}$	(pg/cell)	0-75 h	34 ± 4	38 ± 5	65 ± 8
$Y_{cell/glc}$	(cell/pmol)	0-75 h	0.09	0.15	0.13
$Y_{lac/glc}$	(mol/mol)	0-75 h	1.50	1.40	1.20
$Y_{cell/gln}$	(cell/pmol)	0-75 h	0.25	0.40	0.45
$Y_{NH4+/gln}$	(mol/mol)	0-75 h	0.50	0.70	0.80

Conclusion

The present work demonstrated that the most hydrolyzed yeast components, contained in yeast extract, mainly promoted cell growth, while the yeast peptones, richer in oligopeptides, greatly enhanced IgG productivity. In fact, the yeast extract at 1 g/L increased maximal cell density by 70 %, while the yeast peptone at 4 g/L increased IgG production by 100 %. Besides a mixture of hydrolysates allowed the synergy of their individual benefits leading to an increase of maximal IgG level by 190 %. Furthermore, the kinetics of CHO cells cultivated in Erlenmeyer flask and in bioreactor led to a better knowledge of the hydrolysate effects. In the presence of hydrolysates, the cell growth phase was extended in Erlenmeyer flask, while the cell specific growth rate was improved in bioreactor. These effects on cell growth did not result from cell death prevention, but from the improvement of oxidative metabolism of CHO cells. Furthermore, hydrolysates provided an additional source of substrate that supported cell growth despite glutamine limitation. Therefore, our results highlighted that hydrolysates efficiently supplied the TCA cycle that improved oxidative metabolism and CHO cell growth. Alternatively, the supplementation by yeast peptone significantly increased the specific rate of IgG production, without affecting the glucose and glutamine metabolism compared to culture supplemented with yeast extract alone, suggesting a specific effect of the yeast peptone on IgG transcription. Furthermore, yeast peptone was suggested to protect IgG from proteolysis during cell death phase. Works are in progress to further characterize hydrolysate molecules of interest by using a nanofiltration process. The characterization of these compounds will then allowed a better understanding of the specific role of hydrolysates on cell culture performances.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Dr. Florian Wurm (EPFL, Lausanne) for the

supply of the recombinant CHO cell line.

References

- Ahn WS, Antoniewicz MR (2011) Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metab Eng* 13: 598-609.
- Ballez JS, Mols J, Burteau C, Agathos SN, Schneider YJ (2004) Plant protein hydrolysates support CHO-320 cells proliferation and recombinant IFN- γ production in suspension and inside microcarriers in protein-free media. *Cytotechnology* 44: 103–114.
- Bonarius HP, Hatzimanikatis V, Meeseters KP, de Gooijer CD, Schmid G, Tramper J (1996) Metabolic flux analysis of hybridoma cells in different culture media using mass balances. *Biotechnol Bioeng* 50: 299-318.
- Burky JE, Wesson MC, Young A, Farnsworth S, Dionne B, Zhu Y, Hartman TE, Qu L, Zhou W, Sauer PW (2007) Protein-free fed-batch culture of non-GS NS0 cell lines for production of recombinant antibodies. *Biotechnol Bioeng* 96: 281-293.
- Burteau CC, Verhoeve FR, Mols JF, 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.
- Butler M (2005) Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol* 68: 283-291.
- Christie A, Butler M (1994) Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase. *J Biotechnol* 37: 277-290.
- Chua FK, Yap MG and Oh SK (1994) Hyper-stimulation of monoclonal antibody production by high osmolarity stress in eRDF medium. *J Biotechnol* 37: 265-275.
- Chun BH, Kim JH, Lee HJ, Chung N (2007) Usability of size-excluded fractions of soy protein hydrolysates for growth and viability of Chinese hamster ovary cells in protein-free suspension culture. *Bioresour Technol* 98:1000–1005.
- Clincke MF, Guedon E, Yen FT, Ogier V, Roitel O, Goergen JL (2011) 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*, 27: 181-190.
- Daniel H, Morse EL, Adibi SA (1992) Determinants of substrate affinity for the oligopeptide/H⁺ symporter in the renal brush border membrane. *J Biol Chem*, 267: 9565-9573.
- Farges B, Chenu S, Marc A, Goergen JL (2008) Kinetics of IFN- γ producing CHO cells and other industrially relevant cell lines in rapeseed-supplemented batch cultures. *Process Biochem* 43: 945-953.
- 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, Katinger H (2002) Specific Effects of Synthetic Oligopeptides on Cultured Animal Cells. *Biotechnol Prog* 18: 155-158.
- Franek F (2004) Gluten of spelt wheat (*Triticum aestivum* subspecies *spelta*) as a source of peptides promoting viability and product yield of mouse hybridoma cell cultures. *J Agric Food Chem* 52: 4097-4100.
- Froud SJ (1999) The development, benefits and disadvantages of serum-free media. *Dev Biol Stand* 99: 157-166.
- Grillberger L, Kreil TR, Nasr S, Reiter M (2009) Emerging trends in plasma-free manufacturing of recombinant protein therapeutics expressed in mammalian cells. *Biotechnol J* 4: 186-201.

Hansen HA, 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.

Hansen K, Kjalke M, Rasmussen PB, Kongerslev L, Ezban M (1997) Proteolytic cleavage of recombinant two-chain factor VIII during cell culture production is mediated by protease(s) from lysed cells : The use of pulse labelling directly in production medium. *Cytotechnology* 24: 227-234.

Heidemann R, Zhang C, Qi H, Larrick Rule J, Rozales C, Park S, Chuppa S, Ray M, Michaels J, Konstantinov K, Naveh D (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.

Ju HK, Hwang SJ, Jeon CJ, Lee GM, Yoon SK (2009) Use of NaCl prevents aggregation of recombinant COMP-Angiopoietin-1 in Chinese hamster ovary cells. *J Biotechnol* 143: 145-150.

Kim SH, Lee GM (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.

Kuwaie S, Ohda T, Tamashima H, Miki H, Kobayashi K (2005) Development of a fed-batch culture process for enhanced production of recombinant human antithrombin by Chinese hamster ovary cells. *J Biosci Bioeng* 100: 502-510.

Lao MS, Toth D (1997) Effects of Ammonium and Lactate on Growth and Metabolism of a Recombinant Chinese Hamster Ovary Cell Culture. *Biotechnol Prog* 13: 688-691.

Luo J, Vijayasankaran N, Autsen J, Santuray R, Hudson T, Amanullah A, Li F (2012) Comparative metabolite analysis to understand lactate metabolism shift in Chinese hamster ovary cell culture process. *Biotechnol Bioeng* 109: 146-156.

Michiels JF, Sart S, Schneider YJ, Agathos SN (2011) Effects of a soy peptone on γ -IFN production steps in CHO-320 cells. *Process Biochem* 46: 1759-1766.

Miescher S, Zahn-Zabal M, De Jesus M, Moudry R, Fisch I, Vogel M, Kobr M, Imboden MA, Kragten E, Bichler J, Mermod N, Stadler BM, Amstutz H, Wurm F (2000) CHO expression of a novel human recombinant IgG1 anti-RhD antibody isolated by phage display. *Br J Haematol*, 111: 157-166.

Mosser M, Kapel R, Aymes A, Bonnanno LM, Olmos E, Chevalot I, Marc I, Marc A (2012) Chromatographic fractionation of yeast extract: a strategy to identify physicochemical properties of compounds promoting CHO cell culture. *Process Biochem*, 47: 1178-1185.

Nyberg GB, Balcarcel RR, Follstad BD, Stephanopoulos G, Wang DI (1999) Metabolism of peptide amino acids by Chinese hamster ovary cells grown in a complex medium. *Biotechnol Bioeng* 62: 324-335.

Petiot E, Guedon E, Blanchard F, Gény C, Pinton H, Marc A. (2010) Kinetic characterization of vero cell metabolism in a serum- free batch culture process. *Biotechnol Bioeng* 107: 143-153.

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.

Schneider YJ (1989) Optimisation of hybridoma cell growth and monoclonal antibody secretion in a chemically defined, serum- and protein-free culture medium. *J Immunol Methods* 116: 65-77.

Sung YH, Lim SW, Chung JY, Lee GM (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: 527-536.

Wilkens CA, Altamirano C, Gerdtzen ZP (2011) Comparative metabolic analysis of lactate for CHO cells in

glucose and galactose. *Biotechnol Bioprocess Eng* 16: 714-724.

Yoon SK, Choi SL, Song JY, Lee GM (2005) Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese hamster ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0 degrees C. *Biotechnol Bioeng* 89: 345-356.

4.3- Principales contributions du manuscrit

Dans un premier temps, l'article reprend des résultats déjà discutés dans les parties précédentes pour évaluer les conditions d'ajout des hydrolysats de levure. Les meilleures conditions sélectionnées ont augmenté la croissance cellulaire et la production d'IgG de respectivement 70 % et 190 %. Dans un deuxième temps, ces résultats ont été globalement confirmés en bioréacteur.

En présence d'hydrolysats, la phase de croissance cellulaire a été allongée en fiole d'Erlenmeyer, tandis que la vitesse spécifique de croissance a été augmentée en bioréacteur. Ces effets ne résultent pas de la prévention de la mort cellulaire, mais de l'amélioration du métabolisme oxydatif des cellules CHO. La comparaison des deux systèmes de culture a confirmé l'implication du pH dans la transition du métabolisme oxydatif des cellules cultivées en fiole d'Erlenmeyer. Néanmoins, malgré des différences de comportement entre les deux systèmes, le bénéfice des hydrolysats sur le métabolisme énergétique a été confirmé.

Par rapport à la culture supplémentée avec l'EXL seul, la peptone P.A augmente la production spécifique d'IgG sans affecter le métabolisme du glucose ou de la glutamine. Ces résultats suggèrent un effet spécifique de la peptone sur la transcription au cours de la synthèse de l'IgG.

5- Conclusion du *chapitre 1*

Les travaux réalisés dans cette partie nous ont permis de mieux comprendre l'influence d'hydrolysats de levure sur les performances d'un procédé de culture de cellules CHO productrices d'AcM. L'approche mise en œuvre et les principaux résultats sont présentés dans la Figure 61

Tout d'abord, nous avons montré que les hydrolysats qui améliorent la croissance cellulaire ou la production d'AcM n'étaient pas les mêmes. L'utilisation d'un hydrolysats plus fortement dégradé (EXL ou peptone P.B) est plutôt favorable pour améliorer la croissance cellulaire, alors qu'un hydrolysats moins dégradé (peptone P.A) stimule plus spécifiquement la production d'AcM. De plus, une concentration de 4 g/L est nécessaire pour améliorer la production d'AcM, alors qu'une concentration de 1 g/L est suffisante pour stimuler la croissance cellulaire de manière optimale. Par contre, nous avons observé qu'il était possible de combiner ces effets en utilisant des mélanges d'hydrolysats, ce qui a permis de quasiment tripler la concentration maximale d'AcM par rapport au milieu de référence (+ 190 %). En revanche, ces résultats ne sont pas aussi bons lorsque la peptone est ajoutée au cours de la phase exponentielle de croissance. D'autre part, malgré une limitation en substrats carbonés, observée au cours de la culture en présence d'EXL, l'ajout de glutamine et de glucose ne permet pas d'améliorer la cinétique de croissance cellulaire.

L'analyse des paramètres cinétiques de culture nous a permis de mieux affiner le rôle des hydrolysats de levure dans notre modèle de culture. Tout d'abord, nous avons montré que l'effet des hydrolysats sur la concentration cellulaire maximale n'est pas dû à la prévention de la mort cellulaire, mais bien à une stimulation de la croissance cellulaire. De plus, parallèlement à leur effet sur la croissance cellulaire, les hydrolysats favorisent un métabolisme oxydatif. Par ailleurs, l'EXL et la peptone P.B contiennent des molécules qui permettent aux cellules de prolonger leur croissance même en conditions limitantes en glutamine, et de générer moins d'ions ammonium. Enfin, nous avons montré que la peptone P.A présentait un effet spécifique sur la synthèse de l'IgG et semblait prévenir sa dégradation lors de la phase de mort cellulaire.

Ainsi, ces résultats préliminaires démontrent clairement l'atout des hydrolysats de levure et la nécessité de mieux contrôler leur apport dans le milieu de culture. Cependant, la complexité de leur composition ne permet pas d'identifier les molécules responsables de

leur intérêt. C'est pourquoi, dans la suite des travaux divers procédés de fractionnement seront mis en œuvre. L'activité des fractions sera quantifiée. L'objectif sera, à la fois, de mieux caractériser les composés d'intérêt pour mieux comprendre les mécanismes d'action des hydrolysats, mais aussi, de réduire leur complexité.

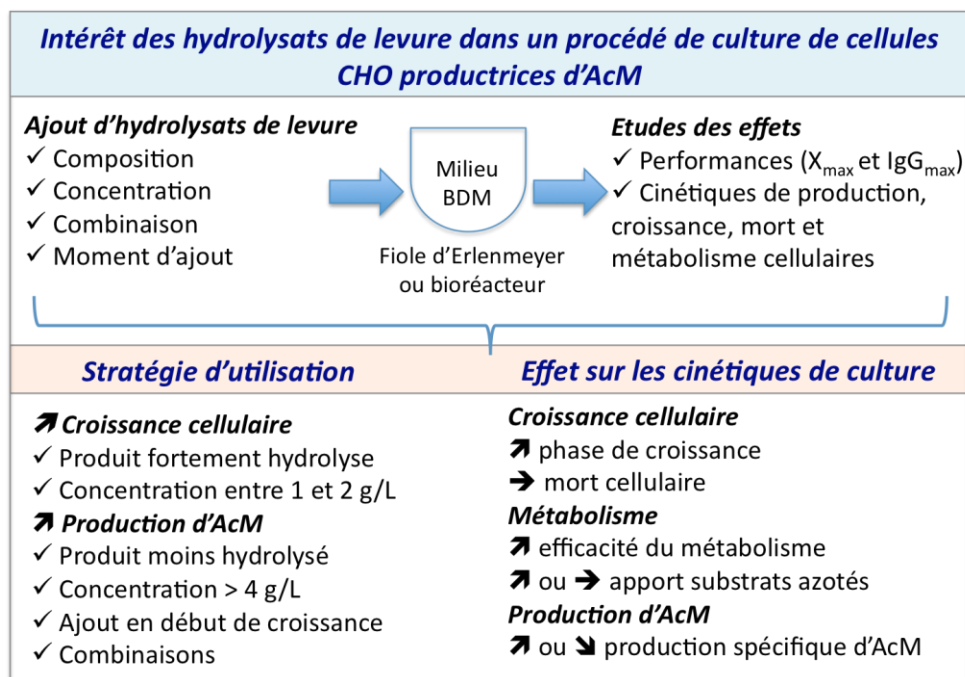


Figure 61. Synthèse des résultats du chapitre 1

Chapitre 2

Nature biochimique des composés
actifs de l'extrait de levure fractionné
par nanofiltration

NATURE BIOCHIMIQUE DES COMPOSES ACTIFS DE L'EXTRAIT DE LEVURE FRACTIONNE PAR NANOFILTRATION

1- INTRODUCTION.....	174
2- COMPOSES DE L'EXL IMPLIQUES DANS LA REPONSE DE CELLULES CHO RECOMBINANTES.....	175
2.1- INTRODUCTION.....	175
2.2- MANUSCRIT.....	176
2.3- PRINCIPALES CONTRIBUTIONS DU MANUSCRIT	192
3- SYNERGIE DES MOLECULES DE FAIBLES ET HAUTS POIDS MOLECULAIRES CONTENUES DANS L'EXL.....	194
3.1- INTRODUCTION.....	194
3.2- GENERATION DE DIFFERENTS RETENTAT DE NANOFILTRATION MEMBRANAIRE.....	194
3.3- INFLUENCE DU RETENTAT DE NANOFILTRATION OBTENU APRES DEUX DIAFILTRATIONS.....	196
4- CONCLUSION DU CHAPITRE 2	199

1- Introduction

L'EXL est composé de matière protéique, glucidique, nucléique, mais aussi de vitamines, minéraux et oligoéléments. De plus, certaines de ces biomolécules sont plus ou moins polymérisées incluant des monomères (acides aminés, bases azotées, monosaccharide, vitamines), oligomères (peptides, disaccharides) ou macromolécules (ARN, ADN et polysaccharides). Les hydrolysats sont donc, par nature, indéfinis et complexes. Ainsi, malgré leur bénéfice avéré dans les procédés de culture, leur utilisation représente certaines contraintes. Tout d'abord, la variabilité lot-à-lot de la composition des hydrolysats peut diminuer la reproductibilité des performances du procédé de culture. En outre, le caractère non défini des hydrolysats complique, le cas échéant, l'optimisation de l'alimentation d'un procédé de culture. En effet, le nombre important de molécules ajoutées ne permet pas d'être précis quant à leurs rôles respectifs sur les cinétiques cellulaires. Il est également essentiel d'identifier le plus exhaustivement possible les composés présents dans le milieu de culture pour vérifier l'innocuité de la forme pharmaceutique du produit final. Par ailleurs, les hydrolysats peuvent aussi contenir des composés inhibiteurs pour les cellules. Par conséquent, un des défis majeurs pour pallier les contraintes d'utilisation des hydrolysats est une meilleure identification et caractérisation des composés d'intérêt.

Ainsi, dans cette partie, une démarche d'identification de la nature biochimique des composés impliqués dans la réponse des cellules CHO productrices d'IgG est proposée. Tout d'abord, la caractérisation de l'EXL sera améliorée afin d'évaluer son apport par rapport aux composés du milieu de culture de référence. Puis, les effets de différents groupes de molécules, soit issus d'un fractionnement membranaire, soit reconstitués, seront étudiés sur les paramètres cinétiques de culture pour identifier les composés d'intérêt présents dans l'EXL. A partir des résultats, leur mécanisme d'action sera discuté. Dans un deuxième temps, la synergie entre groupes de molécules, issus de la nanofiltration, sera discutée pour améliorer notre connaissance de l'effet global de l'EXL.

2- Composés de l'EXL impliqués dans la réponse de cellules CHO recombinantes

2.1- Introduction

Les résultats développés dans le précédent chapitre ont mis en évidence l'intérêt de l'ajout d'EXL pour améliorer les performances de culture de cellules CHO (Cf chapitre 1). Pourtant, comme indiqué dans la revue bibliographique, la nature des composés de l'EXL impliqués dans la réponse des cellules de mammifères reste peu connue. Par ailleurs, différents travaux ont recherché la caractérisation de groupe de molécules d'intérêt, contenues dans divers hydrolysats utilisés pour la culture de cellules animales. Les stratégies généralement utilisées consistent à étudier l'influence de groupe de biomolécules, soit, provenant d'hydrolysats fractionnés, soit, reconstitués sur la croissance cellulaire, la production de protéines recombinantes et le métabolisme énergétique.

Dans ce contexte, la stratégie générale proposée dans l'article consiste à : (i) fractionner l'EXL par nanofiltration, (ii) analyser la composition de l'EXL et des fractions, (iii) reconstituer certains groupes de ses biomolécules et (iv) étudier leurs effets sur les paramètres cinétiques de culture. L'objectif final de ces travaux est de mieux comprendre le rôle de l'EXL ajouté dans un procédé de culture et de proposer des procédés de purification pour simplifier sa composition. Ces résultats ont été rédigés sous forme d'un manuscrit pour soumission à *Journal of Bioscience and Bioengineering*.

2.2- Manuscrit

Biochemical nature of yeast extract key compounds involved in recombinant CHO cell culture improvement

^a Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UPR-CNRS 3349, INPL-ENSAIA, 2 avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

^b BioSpringer, 103 rue Jean Jaurès, 94704 Maisons-Alfort, France

Abstract

Yeast extract (YE) are known to greatly enhance mammalian cell culture performance, but their undefined composition decreases process reliability. Accordingly, in the present study, the nature of YE compounds involved in the improvement of recombinant CHO cell growth and IgG production was investigated. Firstly, the benefits of YE were verified, revealing that it increased maximal concentrations of viable cells and IgG up to 76 % and 65 % respectively compared to reference culture. Then, the analyses of YE composition highlighted the presence of molecules such as amino acids, vitamins, salts, nucleobases and glucose that were contained in reference medium, while others including peptides, trehalose, polysaccharides and nucleic acids were not. Consequently, YE was fractionated by a nanofiltration process and reconstituted to evaluate if its effects on cell culture were due either to the modification of the proportion of some molecules present in the medium, or to the addition of new compounds. The molecules contained in reference medium, trehalose and short peptides were isolated in the permeate, while other molecules were concentrated in the retentate. The permeate exhibited similar effects than YE, whereas retentate only increased cell growth. Thus, nanofiltration process has allowed refining YE by removing macromolecules. Furthermore, permeate reconstitution in amino acids and trehalose underlined that its content of di and tri-peptides was used as an efficient source of nitrogenous substrate. On the other hand, some molecules exhibiting growth-promoting effect were isolated in retentate.

Keywords: yeast extract, composition characterization, tangential nanofiltration, CHO cells, IgG production, kinetics studies.

Introduction

Mammalian cells, and especially Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, are currently the main expression systems used to produce monoclonal antibodies¹. They were initially

grown in animal-derived sera media to promote cell growth and protein production. However, the detection of prions, viral contaminant and mycoplasma in animal sera has led to a strong demand for animal free media formulations^{2,3}. Interesting results were found with protein plant peptones⁴⁻⁶ or yeast extracts (YE)^{7,8} to promote mammalian cell culture. YE are the soluble fractions stemmed from yeast autolysis. Accordingly, YE are a complex mixture composed of amino acids, peptides, carbohydrates, nucleic acids, vitamins and minerals⁹. YE thus contain several molecules already present in mammalian media formulation (amino acids, glucose, nucleosides, vitamins, minerals), but also additional ones (peptides, carbohydrates, nucleic acids). The identification of the role played by molecules composing YE, on cell cultures is of a great interest. Indeed, once identified, inhibitory or useless compounds might be eliminated by implementing separation processes. These results would thus increase culture performance and simplify downstream processing steps^{3,10}. However, the identification of YE key molecules is a particular challenge, mainly because of the high complexity of the mixture and of the numerous performance criteria linked to cell culture process.

Some attempts were made with vegetal peptones that are less complex mixtures than YE. One of the strategies followed consisted in the fractionation of peptones and assaying the effect of each fraction on cell culture performances. Fractionation by tangential ultrafiltration (cut-off ranging from 1 to 10 kDa) of rapeseed¹¹ and soy¹² peptones showed that peptones could be replaced by their lowest molecular weight fractions without a decrease of mammalian culture performances. Furthermore, size exclusion chromatography separation of wheat and soy peptones suggested that active molecules were short oligopeptides^{13,14}. In the same time, to further understand the role of peptides from peptones on cell culture, they were reconstituted on the basis of their content of total amino acids^{11,15} or with some synthetic peptides¹⁶⁻¹⁸. These studies showed that peptones effects are not comparable to their amino acids content and that some peptides may act as anti-apoptotic and protein enhancer agents. However, the influence of peptones on cell metabolism also underlined they are a source of nitrogenous substrate^{19,20}. To our knowledge, such a complete study including fractionation, reconstitution and activity test has never been undertaken to precise the role of hydrolysates biomolecules on mammalian cell culture.

In this work, the biochemical nature of YE compounds involved in mammalian cell culture improvement was investigated. An integrative strategy, including (i) membrane

fractionation process, (ii) characterization methods, (iii) reconstitution and (iv) cell culture activity test, was achieved. Firstly, the benefits of YE on maximal concentrations of CHO viable cells and monoclonal antibody were characterized. Then, YE composition was analysed by its content in amino acids, peptides, carbohydrates and nucleic acids to evaluate the contribution of YE supplementation in reference medium formulation. Secondly, YE was fractionated with a nanofiltration membrane process. The aim of this approach was to isolate small molecular weight compounds from higher ones in order to better characterize YE composition and to assess the influence of both fractions on CHO cell culture parameters including cell growth, death, recombinant protein production, and energetic metabolism. Finally, some groups of molecules were reconstituted and assessed on CHO cell growth to further identify the nature of key compounds. On the basis of these results, the contribution of each class of molecules contained in YE was discussed.

Materials and methods

Cell culture

CHO-AMW cell line producing anti-human RhD-IgG1 was provided by Dr. F. Wurm (EPFL SV IBI LBTC). CHO cells were routinely cultivated in batch mode at 37°C in 125 mL Erlenmeyer flasks (Corning, The Netherlands) with 25 mL working volume on an orbital shaker (90 rpm). The headspace of the flasks was purged with a mixture of air-CO₂ (5 %). Cells were grown in BDM, a protein free chemically defined media²¹, 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 µM ethanolamine (Sigma, France), 500 µM ferric citrate (Sigma, France) with a 1/1 Fe:citrate ratio, 0.1 % PF-68 (Sigma, France) and 4 mM of glutamine (Eurobio, France). The cells were split every 3–4 days and seeded with a density of 0.2 10⁶ cells/mL.

Cell counting and metabolite analysis

Samples were harvested either once or twice a day from the Erlenmeyer flasks. They were used either for immediate cell concentration determination or centrifuged (1500 rpm, 5 min) for subsequent analyses and stored at -20°C. 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).

Glucose and lactate concentrations were determined using enzymatic kits (glucose PAP, Ellitech; lactate PAP, Biomérieux, Craaponne, France) on a Vitalab Selectra E analyzer 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, Thermofisher Scientific, Waltham, MA) with 10 % CV.

IgG production

IgG concentration in samples was determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Goat anti-human kappa light chain of IgG (Invitrogen, USA) was used for coating well plates. The produced antibody was detected with biotin-conjugated goat anti-human gamma chain IgG (Invitrogen, USA). The recombinant human anti-RhD IgG1 produced by CHO-AMW cells was quantified from calibration performed with a whole human IgG (Thermo scientific, USA).

Calculations of specific rates

Specific rates of apparent cell growth (μ) and of IgG production (π_{IgG}) were calculated using the following equations in batch mode:

$$\mu = \frac{1}{X_v} \frac{dX_v}{dt} \text{ and } \pi_{IgG} = \frac{1}{X_v} \frac{d[IgG]}{dt}$$

where X_v and $[IgG]$ are the viable cell and the IgG experimental concentrations respectively.

The kinetic yields were calculated using the following equations:

$$Y_{P/S} = \frac{P}{S} \text{ and } Y_{Xv/S} = \frac{X_v}{S}$$

where P and S are the concentrations of substrates and products measured during the cultures.

YE product and nanofiltration process

The commercial yeast extract used in this study is a soluble fraction of yeast autolysate ultrafiltrated by a MWCO of 10 kDa provided by Bio Springer (Bio Springer, Maisons-Alfort, France).

Nanofiltration process was performed with a ProScale system (Millipore, USA) equipped with a temperature regulation system and two pressure gauges (at the inlet and outlet of the retentate). The membrane used was a spiral-wound Nanomax 50 membrane (Millipore, Bedford, MA) having a cut-off of 500 Da and an area of 0.4 m². Filtrations were performed at 25°C with an initial feed volume of 4 L at a concentration of 2.5 % (w/v) of yeast extract. Before the separation process started, permeate was recycled for 10 min to stabilize membrane charge. The first step of the separation process was a batch concentration up to a volume reducing factor of 2. Then, diafiltration with several successive diavolumes of distilled water was run. A diavolume corresponds to the feed volume at the beginning of the diafiltration experiment (i.e. 2 L). The operating transmembrane pressure was set to 6.5 10⁵ Pa. In these conditions, permeate flow rate was 3.6 L/h during the concentration step. This value progressively rose up to 5.0 L/h at the end of the diafiltration step. At each diavolume, conductivity (WTW LF96 conductivity meter) and dry matter (expressed in percentage of starting dry matter implemented) were measured in the permeate compartment. Finally, the retentate and the permeate obtained at the end of the separation process were freeze-dried.

YE and fractions characterization

YE and fractions were characterized by their composition in amino acids, carbohydrates, nucleic acids and by their peptides molecular size distribution as described by Mosser et al.²³. Furthermore, the trehalose, a alpha-linked disaccharide formed by an α,α -1,1-glucoside bond between two α -glucose units, was assayed by a commercial enzymatic kit (Megazyme, Wicklow, Ireland).

Results and discussion

YE supplementation in recombinant CHO cell culture

Effect of YE on maximal CHO cell and IgG concentrations

The influence of a commercial yeast extract (YE) was assessed on recombinant CHO-AMW cell culture in Erlenmeyer flask. At first, the effect of four additional concentrations (0.5, 1, 2 and 4 g/L) of YE in the reference medium was assessed on maximal viable cell concentration ($X_{\max}$) (Figure 1-A). Our results showed that $X_{\max}$ values of cultures supplemented with 0.5, 1, 2 and 4 g/L of YE increased by 43, 70, 73 and 67 % respectively, while the $X_{\max}$ reached in reference culture was $3.0 \cdot 10^6$ cells/mL. Consequently, YE demonstrated a growth promoting activity at every concentration assessed, but the effect was not related to the dose and even seemed to decrease beyond 2 g/L. Such a pattern was already observed in the literature^{7,8,23}.

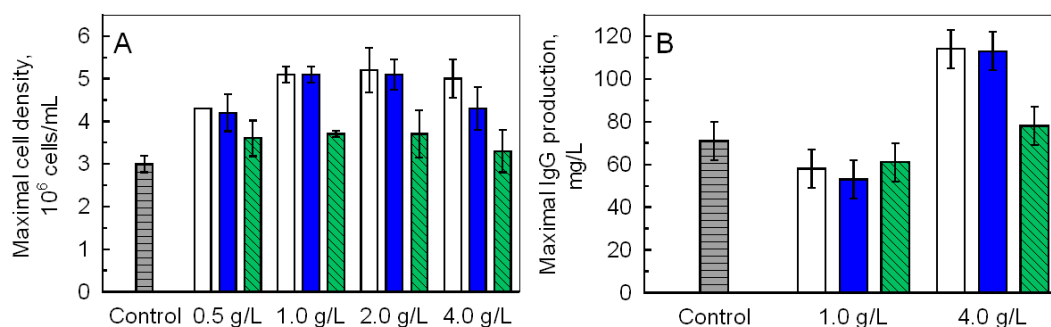


Figure 1. (A) Maximal viable cell concentration and (B) maximal IgG production of CHO-AMW cells cultivated in Erlenmeyer flasks: without supplementation (grey) or with a range of additional concentration from 0.5 to 4.0 g/L of YE (white), permeate (blue) and retentate (green). Values were the average $\pm$ standard deviation of three independent experiments.

The impact of YE on IgG production was investigated at concentrations of 1 and 4 g/L in reference medium (Figure 1-B). The results showed that maximal IgG concentration ($IgG_{\max}$) of culture supplemented with 1 g/L of YE decreased by 14 % the $IgG_{\max}$ measured in the reference culture that was 70 mg/L. By contrast, an increase of 60 % was observed with 4 g/L of YE. Therefore, an addition of YE at 1 g/L was not sufficient to enhance protein production despite it efficiently promoted $X_{\max}$. These results confirmed previous works showing that the optimal conditions of hydrolysates supplementation to promote cell growth and protein production were not similar^{7,13}.

YE composition and influence on reference medium formulation

The commercial YE was mainly composed of protein material (63 % w/w of YE on a basis of wet matter, Figure 2-A). This material was divided into 57 % of free amino acids and 43 % of peptides. The chromatogram of YE obtained by SE-HPLC showed two main peaks exhibiting a molar range from 300 to 2000 Da and 90 to 300 Da (Figure 2-B). Consequently, the YE used for this study was highly degraded product, including a high proportion of di and tri-peptides, compared to commonly used hydrolysates. YE also contained carbohydrates (10 % w/w). These carbohydrates were composed of 60 % of trehalose, 20 % of monosaccharides (mainly glucose and mannose) and then 20 % of polysaccharides. According to the manufacturer, the rest of YE powder was composed of minerals (15 %), nucleic acids (7 %), water (5 %) and vitamins (0.27 %).

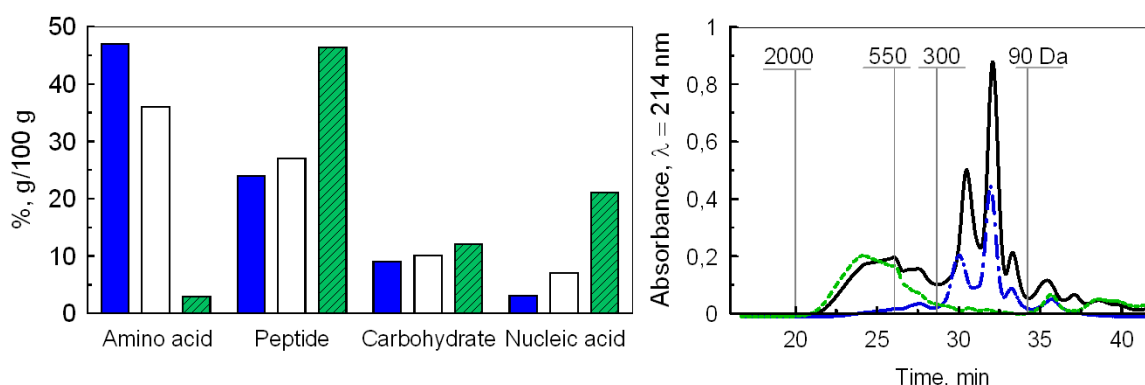


Figure 2. (A) Characterization of the biomolecules composition of the YE (□), nanofiltrated fractions permeate (■) and retentate (■). (B) Normalized chromatograms (same fraction masses) of the YE (—) and nanofiltrated fractions permeate (---) and retentate (···).

The reference medium exhibited concentrations of amino acids, glucose and minerals of 1.59 g/L (including 0.88 g/L of glutamine), 2.8 g/L and 8.62 g/L respectively. In terms of mass balance, an addition of YE at 1 g/L in reference medium increased amino acid, glucose and minerals contents by 54 %, 0.7 % and 1.7 % respectively. The enrichment rate of amino acids was calculated without taking into account glutamine, because YE total amino acids only contained 0.8 % of glutamine (data not shown). Eventually, the addition of YE at 1 g/L only increased significantly the content in vitamins B2, B6 and B8 (Table 1). This characterization underlined that some YE molecules were already present in reference medium (amino acids, vitamins, glucose, nucleobases and minerals), while others were not (peptides, polysaccharides, trehalose and nucleic acids). Therefore, it would be interesting to evaluate if YE addition improved reference media formulation

either by modifying the proportion of its molecules, or by supplying new compounds. Obviously, YE molecules contained in media formulation were mainly low molecular weight molecules. Therefore, to identify the molecules involved in YE cell culture improvement and to further characterize their action, YE molecules were fractionated on the basis of their molecular weight. A tangential nanofiltration was chosen because it allows good separation selectivity toward molecules under 500 Da. Moreover, nanofiltration is easily scalable and enough productive to get sufficient quantity of fractions for cell culture assays in Erlenmeyer flasks.

Table 1. Comparison of vitamin concentration contained in 1 g/L YE and reference medium, and molecular weight of vitamins.

Vitamins	Concentrations (mg/L)		Molecular weight (g/mol)
	Reference medium	1 g/L EXL	
B1 : Thiamin	1.93	0.11	337
B2 : Riboflavin	0.20	0.13	376
B5 : Calcium Panthothenate	2.01	0.08	219
B6 : Pyridoxin	0.03	1.76	169
B8 : Biotin	0.01	0.50	244
B9 : Folic acid	2.38	0.01	442
B12: Cyanocobamine	1.53	0.17	1579

Supplementation of YE nanofiltrated fractions in recombinant CHO cell culture

YE fractionation by tangential nanofiltration process

YE was fractionated by tangential nanofiltration process with diafiltration against distilled water. The best separation selectivity was assumed to be reached when no (or very few) molecules passed through the membrane in diafiltration mode. Therefore, the conductivity and dry matter were followed in permeate compartment in the course of the process. The permeate conductivity after the batch concentration step was 1.8 mS/cm. This value dropped down to 0.3 mS/cm after 7 diavolumes and remained stable afterward. After 7 diavolumes, 69 % of the starting dry matter passed through the membrane. This value did not significantly rise after 8 diavolumes. So, it was concluded that 8 diafiltrations were required to reach the maximum selectivity. The process balance revealed that retentate molecules represented only 26 % of total YE nanofiltrated, while 70 % passed through the membrane and 4 % were lost (probably adsorbed at the membrane surface). Therefore, the majority of YE molecules exhibited a molecular weight under 300 to 500 Da. This range is rather large, because the selectivity in nanofiltration is not only based on molecules size, but also on their charges²⁴.

Impact of the nanofiltration on biomolecule compositions

The composition in amino acids, peptides, carbohydrates and nucleic acids of the permeate and the retentate was analysed (Figure 2-A). As expected, the amino acids were almost fully recovered in the permeate (94 % of the initial amount). The permeate dry matter was thus composed of 47 % of amino acids. Beside this, 66 % of total YE peptides passed through the membrane, leading to a proportion of peptides in permeate and retentate of 24 % and 47 % respectively. The peptide fraction in the retentate exhibited a size range between 300 and 2000 Da (Figure 2-B). The peptides from permeate mainly exhibited a molecular weight under 300 Da and also a very slight proportion of peptides ranging from 300 to 550 Da. As a matter of fact, permeate contained the YE di and tri-peptides, while retentate contained the oligopeptides (Figure 2-B).

Overall carbohydrate composition in the fractions was similar to the YE (around 10 %). However, further analysis showed that permeate carbohydrates were composed of 66 % of trehalose and 34 % of monosaccharide, indicating that all YE monosaccharides were isolated in this fraction, while only 63 % of YE trehalose crossed the membrane. As a result, retentate contained mainly polysaccharides and few trehalose. Eventually, 30 % from total nucleic acids passed through the membrane leading to a low level of nucleic acids in permeate (down to 3 % w/w). The retentate was composed of 21 % of nucleic acids (66 % higher than YE composition). The total nucleic acids in permeate was likely nucleotides, nucleosides or nucleobases considering their molecular weight and negative charge. By contrast, the oligomeric nucleic acids must have been concentrated in the retentate. Consequently, it can be assumed that the quantity of nucleotides precursors added in 1 g/L of YE accounted for approximately 21 mg/L, while the reference medium contained 7.8 mg/L of coenzymes and nucleotide precursors. The content of vitamins in both fractions was not measured. However, considering their molecular weight, they were assumed to be recovered in permeate fraction (Table 1).

Taking as a whole, nanofiltration process separated the oligo- or polymeric biomolecules of YE in retentate, while lower size molecules (roughly under 500 Da) were in the permeate. Consequently, permeate contained molecules already present in reference medium formulation, plus di-tri peptides and trehalose, while retentate contained molecules lacking in the reference medium.

Effect of nanofiltrated fractions on maximal CHO cell and IgG concentrations

Retentate and permeate effect on $X_{\max}$ were studied at 0.5, 1, 2 and 4 g/L (Figure 1-A). In any cases, they improved CHO cell growth by comparison with reference medium. Cultures supplemented with 0.5, 1 and 2 g/L of permeate reached similar $X_{\max}$ than cultures supplemented with YE. However, the culture supplemented with 4 g/L of permeate reached a lower $X_{\max}$ by increasing it only up to 43 % compared to reference culture, while YE increased it up to 67 %. The addition of permeate at 4 g/L increased total level of free amino acids in culture medium up to 285 %. Therefore, as already reported²⁵, a less efficient energetic metabolism induced by amino acid overloading may have decrease permeate benefit on cell growth. By contrast, cultures supplemented with retentate approximately increased $X_{\max}$ up to 20 % compared to reference culture, which is significantly lower than what was observed with YE or permeate.

The influence of the addition of 1 and 4 g/L of nanofiltrated fractions in reference medium was then assessed on $IgG_{\max}$ (Figure 1-B). The $IgG_{\max}$ of cultures supplemented with 1 g/L of fractions was decreased by 14 % compared to reference culture as observed with YE addition. Alternatively, $IgG_{\max}$ was increased up to 60 % in culture supplemented with 4 g/L of permeate compared to reference culture, as observed with YE addition. However, the retentate added at 4 g/L still exhibited no significant effect on $IgG_{\max}$. These preliminary results underlined that key molecules present in YE were isolated in the permeate.

Influence of YE, fractions and reconstituted biomolécule mixtures on the kinetics of CHO cells cultures

The effect of YE and fractions on CHO cells kinetic parameters such as viability, specific growth rate, specific production rate, and metabolism was investigated in order to better understand the impact of the YE biomolecules. An additional concentration of 4 g/L of YE or fractions was used to enhance IgG production.

Cell growth, death and IgG production

CHO cells cultivated in Erlenmeyer flask without supplementation, and with 4 g/L of YE or permeate, reached $X_{\max}$ after approximately 120 h of culture, while cells cultivated with 4 g/L of retentate reached it after only 85 h (Figure 3-A). Therefore, retentate promoted a faster cell growth despite it slightly improved $X_{\max}$ compared to reference culture. Indeed, the maximal cell growth rate ($\mu_{\max}$) increased from 0.04 h⁻¹ in reference culture to 0.06 h⁻¹

in retentate supplemented culture (Figure 4-A). By contrast, YE and permeate did not increase $\mu_{\max}$, but sustained it a longer time than in reference culture. Furthermore, for each supplemented culture, dead cells appeared after 90 h while in reference culture they were only detected after 140 h (Figure 3-B). Therefore, the benefits of YE or fractions on cell growth promotion were not due to anti-apoptotic agents that would have prevented cells from death. Alternatively, for each culture, IgG accumulation was linked to cell growth and $\text{IgG}_{\max}$ was concomitant with $X_{\max}$ (Figure 3-C). YE and permeate supplementation just led to a slight specific production rate improvement (Figure 4-B). Accordingly, their promoting effect on IgG protein production mainly resulted from $X_{\max}$ increase.

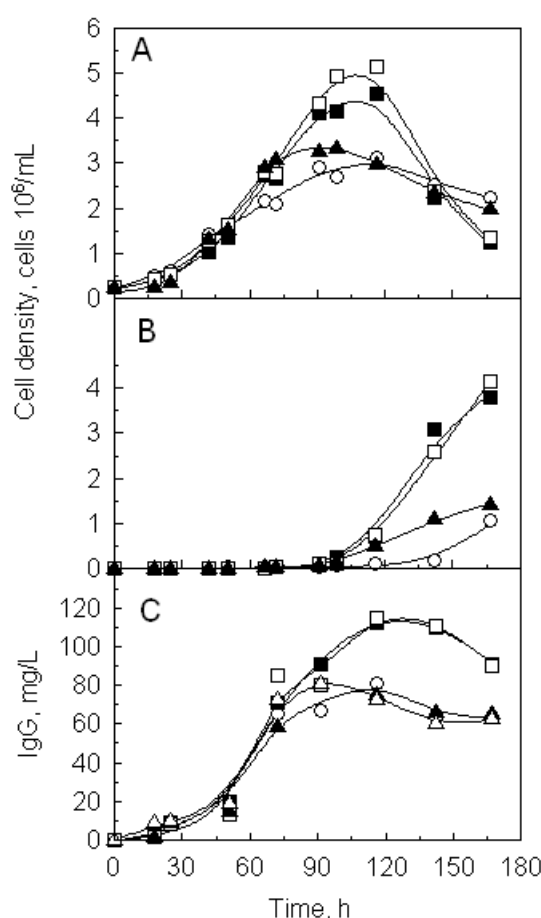


Figure 3. Kinetics of (A) viable cells, (B) trypan-blue dead cells and (C) IgG1 anti-RhD concentration of CHO-AMW cells cultivated in Erlenmeyer flasks. Cultures performed without supplementation (○), with 4 g/L of YE (□), with 4 g/L of permeate (■) or with 4 g/L of retentate (▲).

In literature, most of the studies showed that the addition of YE or plant derived hydrolysates in media did not increase $\mu_{\max}$ of CHO cells^{4,7,8}. Nevertheless, it was suggested that the addition of longer peptides provided by hydrolysates could act as exogenous growth factor such as mitogen and/or viability factor²⁶. Interestingly, in the

present study, only the retentate containing larger peptides improved $\mu_{\max}$, suggesting the isolation of peptides acting as growth factor. On the other hand, the limitation of vitamins in cultures was strongly suspected to decrease cell growth rate in CHO cell cultures²⁷. Accordingly, the cell growth rate decrease observed after 30 hours in reference culture could have be due to vitamin limitation (Figure 4-A). YE vitamins content was isolated in permeate fraction. It can be thus hypothesized that vitamin addition through permeate supplementation could be linked with the extension of the cell growth phase. Nevertheless, the addition of vitamin alone was not shown to significantly improve $X_{\max}$ ⁵.

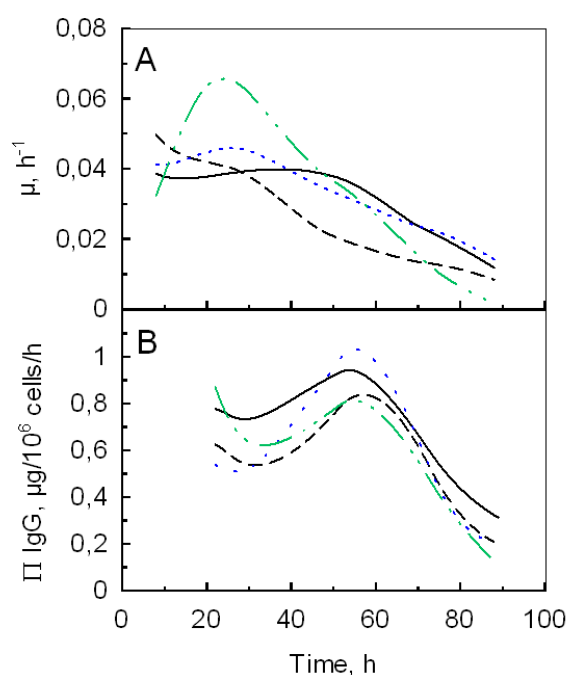


Figure 4. (A) Specific growth rate (μ) and (B) specific production rate of IgG (π_{IgG}) of CHO-AMW cells cultivated in Erlenmeyer flasks. Cultures performed without supplementation (---), with 4 g/L of YE (—), with 4 g/L of permeate (- - -) or with 4 g/L of retentate (— · —).

Hence, the limitation of reference medium in main substrates was investigated. Indeed, permeate added at 4 g/L increased monosaccharides and trehalose contents by 4.4 % and 8.5 % (w/w) respectively compared to glucose from reference medium. Moreover, it increased free amino acids by 284 % compared to total amino acids (except glutamine) from reference medium. Although glutamine is known to be the main nitrogenous substrate in cell culture, other amino acids might be used⁵. Therefore, the supplementation of a proportion of trehalose or amino acids equivalent to those provided by 4 g/L and 1 g/L of permeate respectively was assessed on cells cultivated in reference medium (Figure

5). The results highlighted that these molecules did not provide any benefits on cell growth. Consequently, amino acids and carbohydrates contents were not identified as key components in YE mixture. To further understand the benefits of YE and fractions on cell culture, their impact on energetic metabolism was then studied.

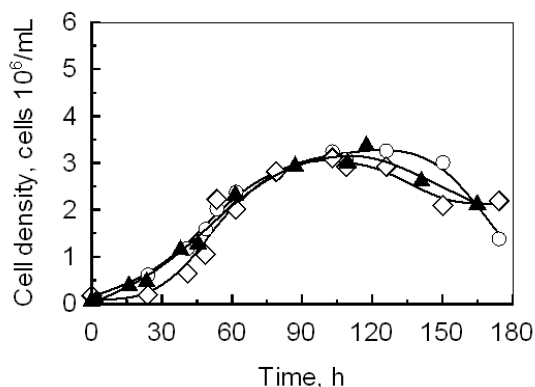


Figure 5. Kinetics of viable CHO-AMW cells cultivated in Erlenmeyer flasks. Cultures performed without supplementation (○), with the equivalent of the free amino acids contained in 1 g/L of permeate (□) or with the equivalent of trehalose contained in 4 g/L of YE (▲).

Energetic metabolism

For YE and permeate supplemented cultures, glucose was totally depleted after 100 h, while it was depleted after 130 h in reference and retentate cultures (Figure 6-A). The glucose depletion in YE and permeate supplemented cultures was concomitant with cell death beginning. Alternatively, after 70 h of culture, lactate accumulated up to 19.0, 18.0, 18.0 and 15.5 mM in reference, YE, permeate and retentate supplemented cultures respectively (Figure 6-C). A lactate concentration under 20 mM was not described as inhibitory for CHO cell growth²⁸, suggesting that it did not trigger cell growth rate decrease in reference culture. On the other hand, as lactate production was slightly decreased in supplemented cultures, it could be suggested that hydrolysate promoted the entry of pyruvate in TCA cycle instead of its conversion to lactate as reported with a meat peptone¹⁵. Indeed, during the first 50 h, a high yield of lactate produced by glucose consumed ($Y_{Lac/glc}$) of approximately 1.9 mol/mol was observed whatever the culture (Table 2). Consequently, about 90 % of the glucose flow was directed toward lactate production instead of integrating the TCA cycle. This phase of culture was effectively linked with a low yield of cells produced by glucose consumed ($Y_{cells/glc}$) of approximately $0.15 \cdot 10^6$ cells/mol (Table 2). Afterwards, the lactate production rate decreased faster than

the glucose consumption rate, resulting in lower $Y_{Lac/Glc}$, whatever the culture conditions. However, $Y_{cells/glc}$ increased to $0.35 \cdot 10^6$ cells/mol in reference culture and to $0.50 \cdot 10^6$ cells/mol in supplemented cultures. Consequently, YE and fractions increased cell production when metabolism shifted from fermentative to oxidative pathway.

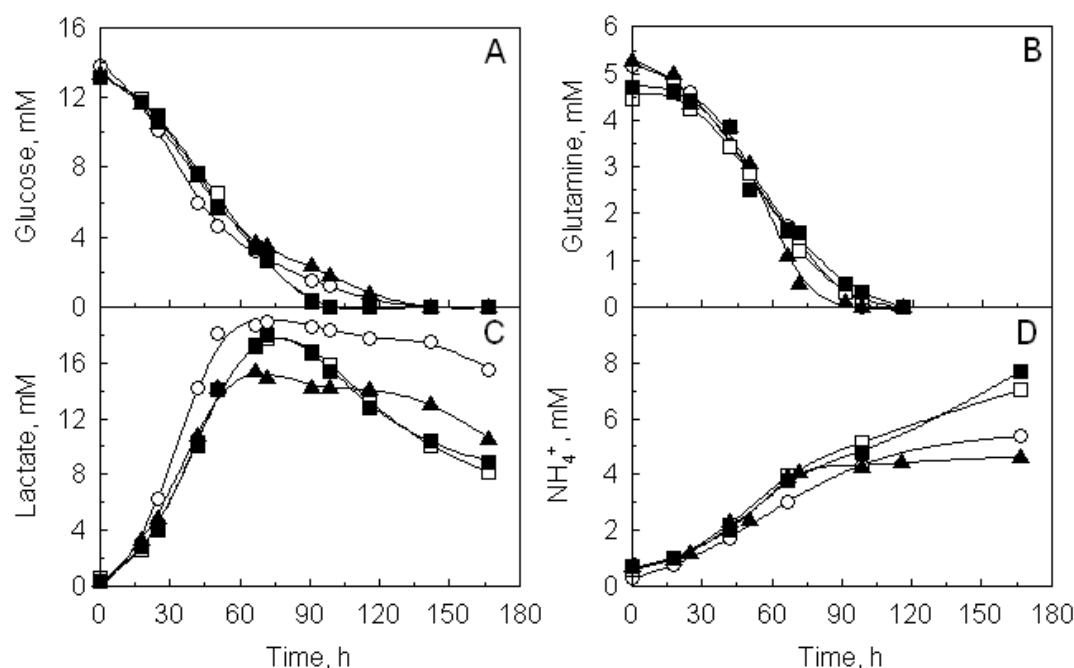


Figure 6. Kinetics of substrate consumption, (A) glucose and (B) glutamine, as well as metabolite production, (C) lactate and (D) ammonia, of CHO-AMW cells cultivated in Erlenmeyer flask. Cultures performed without supplementation ($\circ$), with 4 g/L YE ($\square$), with 4 g/L of permeate ($\blacksquare$) or with 4 g/L of retentate ($\blacktriangle$).

All cultures conditions exhibited similar kinetics of glutamine consumption until 45 h of culture (Figure 6-B). Afterwards, retentate molecules accelerated glutamine consumption leading to its depletion after 90 h, while in other cultures it was depleted after 110 h approximately. The glutamine depletion was correlated to cell death in retentate and reference cultures, while in permeate and YE supplemented cultures, glucose was first exhausted. At the end of the cell growth, ammonia concentration accumulated up to 4.3 mM in reference and retentate supplemented cultures and up to 5.3 mM in YE and permeate supplemented cultures. In fact, the yield of ammonia produced by glutamine consumed ($Y_{NH_4/gln}$) was slightly increased by YE and permeate supplementation from 0.8 to 0.9 mol/mol compared to reference culture, while retentate decreased it to 0.7 mol/mol (Table 2). However, $Y_{NH_4/gln}$ increased in YE and permeate supplemented cultures was not linked with a less efficient glutamine metabolism. Indeed, the calculation of the yield of cells produced by glutamine consumed ($Y_{cells/gln}$) underlined that YE or permeate addition

increased glutamine efficiency to produce cells from approximately $0.6 \cdot 10^6$ cells/mol, in reference and retentate supplemented culture, to $0.9 \cdot 10^6$ cells/mol (Table 2). Furthermore, when residual glutamine was above 1 mM, $Y_{\text{cells/gln}}$ was even increased up to $2 \cdot 10^6$ cells/mol in YE and permeate supplemented cultures.

Consequently, the results pointed out the presence of other nitrogenous substrates than glutamine in permeate and YE. However, it was shown that amino acids supplementation was not linked with cell growth improvement. Therefore, the results strongly suggested that di to tri-peptides from permeate (accounted for 960 mg/L) were an efficient nitrogenous sources to support cell growth as already reported²⁹ (Wilkins, J., Shiratori, M.K., and Breece, T., United States patent US 2009-0143248, 2009). Interestingly, it was effectively shown in kidney brush border membrane that the uptake of di and tri-peptides by specific transporters could represent an energetically more efficient mechanism than the uptake of free amino acids³⁰. On the other hand, our results underlined that despite retentate contained a high proportion of longer peptides (above 300 Da), they were not used as nitrogenous substrates. However, the study of energetic metabolism showed that retentate molecules improved glucose metabolism through oxidative pathway. Interestingly, a previous study performed with chromatographic YE fractionation, highlighted that retentate supplementation effect on CHO cell growth was due to cationic peptides²². These peptides were suggested to improve CHO cell growth by facilitating the nutrient transfer inside the cells. Consequently, the increase of nutriment uptake supplying TCA cycle could effectively explain the improvement of oxidative metabolism, as suggested by supplying copper³².

Table 2. Metabolic yields of CHO cell cultivated in reference medium or with the addition of 4 g/L of YE or nanofiltrated fractions.

		Reference	YE	Fraction permeate	Fraction retentate
$Y_{\text{cell/glc}}$ (cell/pmol)	0-50 h	0.15	0.15	0.15	0.15
	50- 90 h	0.35	0.50	0.50	0.50
$Y_{\text{lac/glc}}$ (mM/mM)	0-50 h	1.9	1.9	1.9	1.9
$Y_{\text{cell/gln}}$ (cell/pmol)	0-70 h	0.50	0.9	0.8	0.6
	70-90 h	0.50	2.0	2.0	0.6
$Y_{\text{NH}_4^+/\text{gln}}$ (mM/mM)	0-90 h	0.9	0.9	0.9	0.7

Conclusion

The addition YE at 4 g/L improved maximal concentrations of viable CHO cell and IgG production by 76 % and 60 % respectively compared to reference culture. A nanofiltration process has allowed refining YE by removing macromolecules that accounted up to 24 % (w/w). Hence, the use of permeate, that was depleted in oligomeric nucleic acids, to supplement mammalian cell culture media instead of YE can simplify downstream processing of recombinant protein^{3,10}. Furthermore, di and tri-peptides from permeate were shown to be used as efficient nitrogenous substrates as pointed out by a recent pattern (Wilkins, J., Shiratori, M.K., and Breece, T., United States patent US 2009-0143248, 2009). On the other hand, the retentate, composed of molecules different from those present in reference medium, significantly increased cell growth rate, while no action on cell death was shown. The study of energetic metabolism showed that retentate molecules improved glucose metabolism through oxidative pathway, but did not provide nitrogenous substrate despite its high peptide content. Furthermore, the retentate activity on CHO cell growth was shown to be due to cationic peptides that were suggested to facilitate the nutrient transfer inside the cells²². Consequently, the retentate probably contains some peptides that promoted cell growth by increasing nutriment uptake leading to the improvement of cell energetic metabolism. Finally, extensive study of di and tri-peptide mechanism of action on cells would be interesting to better understand mammalian cell culture requirement and to develop new chemically defined media.

References

1. **Wurm, F.M.:** Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells, *Nat. Biotech.*, **22**, 1393-1398 (2004).
2. **Grillberger, L., Kreil, T.R., Nasr, S., and Reiter, M.:** Emerging trends in plasma-free manufacturing of recombinant protein therapeutics expressed in mammalian cells. *Biotechnol. J.*, **4**, 186-201 (2009).
3. **Sahoo, N., Choudhury, K., and Manchikanti, P.:** Manufacturing of biodrugs: need for harmonization in regulatory standards, *BioDrug*, **23**, 217-229 (2009).
4. **Burteau, C.C., Verhoeve, F.R., Mols, J.F., Ballez, J.S., Agathos, S.N., and Schneider, Y.J.:** 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 (2003).
5. **Kim, D.Y., Lee, J.C., Chang, H.N., and Oh, D.J.:** Development of serum-free media for a recombinant CHO cell line producing recombinant antibody, *Enzyme Microb. Technol.*, **39**, 426-433 (2006).
6. **Farges, B., Chenu, S., Marc, A., and Goergen, J.L.:** Kinetics of IFN- γ producing CHO cells and other industrially relevant cell lines in rapeseed-supplemented batch cultures, *Process Biochem.*, **43**,

945-953 (2008).

7. **Sung, Y.H., Lim, S.W., Chung, J.Y., and Lee G.M.:** 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**, 527-536 (2004).
8. **Kim, S.H., and Lee, G.M.:** 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 (2009).
9. **Sommer, R.:** Yeast extracts: production, properties and components, p. 181-183. In Australian institute of food science and technology (ed.), *International Symposium on yeasts n°9*, Australia Food, Australia (1998).
10. **Dick, L.W., Kakaley, J.A., Mahon, D., Qiu, D., and Cheng, K.C.:** Investigation of proteins and peptides from yeastolate and subsequent impurity testing of drug product, *Biotechnol. Progr.*, **25**, 570-577 (2009).
11. **Farges-Haddani, B., Tessier, B., Chenu, S., Chevalot, I., Harscoat, C., Marc, I., Goergen, J.L., and Marc, A.:** Peptide fractions of rapeseed hydrolysates as an alternative to animal proteins in CHO cell culture media, *Process Biochem.*, **41**, 2297-2304 (2006).
12. **Chun, B.H., Kim, J.H., Lee, H.J. and Chung, N.:** Usability of size-excluded fractions of soy protein hydrolysates for growth and viability of Chinese hamster ovary cells in protein-free suspension culture, *Bioresour. Technol.*, **98**, 1000–1005 (2007).
13. **Franěk, F., Hohenwarter, O., and Katinger, H.:** Plant protein hydrolysates: preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures, *Biotechnol. Progr.*, **16**, 688-692 (2000).
14. **Franěk, F.:** Gluten of spelt wheat (*Triticum aestivum* subspecies *spelta*) as a source of peptides promoting viability and product yield of mouse hybridoma cell cultures. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4097-4100 (2004).
15. **Bonarius, H.P., Hatzimanikatis, V., Meeseters, K.P., de Gooijer, C.D., Schmid, G., and Tramper, J.:** Metabolic flux analysis of hybridoma cells in different culture media using mass balances, *Biotechnol. Bioeng.*, **50**, 299-318 (1996).
16. **Franěk, F., and Katinger, H.:** Specific Effects of Synthetic Oligopeptides on Cultured Animal Cells. *Biotechnol. Progr.*, **18**, 155–158 (2002).
17. **Franěk, F., Eckschlager, T., and Katinger, H.:** Enhancement of monoclonal antibody production by lysine-containing peptides. *Biotechnol. Progr.*, **19**, 169–174 (2003).
18. **Franěk, F., and Fussenegger, M.:** Survival factor-like activity of small peptides in hybridoma and CHO cells cultures, *Biotechnol. Progr.*, **21**, 96-98 (2005).
19. **Heidemann, R., Zhang, C., Qi, H., Larrick Rule, J., Rozales, C., Park, S., Chuppa, S., Ray, M., Michaels, J., Konstantinov, and K., Naveh, D.:** 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 (2000).
20. **Nyberg, G.B., Balcarcel, R.R., Follstad, B.D., Stephanopoulos, G., and Wang, D.I.:** Metabolism of peptide amino acids by Chinese hamster ovary cells grown in a complex medium, *Biotechnol. Bioeng.*, **62**, 324-335 (1999).
21. **Schneider, Y.J.:** Optimisation of hybridoma cell growth and monoclonal antibody secretion in a chemically defined, serum- and protein-free culture medium, *J. Immunol. Methods*, **116**, 65-77 (1989).
22. **Mosser, M., Kapel, R., Aymes, A., Bonnano, L.M., Olmos, E., Chevalot, I., Marc, I., and Marc, A.:** Chromatographic fractionation of yeast extract: a strategy to identify physicochemical properties of compounds promoting CHO cell culture, *Process Biochem.*, **47**, 1178–1185 (2012).
23. **Shen, C.F., Kiyota, T., Jardin, B., Konishi, Y., and Kamen, A.:** Characterization of yeastolate

- fractions that promote insect cell growth and recombinant protein production. *Cytotechnology*, **54**, 25-34 (2007).
24. **Martin-Orue, C., Bouhallab, S., and Garem, A.:** Nanofiltration of amino acid and peptide solutions: mechanisms of separation, *J. Memb. Sci.*, **142**, 225-233 (1998).
 25. **Xing, Z., Kenty, B., Koyrakh, I., Borys, M., Pan, S.H., and Jian, Z.:** Optimizing amino acid composition of CHO cell culture media for a fusion protein production. *Process Biochem.*, **46**, 1423-1429 (2011).
 26. **Siemensma, A., Babcock, J., Wilcox, C. and Huttinga, H.:** Toward an understanding of how protein hydrolysates stimulate more efficient biosynthesis in cultured cells, p. 49-51. In Pasupuleti, V.K., and Demain, A.L. (ed.), *Protein Hydrolysates in Biotechnology*, Springer, Netherlands (2010).
 27. **Kurano, S., Kurano, N., Leist, C., and Fiechter, A.:** Utilization and stability of vitamins in serum-containing and serum-free media in CHO cell culture. *Cytotechnology*, **4**, 243-250 (1990).
 28. **Lao, M.S., and Toth, D.:** Effects of Ammonium and Lactate on Growth and Metabolism of a Recombinant Chinese Hamster Ovary Cell Culture, *Biotechnol. Progr.*, **13**, 688-691 (1997).
 29. **Christie, A., and Butler, M.:** Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase, *J. Biotechnol.*, **37**, 277-290 (1994).
 30. **Daniel, H., Morse, E.L., and Adibi, S.A.:** Determinants of substrate affinity for the oligopeptide/H⁺ symporter in the renal brush border membrane. *J. Biol. Chem.*, **267**, 9565-9573 (1992).
 31. **Luo, J., Vijayasankaran, N., Autsen, J., Santuray, R., Hudson, T., Aanullah, A., and Li, F.:** Comparative metabolite analysis to understand lactate metabolism shift in Chinese hamster ovary cell culture process, *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 146-156 (2012).
-

2.3- Principales contributions du manuscrit

Le fractionnement de l'EXL par un procédé de nanofiltration membranaire a abouti à l'isolation sélective de molécules de hauts et faibles PM respectivement dans les compartiments rétentat et perméat. Le perméat contient les molécules déjà présentes dans la formulation du milieu de référence (acides aminés, vitamines, glucose, minéraux), mais également du tréhalose et des di et tri-peptides. Finalement, le rétentat contient uniquement les molécules de l'EXL non présentes dans la formulation du milieu de référence comme les polysaccharides, acides nucléiques et peptides.

Le rétentat stimule le taux de croissance, sans prévenir la mort cellulaire. Il améliore le métabolisme énergétique des cellules en augmentant la production d'énergie via le cycle oxydatif. Par contre, il ne permet pas de remplacer la glutamine par l'apport de substrats azotés malgré son contenu important en peptides. Ainsi, le rétentat contient des molécules non nutritives qui stimulent la croissance des cellules CHO.

Le perméat présente des performances similaires à l'EXL. Il prolonge la phase de croissance, augmente la quantité de cellules viables et augmente la quantité d'IgG lorsqu'il est ajouté à 4 g/L. Le procédé de nanofiltration est donc approprié pour simplifier

la composition de l'EXL sans altérer ses performances. L'utilisation du perméat, plutôt que de l'EXL, présente l'avantage de ne pas contenir d'acides nucléiques ce qui simplifie les étapes de purification de protéines recombinantes (Dick et *al.*, 2009 ; Sahoo et *al.*, 2009). D'autre part, la reconstitution du perméat en acides aminés et tréhalose, a montré que ces molécules ne sont pas à l'origine des effets de cette fraction. Pourtant, l'influence du perméat sur le métabolisme énergétique met en évidence un apport de substrats azotés métabolisés par les cellules. L'effet du perméat sur la culture de cellules semble donc lié à la présence des di et tri-peptides. Un brevet a effectivement précisé l'intérêt de ces molécules pour améliorer la croissance de cellules animales (Wilkens et *al.*, 2011). Cette activité peut s'expliquer par l'existence de transporteurs spécifiques de di et tri-peptides, connus pour être moins énergivores que les transporteurs des acides aminés libres (Daniel et *al.*, 1992). Le transport des peptides via ce récepteur est indépendant de leur séquence et de leur charge. Les peptides ainsi transférés dans la cellule peuvent être alors rapidement hydrolysés par des peptidases cytosoliques pour être intégrés comme éléments nutritifs via le cycle TCA. Néanmoins, l'existence de ces transporteurs ayant été mise en évidence chez les cellules rénales, il serait nécessaire de vérifier leur expression dans les cellules CHO pour valider le mode d'action des di et tri-peptides.

3- Synergie des molécules de faibles et hauts poids moléculaires contenues dans l'EXL

3.1- Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons montré la possibilité de cumuler les effets de l'EXL et de la peptone P.A en les mélangeant dans le milieu de culture (Cf. partie 3.2 du chapitre 1). Une autre étude de la littérature a également mis en évidence l'intérêt d'utiliser conjointement un EXL avec une peptone de soja et/ou de blé pour améliorer les performances des hydrolysats ajoutés individuellement (Kim & Lee, 2009). Or, nos résultats, basés sur la nanofiltration de l'EXL ont souligné, non seulement, l'intérêt des di et tri-peptides contenus dans le perméat en tant qu'élément nutritifs, mais aussi, la présence dans la fraction rétentat de molécules présentant une activité spécifique sur la croissance cellulaire. Ainsi, il est envisageable, qu'en modifiant le ratio entre les molécules du perméat et du rétentat, un effet synergique puisse être observé, conduisant à une activité encore accrue de ces additifs sur la culture des cellules.

Au cours du procédé de nanofiltration, le rétentat de l'EXL s'enrichit progressivement en molécules de haut poids moléculaire. Nous proposons donc de déterminer l'influence du nombre de diafiltrations sur la composition du rétentat, puis de comparer l'activité des différents rétentat et du perméat sur la culture de cellules.

3.2- Génération de différents rétentat de nanofiltration membranaire

Le suivi du pourcentage de matière sèche du rétentat et du perméat au cours des diafiltrations successives a permis d'évaluer les quantités de matière retenues ou non par la membrane à chaque étape (Figure 61) (Cf. partie 2.1.3 du matériel et méthodes). Lors de l'étape de concentration, de la première et de la deuxième étape de diafiltration, respectivement, 25 %, 16 % et 10 % de la matière de l'EXL initiale passent à travers la membrane, soit un total de 51 % (g/ 100 g d'EXL). Puis, entre les étapes de diafiltrations 3 et 8, de moins en moins de matière traverse la membrane. En effet, le taux de rétention de la matière retenue par la membrane, initialement à 76 %, augmente au fur et à mesure des diafiltrations pour atteindre 95 % après 8 diafiltrations. Finalement, 70 % de la matière initiale de l'EXL est isolée dans le perméat après 8 diafiltrations.

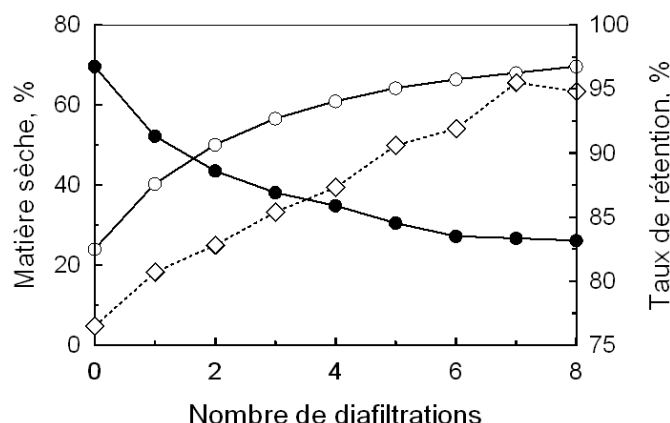


Figure 62. Evolution du pourcentage de matière sèche dans la fraction rétentat (●) et perméat (○), et du taux de rétention de la matière sèche (◇) au cours des diafiltrations.

L'influence du nombre de diafiltrations (2, 5 et 8) sur l'évolution de la composition du rétentat est présentée Figure 62. Au cours des diafiltrations, le rétentat est enrichi en peptides et en acides nucléiques et appauvri en acides aminés, alors que la quantité de glucides reste relativement constante. Après deux diafiltrations, la quantité de peptides dans le rétentat atteint 42 g/ 100 g de rétentat, ce qui correspond à une augmentation de 55 % par rapport à l'EXL (Figure 62). Cette proportion est similaire dans l'EXL diafiltré 5 ou 8 fois, avec des quantités de peptides respectives de 44 et 47 g/ 100 g de produit.

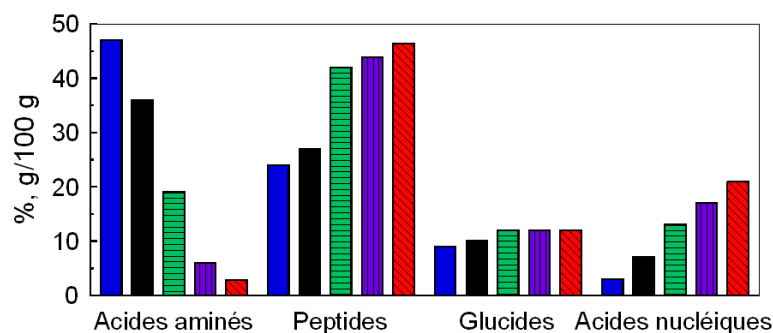


Figure 63. Evolution de la composition en biomolécules de l'EXL (■), et dans le rétentat au cours d'un procédé de nanofiltration avec 2 (■), 5 (■) et 8 (■) diafiltrations et du perméat (■).

La Figure 63 présente plus spécifiquement les profils de poids moléculaires des peptides des différentes fractions. L'appauvrissement de la fraction peptidique correspondant à des poids moléculaire compris entre 300 et 90 Da est clairement observé au cours des

diafiltrations. En particulier, le rétentat diafiltré seulement deux fois comprend un mélange de peptides de faibles et de plus hauts PM, alors que le rétentat diafiltré 8 fois contient essentiellement des peptides de plus hauts PM.

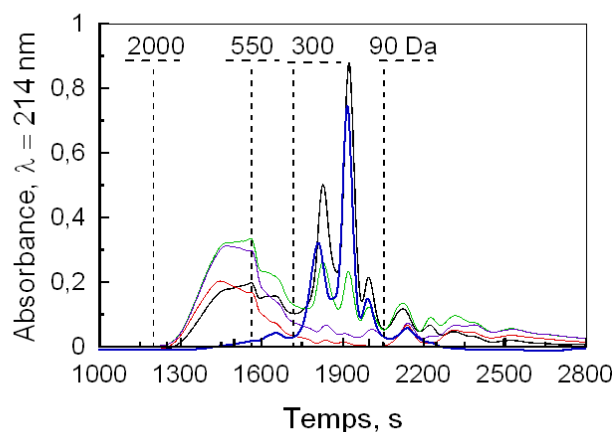


Figure 64. Profils de poids moléculaire des peptides de l'EXL (—) et des fractions perméat (—), rétentat diafiltré 2 (—), 5 (—) et 8 (—) fois établis en superdex peptides.

Ainsi, même si la fraction du rétentat diafiltré 2 fois contient une quantité de peptides proche du rétentat diafiltré 8 fois, ces peptides présentent une répartition de taille différente. En effet, le rétentat après 2 diafiltrations contient encore des di et tri-peptides qui se sont avérés l'origine de l'effet positif de la fraction perméat. Ce rétentat a alors été sélectionné pour comparer l'impact des profils de taille des peptides pour expliquer l'effet promoteur de l'EXL entier sur les performances des cultures.

3.3- Influence du rétentat de nanofiltration obtenu après deux diafiltrations

Le rétentat de nanofiltration diafiltré deux fois a été ajouté à une concentration de 1, 2 et 4 g/L dans le milieu de référence BDM de cellules CHO cultivées en fiole d'Erlenmeyer en mode discontinu (Figure 64). L'influence de la concentration de ce rétentat sur les concentrations maximales de cellules viables ($X_{\max}$) et d'anticorps recombinant ($IgG_{\max}$) a été comparée à celles de l'EXL, du perméat et du rétentat diafiltré 8 fois.

Les cellules cultivées dans le milieu de référence ou en présence de 1, 2 et 4 g/L de rétentat diafiltré 2 fois, atteignent des $X_{\max}$ respectifs de 3,0 ; 3,9 ; 4,8 et 5,8 x 10⁶ cellules/mL. La croissance cellulaire semble donc directement liée à la quantité de rétentat diafiltré 2 fois ajoutée dans le milieu de référence. Ces résultats sont cohérents avec l'effet

observé préalablement lors de l'ajout d'EXL ou de perméat (Figure 1 de la publication du chapitre 2). En effet, nous avons montré que la densité cellulaire augmentait proportionnellement à l'augmentation de 0,5 g/L à 1 g/L d'EXL et de perméat. Le rétentat diafiltré 2 fois, étant partiellement déplété en petites molécules, doit donc être apporté en plus forte concentration pour répondre aux besoins des cellules. De plus, il est intéressant de constater que le rétentat diafiltré deux fois permet d'obtenir une quantité maximale de cellules 15 % supérieure de celles obtenues en présence de perméat ou de l'EXL. Ainsi, bien que les molécules du rétentat diafiltré 8 fois n'ont qu'un faible effet sur la concentration maximale de cellules viables, leur présence dans le rétentat diafiltré 2 fois semble avoir un effet bénéfique sur la croissance.

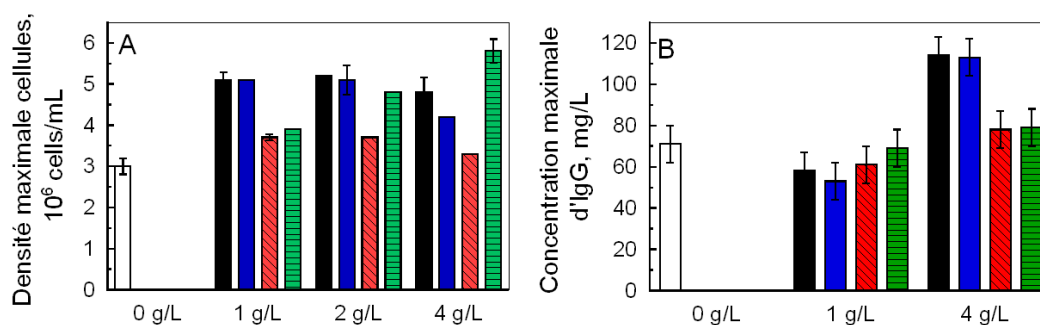


Figure 65. Influence de la concentration d'EXL (■), du rétentat diafiltré deux (▨) et huit fois (▨) et du perméat (■) ajoutés dans le milieu de culture de référence (□) sur les concentrations maximales (A) de cellules viables et (B) d'anticorps recombinants.

Ces résultats ont été confirmés par une étude cinétique plus détaillée qui montre bien l'intérêt de la double diafiltration du rétentat par rapport au perméat ou à l'EXL (Figure 65). Le calcul de l'intégrale des cellules viables (ICV) met en évidence un effet encore plus significatif sur la croissance cellulaire induite par l'ajout de 4 g/L de rétentat diafiltré 2 fois. En effet, l'ICV augmente de 50 % par rapport au milieu de référence, soit 25 % de plus qu'en présence de l'EXL (Tableau 24). Ainsi, nous avons montré qu'il était possible d'améliorer les effets de l'EXL sur la croissance cellulaire en contrôlant le ratio de molécules de faible et haut poids moléculaire dans le rétentat. De plus, ces résultats confirment la présence de molécules actives à la fois dans le rétentat et dans le perméat.

Enfin, la concentration maximale en IgG a été mesurée dans la culture de référence et dans les cultures complémentées par 1 et 4 g/L d'EXL et de fractions (Figure 64-B). Le rétentat diafiltré deux fois, tout comme le rétentat diafiltré 8 fois, ne permet aucune augmentation

de la concentration maximale d'IgG par rapport au milieu de référence. De plus, une concentration de 4 g/L d'EXL ou de perméat est nécessaire pour améliorer la concentration maximale d'IgG. Ce résultat confirme l'implication des molécules de petites tailles sur la production d'anticorps. Une autre étude a également mis en évidence la nécessité d'ajouter l'EXL à des concentrations comprises entre 5 et 10 g/L pour obtenir une production de protéine recombinante optimale par des cellules CHO (Sung et *al.*, 2004). D'autre part, nos résultats confirment que la stimulation de la production d'IgG par l'EXL n'est pas directement corrélée à son effet promoteur sur la croissance cellulaire.

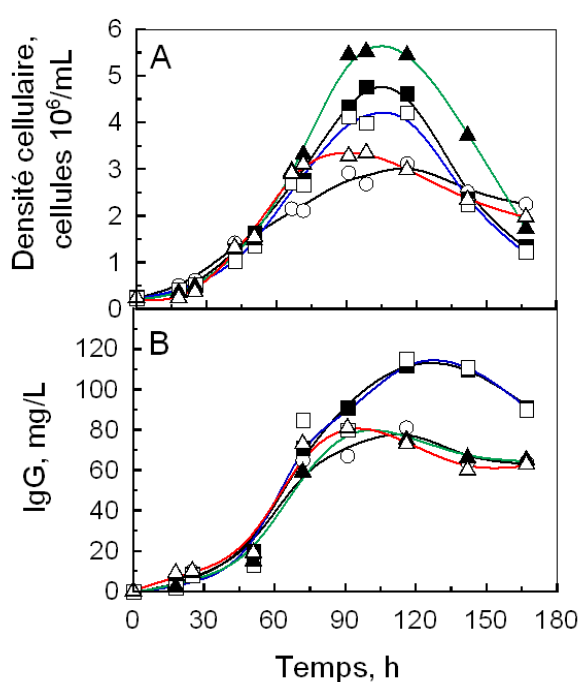


Figure 66. Influence de la supplémentation de 4 g/L d'EXL (■, —), perméat (□, —) et rétentat diafiltrés deux (▲, —) et huit fois (△, —) dans le milieu de référence (○, —) sur : (A) la cinétique des cellules CHO-AMW viables et (B) la production d'anticorps monoclonaux.

Tableau 24. Influence de 4 g/L d'EXL et de fractions issues du procédé de nanofiltration sur l'intégrale des cellules viables (ICV).

	Milieu de référence	EXL	Perméat	Rétentat diafiltré 2 fois	Rétentat diafiltré 8 fois
ICV (10^8 cellules/mLxh)	3,3	4,1	3,7	4,9	3,4

4- Conclusion du chapitre 2

A partir d'une démarche proposant, successivement, un procédé de nanofiltration adapté, la reconstitution de groupes de molécules et des analyses cinétiques de cultures, nous avons pu émettre un certain nombre d'hypothèses sur la nature et le mécanisme d'action des molécules de l'EXL sur les cellules CHO-AMW. L'approche mise en œuvre et les principaux résultats sont présentés dans la Figure 66.

Nous avons montré que l'effet positif de l'EXL entier était similaire à celui de la fraction perméat obtenue par nanofiltration membranaire. Celle-ci contient, d'une part, les molécules déjà présentes dans la formulation du milieu de référence (acides aminés, vitamines, glucose, minéraux), mais aussi du tréhalose et des di et tri-peptides. Ce procédé de fractionnement membranaire est donc attractif pour supprimer les macromolécules de l'EXL. D'autre part, après la reconstitution de mélanges de certains substrats azotés et carbonés du perméat, l'intérêt des di et tri-peptides contenus dans le perméat pour approvisionner le métabolisme central carboné a été souligné.

Par ailleurs, le rétentat qui contient quant à lui des peptides, des acides nucléiques et des polysaccharides stimule la vitesse de croissance des cellules CHO-AMW, sans augmenter leur concentration maximale. Parallèlement, il favorise la production d'énergie via le cycle oxydatif même s'il n'apporte pas de substrats azotés. Nos résultats suggèrent donc la présence dans le rétentat de molécules non nutritives qui stimulent la croissance cellulaire en améliorant le métabolisme énergétique.

Enfin, nous avons montré qu'en contrôlant mieux la répartition des molécules de faible et haut poids moléculaire au cours de la nanofiltration, il était possible d'améliorer les performances du rétentat sur la croissance des cellules. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle des molécules actives sur les cellules sont présentes à la fois dans le rétentat et dans le perméat, et, soulignent la diversité du rôle et de la nature des composés biochimiques actifs de l'EXL.

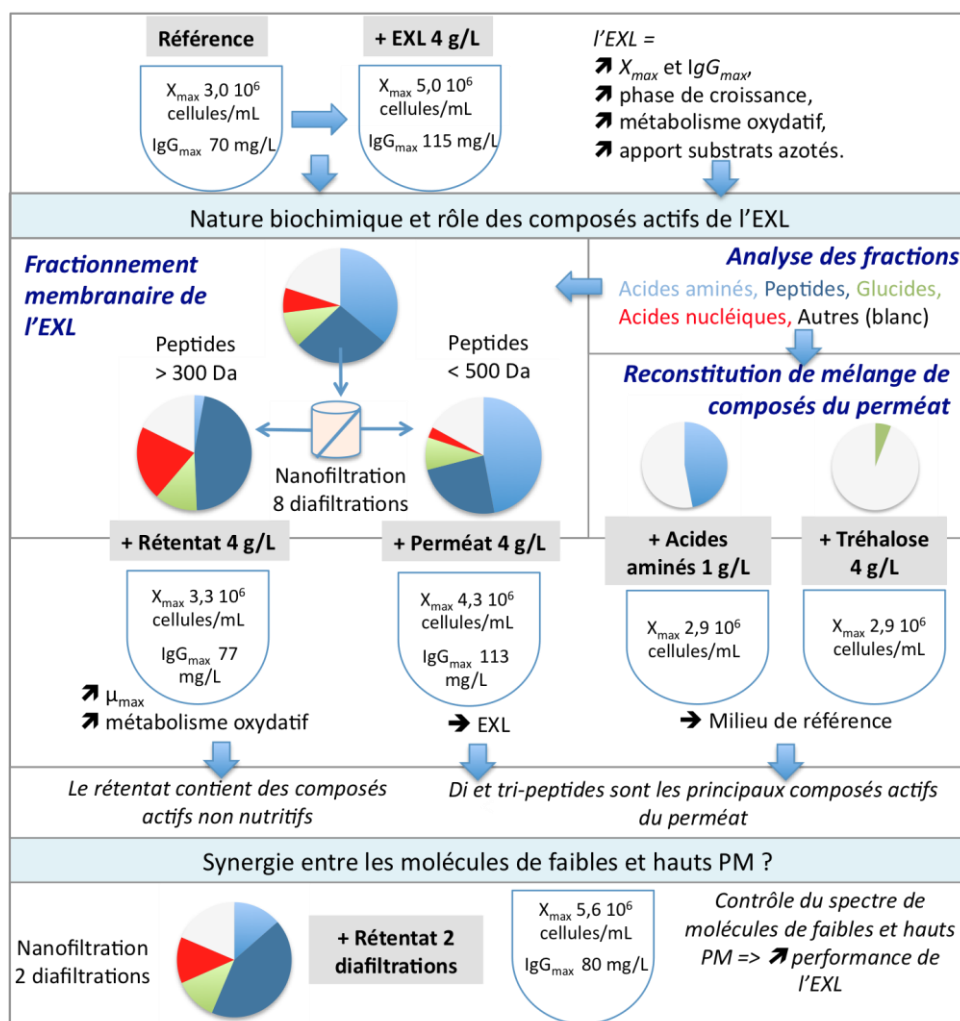


Figure 67. Synthèse des résultats du chapitre 2 (acides aminés : bleu clair; peptides: bleu foncé, glucides: vert, acides nucléiques: rouge, autres: blanc)

Chapitre 3

Fractionnnements
chromatographiques pour la
caractérisation physico-chimique des
composés actifs de l'extrait de levure

FRACTIONNEMENTS CHROMATOGRAPHIQUES POUR LA CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUES DES COMPOSES ACTIFS DE L'EXTRAIT DE LEVURE

1- INTRODUCTION.....	204
2- FRACTIONNEMENTS CHROMATOGRAPHIQUES DE L'EXTRAIT DE LEVURE: UNE STRATEGIE POUR IDENTIFIER LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES COMPOSES FAVORISANT LA CULTURE DE CELLULES CHO.....	205
2.1- INTRODUCTION.....	205
2.2- ARTICLE.....	206
2.3- RESULTATS COMPLEMENTAIRES	224
2.4- PRINCIPALES CONTRIBUTIONS DE L'ARTICLE.....	226
3- VALIDATION DE L'ACTIVITE DE LA FRACTION SELECTIONNEE EN CULTURE AGITEE	228
4- CONCLUSION DU <i>CHAPITRE 3</i>	230

1- Introduction

L'un des défis majeurs de l'utilisation des hydrolysats de protéines végétales ou d'EXL dans un procédé de production de biomolécules thérapeutiques est de pouvoir mieux caractériser et identifier leurs composés ayant un impact positif sur les performances de la culture. Dans le chapitre précédent, l'EXL a été fractionné en deux groupes de molécules grâce à un procédé de nanofiltration membranaire : un perméat et un rétentat. L'analyse des fractions et l'étude de leur activité sur la culture de cellules CHO ont permis de déterminer des classes de molécules d'intérêt. En particulier, les di et tri-peptides, contenus dans la fraction perméat, se sont avérés favoriser la concentration maximale de cellules viables. D'autre part, la présence de molécules promotrices de la croissance cellulaire a été mise en évidence dans la fraction rétentat. Cependant, les macromolécules du rétentat restent faiblement caractérisées par rapport aux molécules contenues dans le perméat qui sont principalement des monomères plus facilement identifiables. Dans cette partie, nous nous proposons donc d'améliorer la caractérisation des composés bioactifs contenus dans la fraction rétentat après nanofiltration de l'EXL.

Afin d'identifier les molécules d'intérêt dans un mélange complexe, la stratégie idéale serait de les purifier une à une, de les analyser et d'évaluer leur activité sur la culture. Néanmoins, la diversité des molécules contenues dans l'EXL et la quantité minimale de matière nécessaire pour réaliser les essais de culture rendent ce travail difficilement envisageable, comme l'atteste l'absence de travaux appliquant cette stratégie dans la littérature. De plus, d'après les résultats des chapitres précédents, l'effet positif des hydrolysats sur les cellules semble résulter de la synergie entre molécules. Par ailleurs, quelques études ont montré que la charge électrique et l'hydrophobie, en plus du poids moléculaire, étaient des critères supplémentaires potentiellement intéressants pour la sélection de molécules actives, issues de mélanges complexes. Il nous a donc semblé pertinent de mieux relier l'effet d'un hydrolysat aux propriétés physico-chimiques de ses composés. Pour ce faire, un fractionnement de l'hydrolysat par chromatographie liquide basse pression (CLBP) d'échange d'ions (EI), d'interactions hydrophobes (IH) et d'exclusion de taille (ET) paraît adéquat pour obtenir des mélanges de molécules, dont les propriétés physico-chimiques sont communes. Cette démarche devrait permettre de mieux caractériser les composés actifs et ainsi d'améliorer les connaissances concernant leur rôle dans un procédé de culture. Plus généralement, il s'agira aussi de proposer des procédés de

purification pour améliorer la qualité et simplifier les hydrolysats utilisés en culture de cellules de mammifères. Ainsi, ce chapitre propose la mise en œuvre de ces divers modes de fractionnements, en une ou plusieurs étapes, et l'étude des diverses fractions obtenues.

2- Fractionnements chromatographiques de l'extrait de levure: une stratégie pour identifier les propriétés physico-chimiques des composés favorisant la culture de cellules CHO

2.1- Introduction

Dans cette partie, les travaux ont pour objectif de mieux caractériser, grâce à des procédés de fractionnement par CLBP, l'activité de l'EXL nanofiltré (rétentat de nanofiltration) sur la croissance de cellules CHO. L'intérêt de cette démarche est, d'une part, de proposer des procédés de fractionnement adaptés à la simplification de la composition d'un hydrolysats, et, d'autre part, de caractériser les propriétés physico-chimiques des molécules impliquées dans les processus biologiques. Ces travaux ont donné lieu à un article accepté pour publication dans *Process Biochemistry*.

Dans ce contexte, les travaux de l'article proposent le fractionnement de l'EXL nanofiltré par trois procédés de chromatographie basés sur diverses propriétés physico-chimiques, telles que la charge électrique, le PM et l'hydrophobie, susceptibles de jouer un rôle pour les effets promoteurs de la croissance de cellules CHO. De plus, l'influence des procédés de fractionnement sur la répartition des biomolécules dans chacune des fractions, a été mise en évidence par l'analyse de leur composition. Dans un second temps, un procédé original de fractionnement, incluant séquentiellement trois étapes de chromatographie, a été étudié pour affiner la caractérisation des molécules actives.

Dans cette étude, l'activité des fractions a été évaluée sur la croissance de cellules CHO cultivées en microplaques. Les cellules totales ont été dénombrées par un système non invasif et automatisé, le Cellscreen®. La méthode a été adaptée afin de pouvoir discriminer l'effet de l'EXL nanofiltré (témoin positif) et des fractions par rapport au milieu chimiquement défini relativement simple, le BDM/RPMI(10/90) (témoin négatif).

2.2- Article

Chromatographic fractionation of yeast extract: a strategy to identify physicochemical properties of compounds promoting CHO cell culture

Mosser M^{1,2}, Kapel R¹, Aymes A¹, Bonanno LM², Olmos E¹, Chevalot I¹, Marc I¹, Marc A¹

¹ Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UPR-CNRS 3349, INPL-ENSAIA, 2 avenue de la forêt de Haye, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

² Bio Springer, 103 rue Jean Jaurès, 94704 Maisons-Alfort, France

Abstract

The study proposes to get a better knowledge of properties of yeast extract (YE) molecules involved in the improvement of CHO cell growth and to reduce YE complexity without losing positive effects. Various chromatographic processes were implemented for fractionation of a nanofiltrated YE (nYE). The nYE was first fractionated by one-step preparative chromatography, either with anion exchange (AEC), hydrophobic interaction (HIC) or size exclusion (SEC) methods. After analysis of its main components, each fraction was added in a control chemically defined medium to assess its impact on CHO cell growth. Results mainly underlined that AEC was the most selective separation process to purify nYE in one step without decreasing cell growth promoting effect. A three-step chromatographic process including successive AEC, HIC, and SEC was then developed to refine the properties of nYE compounds. Among fractions that triggered similar cell growth promoting effect than nYE, one also improved IgG specific production. It mainly included cationic and hydrophilic peptides with a great proportion of lysine and arginine, low quantities of polysaccharides and no nucleic acids. Thus, this study allowed us to deepen the YE contribution to animal cell culture as well as to evaluate fractionation strategies to simplify such a complex mixture.

Keywords: yeast extract, chromatographic fractionation, CHO cell growth, anion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography, size exclusion chromatography.

Introduction

Nowadays, the production of therapeutic recombinant proteins represents the fastest growing segment of the pharmaceutical industry¹. Some recombinant proteins are produced in microbial expression systems, but most of them require extensive post-translational modifications and need to be produced in mammalian expression systems². However, mammalian cells are very sensitive to culture operating conditions and often need promoting growth agents to reach appropriate cell density and recombinant protein level. Due to high cost and lot-to lot variability of bovine serum, historically added in culture medium, the development of serum substitutes has been encouraged. Interesting results were obtained with purified or recombinant proteins, such as insulin and transferrin³, with hydrolysates from animal proteins⁴, or with milk-derived products⁵. Nevertheless, the detection of prions and the potential viral or microbial contamination induced a new step for media formulations free from any compounds from animal source⁶. Hydrolysates from yeasts⁷⁻¹⁰ or plant proteins^{7,10-12} have then shown promising capacity to improve cell growth and recombinant protein productivity. Yeast extract (YE) corresponds to the water soluble fraction of molecules yielded after full yeast autolysis. It is a complex mixture mainly composed of free amino acids, peptides, carbohydrates, nucleic acids, vitamins and minerals¹³. Protein hydrolysates are, in most of cases, produced from enzymatic proteolysis and can also be considered as complex mixtures of various unknown peptides. However, such a complexity can be problematic for different phases of biological production processes such as medium feeding¹⁴, downstream process or end product release^{15,16}. Therefore, the characterization, especially via physico-chemical properties, of groups of YE compounds which impact animal cell culture, is currently a great challenge.

Due to the high number of compounds in YE or protein hydrolysates, the separation of each molecule and the evaluation of its activity on cells would be far too much time and cost consuming. Today, the only method available to better identify the active molecules is (i) to implement mixture fractionation processes, (ii) to assay the effect of the obtained fractions and (iii) to discuss on the basis of their composition. Even if this procedure can not lead to an acute identification of single molecules involved in the bioactivity, this allows the characterization of their main physico-chemical properties. This knowledge is also important to accurately choose appropriate separation process to simplify and to

improve the initial mixture. Following this strategy, authors showed that low molecular size fractions of YE⁸ or rapeseed and soy protein hydrolysates^{17,18}, obtained by membrane ultrafiltration, could replace the raw mixture without altering the cell performances. Other works confirmed the influence of the molecule size by using size exclusion chromatography (SEC), suggesting that active molecules could be short oligopeptides^{5,19,20}. In fact, several authors pointed out the key role of peptides from protein hydrolysates to improve animal cell growth²¹⁻²³. More recently, anion exchange chromatography (AEC) was used to evaluate soy peptone impact on CHO cell culture²⁰. The results pointed out the potential role of the electrical charge of molecules in animal cell growth promoting effect. However, there is still a lack of extensive study investigating the role of molecule size or electrical charge. Moreover, the influence of molecule hydrophobicity, which could also act on the molecule activity, was rarely discussed.

The aim of the present study was to better characterize the molecules of complex YE mixtures, which improve CHO cell cultures, by using various chromatographic strategies. A first step was to quantify YE influence on CHO cell growth and to analyze its main components. Then, the YE was fractionated with one-step AEC, SEC or hydrophobic interaction (HIC) preparative chromatographies. This led to fractions composed of molecules sharing a common physico-chemical property, such as molecular size, electrical charge or hydrophobicity. The fractionation impact on fraction composition and activity was discussed. Lastly, a three-step fractionation process based on three sequential chromatographies was performed. The influence of the obtained fractions was evaluated on cell growth and IgG production and interesting insights on the properties of the YE active molecules were highlighted.

Material and methods

Yeast extract preparation

The commercial yeast extract used in this study was a soluble fraction of yeast autolysis (Bio Springer, Maisons-Alfort, France). It was diafiltrated with deionized water through a nanofiltration membrane (Nanomax 50, Millipore, Bedford, MA) using a tangential filtration system (ProScale, Millipore). The transmembrane pressure was set to 6.5×10^5 Pa and the temperature was regulated at 25 °C. The YE diafiltration was monitored by measuring the conductivity in the permeate compartment, using a WTW LF96 conductivity meter. The operation was stopped when the conductivity became stable. Eight diavolumes were necessary to reach this condition. The product obtained in the retentate was called nYE and used for further studies.

Preparative chromatographic processes

Anion exchange chromatography

Anion exchange chromatography was carried out on Q Sepharose fast flow (GE Healthcare Life Science) columns equilibrated in Trizma 20 mM at pH 8 (equilibration buffer). Laboratory-scale elutions were first implemented in a 1.6 x 10 cm column in order to determine the maximal loading capacity of the column and the NaCl solution stepwise required to elute fractions containing an equivalent content of biomolecules (data not shown). These conditions were then scaled-up to a 10 x 10 cm column according to the standards²⁴, to recover sufficient amount of matter in each fraction for characterization and activity assays. 1.2 g of nYE dissolved in equilibration buffer at 20 g/L was applied onto the column and the stepwise elution program reported in Table 1 was followed. The fractions A.1, A.2 and A.3, corresponding to the elution with 0, 0.1 and 1 M NaCl respectively in the equilibration buffer, were collected, desalted, concentrated by nanofiltration and finally freeze-dried for further analyses and cell culture assays.

Hydrophobic interaction chromatography

A lab-scale column elution (1.6 x 10 cm) was first implemented in order to determine the maximal loading capacity of the column and the required ammonia sulphate solution stepwise (data not shown). These conditions were scaled-up in a 5 x 10 cm column. Thus, hydrophobic interaction chromatography was carried out by using a Phenyl Sepharose fast flow (GE Healthcare Life Science) preparative column equilibrated in phosphate 50 mM and (NH₄)₂SO₄ 3 M at pH 7.2 (equilibration buffer). 0.3 g of nYE dissolved in the equilibration buffer at 20 g/L was applied onto the column and the stepwise elution program reported in Table 1 was used. The fractions H.1 and H.2, corresponding to the elution either with equilibration buffer or with phosphate 50 mM, were collected and treated as those stemmed from AEC.

Size exclusion chromatography

Size exclusion chromatography was carried out in a Sephadex G-15 fast flow (GE Healthcare Life Science) preparative column (5 x 75 cm) equilibrated with 6 mL/min deionised water, after development of a lab-scale elution (1.6 x 75 cm column). The maximal loading capacity of the column and the harvest times to recover similar quantities of raw material were determined (data not shown). 0.45 g of nYE dissolved in equilibration buffer at 30 g/L was applied onto the column. Then, the isocratic elution program reported in Table 1 was followed and three fractions called S.1, S.2 and S.3 were collected and freeze-dried.

Table 1. Operating conditions of nYE fractionation by using three types of preparative chromatography

Separation method	Column	Eluent	Elution mode	Flow rate (mL/min)	Harvested volume	Fraction
AEC	Q Sepharose H 10 cm, Φ 10 cm	A: Trizma 20 mM, pH 8	0 - 1179 mL: 100 % A	40	394-1807 mL	A.1
		B: Trizma 20 mM + 1 M NaCl, pH 8	1572 - 2751 mL: 90 % A, 10 % B		1807-3378 mL	A.2
			2751 - 5109 mL: 100 % B		3378-4321 mL	A.3
HIC	Phenyl Sepharose H 10 cm, Φ 5 cm	A: Phosphate 50 mM, (NH ₄) ₂ SO ₄ 3 M, pH 7.2	0-590 mL: 100 % A	20	99-590 mL	H.1
		B: Phosphate 50 mM, pH 7.2	590-1080 mL: 100 % B		590-1080 mL	H.2
SEC	G-15 Sephadex H 75 cm, Φ 5 cm	Deionized water	0-850 mL: Isocratic	6	527-560 mL	S.1
					560-618 mL	S.2
					618-824 mL	S.3

Three-step chromatography process

A sequential fractionation protocol was achieved with successive AEC, HIC and SEC as described in Figure 1. Chromatographies were performed as described for one-step operating conditions (Table 1). Eighteen runs of AEC were needed to get a sufficient amount of matter for further fractionations and bioactivity assays. Ten HIC runs were necessary to fractionate each AEC-fractions. Finally, each sub fraction was fractionated by a single SEC step.

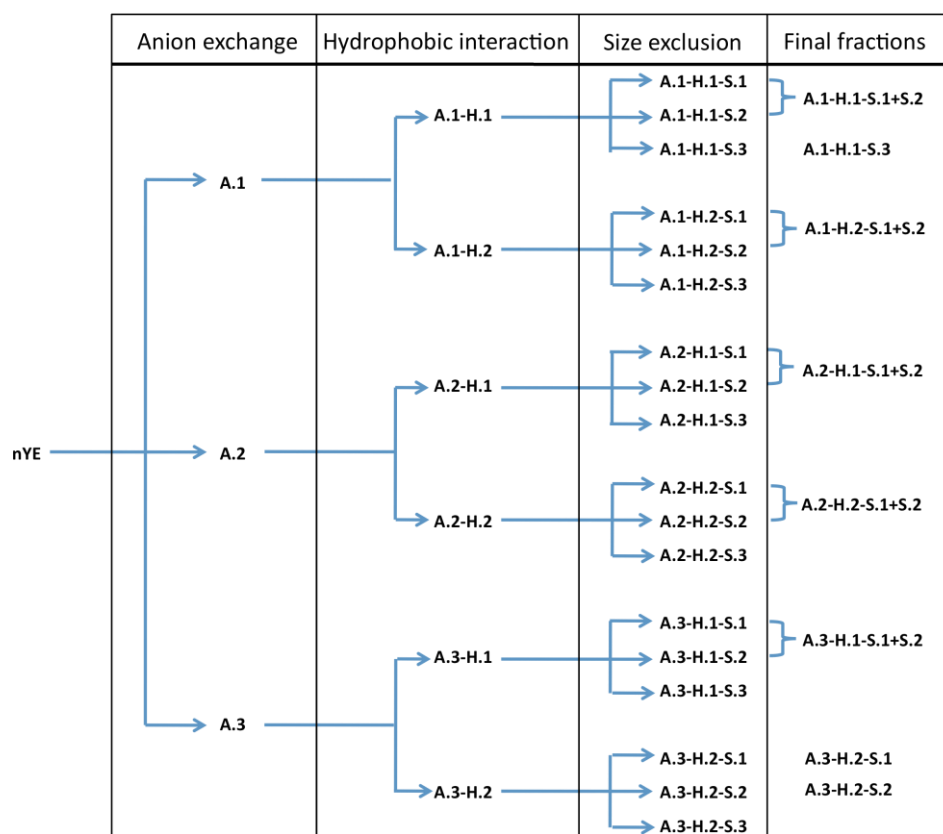


Figure 1. Flow-sheet of the three-step chromatographic process using sequentially AEC (A.x), HIC (A.x - H.y) and SEC (A.x - H.y - S.z).

nYE fraction characterization

Molecular size distribution

The molecular size distribution of the peptides contained either in nYE or in one-step chromatographic fractions was set out by analytical SE high performance liquid chromatography (SE-HPLC) using a Superdex peptide column coupled to an UV detector. Elution conditions are reported in Table 2. The column was calibrated with standard peptides of molar mass 238.2, 303.4, 437.5 and 658.9 g/mol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) and 811.1, 1151.5, 1332.6 and 2106.9 g/mol (LCPM - CNRS, Nancy, France).

Total and free amino acids

The total amino acid composition of freeze-dried samples was determined after peptide hydrolysis in HCl 6 N at 110 °C for 24 h. The solutions were then cooled at room temperature, adjusted to pH 4.5 with NaOH 4 N and filtered through a membrane of 0.22 µm pore size. Acid hydrolysis resulted in the deamination of the amide groups present in asparagine and glutamine to yield aspartic acid, glutamic acid and ammonia. Amino acids were derivatized with 9-fluorenylmethyl chloroformate and o-phthalaldehyde and analyzed by reverse phase HPLC according to the conditions described in Table 2. The amino acid concentrations were calculated from calibration curves performed with an amino acid kit (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA).

Carbohydrates

The carbohydrate composition of freeze-dried samples was determined after hydrolysis in HCl 2 N at 104 °C for 4 h. The solutions were diluted 25 times in deionized water and filtered through a membrane of 0.22 µm pore size. Then, monosaccharides were analyzed by ion exchange HPLC according to the conditions described in Table 2. The concentration of mannose and glucose, which were the main monosaccharides in nYE polysaccharides, was calculated from calibration prepared with standard solutions (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA).

Nucleic acids

The nucleic acid composition of freeze-dried samples was determined after hydrolysis in HClO₄ 60 % at 95°C for 70 min. The solutions were neutralized in (NH₄)H₂PO₄ 2 M and filtered through a membrane of

0.22 μm pore size. Then, the nucleobases (adenine, cytosine, uracile, guanine, thymine and hypoxanthine) were analyzed by reverse phase HPLC according to the conditions described in Table 2. The nucleobase concentrations were calculated from calibration performed with standards (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA).

Table 2. Operating conditions of HPLC analysis of peptide molecular size and of concentrations of amino acids, monosaccharides and nucleobases

Analyzed molecules	Separation method	Gel and Column	Eluent	Elution mode	Flow rate (mL/min)	Detector
Peptides	Size exclusion	Superdex peptide HR 10/30	H ₂ O/ Acetonitrile/ Trifluoroacetic acid (60/40/0.1, v/v/v)	0-30 mL: Isocratic	0.6	UV (214 and 226 nm)
Amino acids	Reverse phase	Hypersil 5 μm C18	A: Sodium acetate 20 mM triethylamine 0.024 % tetrahydrofurane 0.5 % at pH 7.2 B: ACN/Methanol/100 mM sodium acetate (40/60/20, v/v/v) at pH 7.2	0-17 mL: 100 % A 17-18 mL: 40 % A, 60 % B 18-25 mL: 100 % B	1	Fluorimeter
Mono-saccharides	Ion exchange	Metrosep CARBI 250 mm*4,5 mm	Sodium acetate 50 mM, NaOH 250 mM	0-25 mL: Isocratic	1.25	Amperometer
Nucleobases	Reverse phase	LiChroCart 250-4 LiChrospher 100 RP-18 endcapped 5 μm	A: (NH ₄)H ₂ PO ₄ 20 mM at pH 4 B: Acetonitrile/ Methanol/ Tetrahydrofuran (50/40/100, v/v/v)	0-2.4 mL: 100 % A 2.4-4.8 mL: 97 % A, 3 % B 4.8-15.2 mL: 75 % A, 25 % B 15.2-20 mL: 100 % B	0.8	UV (260 nm)

Cell culture

Cell line

CHO-AMW cell line producing a recombinant IgG1 anti-RhD antibody was provided by Dr. F. Wurm (EPFL, Lausanne)²⁵. CHO cells were routinely cultivated at 37 °C in 125 mL Erlenmeyer flasks (Corning, The Netherlands) with 25 mL working volume on an orbital shaker (90 rpm). The headspace of the flasks was purged with a mixture of air-CO₂ (95/5). Cells were grown in ProCHO5 CDM medium (Cambrex, East Rutherford, USA) supplemented with 4 mM glutamine (Eurobio, France). The cells were passaged every 3 - 4 days before being used for the screening test.

Screening test of nYE effect on cell growth

The impact of nYE fractions on cell growth was evaluated in 96-well plates (Corning, The Netherlands). Cell concentration was monitored in-situ by using the Cellscreen[®] device (Innovatis, Germany). Cells were seeded at 0.4×10^5 cells/mL in plates containing 200 μL of working volume and placed inside an incubator controlled at 37 °C and 5 % CO₂. The peripheral wells were not used for cell culture, but filled with PBS to prevent evaporation in central wells. The negative control of the screening test was the protein free and chemically defined medium RPMI 1640/BDM (90/10) supplemented with 4 mM glutamine (Eurobio, France). BDM was a 5/5/1 (v/v/v) mixture of Iscove's MDM, Ham's F12 and NCTC 135 basic media (Eurobio, France) supplemented with 750 μM ethanolamine, 500 μM ferric citrate (1/1 Fe-citrate ratio), and 0.1 % pluronic PF-68 (Sigma, France). All tested conditions were repeated 6 times in a same 96-well plate to determine standard deviation and the reproducibility was verified by two or three separate experiments. The influence of nYE fractions and complete nYE was evaluated with a concentration of 1 g/L added in the control medium. Moreover, as specific molecules concentrations were enriched in nYE fractions, lower concentrations were also assessed such as 0.5 g/L and 0.25 g/L for one-step and three-step fractions respectively. However, these results are not shown because no significant difference was observed demonstrating no inhibitory effect occurred.

Antibody analysis

IgG titer was determined by using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Goat anti-human kappa light chain IgG (Invitrogen, USA) was used for coating well plates and the produced antibody was detected with biotin-conjugated goat anti-human gamma chain IgG (Invitrogen, USA). The recombinant human anti-RhD IgG1 produced by CHO-AMW cells was quantified from calibration performed with a whole human IgG (Thermo scientific, USA).

Results and discussion

Cell growth stimulating effect of nanofiltrated YE

The commercial YE was first analyzed in order to get its composition in the main components. It was mainly composed of free amino acids, peptides, carbohydrates and nucleic acids (36 %, 24 %, 10 % and 7 % of raw matter respectively). Furthermore, YE also contained 15 % of mineral and 0.27 % of vitamins according to the manufacturer. However, as chemically defined media already contained amino acids, glucose, vitamins and mineral, the study was mainly focused on YE compounds such as peptides, polysaccharides and nucleic acids. So the commercial YE was diafiltrated through a nanofiltration membrane in order to remove small molecules, which were mainly amino acids. A nanofiltration process was preferred to a preparative SEC one to produce a sufficient amount of raw material for the following experiments. The analysis of the nanofiltrated YE (nYE) clearly showed the enrichment with peptides (47 % of raw matter) and the removal of free amino acids. Nucleic acids and carbohydrates accounted for 21 % and 12 % of raw matter respectively.

The distribution of nYE peptide molecular sizes was then investigated by SE-HPLC on Superdex peptide column. The UV chromatogram detected at 214 nm showed an elution under a poorly resolved large peak from 20 to 30 minutes (Figure 2-A). This underlined that peptides were overlapped, which is rather common for such a complex mixture. From the column calibration, the peptide molecular size range was evaluated between 200 and 2000 Da. This range was relatively narrow compared to other hydrolysates reported in literature^{12,17,26}. The presence of peptide of molecular size under membrane molecular weight cut off (500 Da) was explained because nanofiltration selectivity is based on both criteria molecular size and charge²⁷.

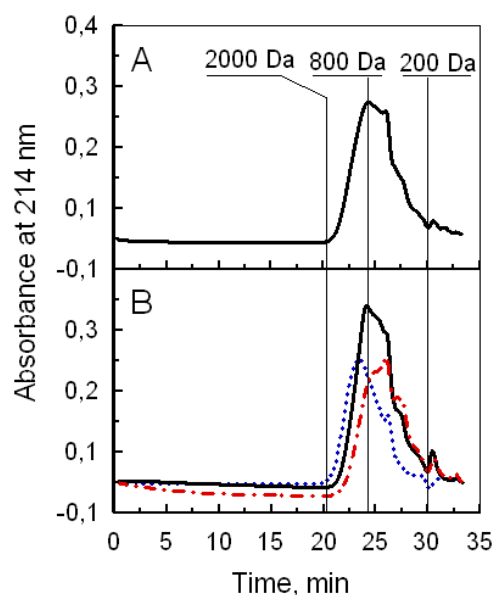


Figure 2. Molecular size distributions analyzed by SE-HPLC (absorbance at 214 nm): (A) nYE, (B) SEC fractions: S.1 (.....), S.2 (—) and S.3 (---).

On the other hand, the quantitative composition of nYE in total amino acids was achieved by RP-HPLC. The peptides contained a high extent of acid and basic amino acids (34 % and 19 % respectively) (Table 3), which appeared to be similar to those of rapeseed protein hydrolysate used to supplement CHO cell culture medium²⁶. However, this statement has to be moderated because the deamination of glutamine and aspartate into glutamic and aspartic acids could result in an overestimation of these two amino acids.

Table 3. Composition of nYE and AEC fractions in acid and basic amino acids (g per 100 g of total amino acids).

Fraction	Acid amino acids			Basic amino acids			
	Aspartic acid	Glutamic acid	% / nYE	Arginine	Histidine	Lysine	% / nYE
nYE	15	19	/	4	5	10	/
A.1	12	9	- 38	6	5	17	+ 46
A.2	16	19	+ 3	3	6	7	- 13
A.3	21	24	+ 32	2	4	4	- 47

The enrichment or impoverishment percentages by comparison with nYE are given for both amino acid groups.

Other amino acids were distributed in the same range leading to a content of hydrophobic amino acids of 14 % (Table 4). Thus, nYE contained a significant amount of peptides, rich in charged amino acids and with a rather small molecular size. The molecular size of peptides from rapeseed peptone²⁶, milk⁵, soy and wheat gluten hydrolysates¹⁹ was shown to influence their activity on cell growth. Several works also showed that electrical charge or hydrophobic properties played a key role in peptide bioactivity²⁸⁻³⁰.

Table 4. Composition of nYE and HIC fractions in hydrophobic amino acids (g per 100 g of total amino acids).

Fraction	Hydrophobic amino acids					% / YE
	Alanine	Isoleucine	Leucine	Phenyl-alanine	Valine	
nYE	4	1	4	4	1	/
H.1	4	0	3	2	0	- 36
H.2	5	2	4	4	0	+ 7

The enrichment or impoverishment percentages by comparison with nYE are given.

The impact of nYE on cell growth was then assayed by addition of 1 g/L in CHO-AMW cell cultures performed in RPMI 1640/BDM (90/10) medium supplemented with 4 mM glutamine. Kinetics of cell growth showed that a maximal cell concentration of 2.0×10^5 cells/mL was reached without nYE supplementation (control conditions), whereas nYE addition increased the cell density up to 8.5×10^5 cells/mL after 100 hours of culture (Figure 3).

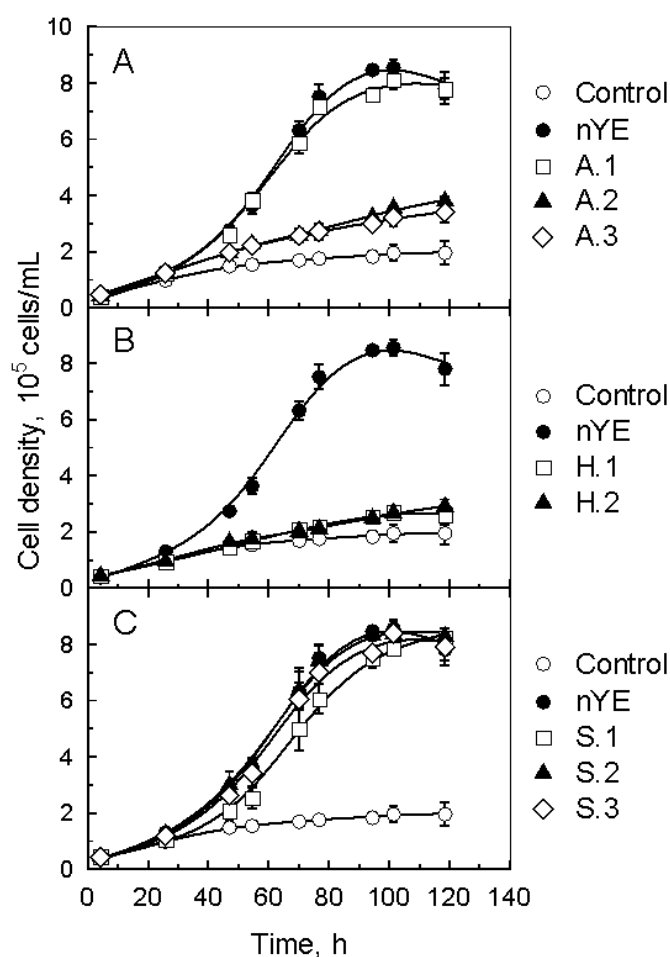


Figure 3. Growth kinetics of CHO-AMW cells in the control medium supplemented with 1 g/L of nYE or various fractions derived from AEC (A), HIC (B) and SEC (C).

Thus, this four times increase of the maximal cell concentration clearly demonstrated a positive effect of nYE on cell growth. This result was in accordance with other studies showing the cell growth stimulating effect of hydrolysate fractions mainly composed of peptides with molecular size around 1000 Da^{5,19,26}. Nevertheless, as nYE also contained various types of other biomolecules, further investigations were required to refine the physico-chemical properties of these active molecules.

Physico-chemical properties of nYE molecules impacting cell growth

A refined screening based on independent chromatography steps was then performed to better identify the properties of components involved in the nYE activity. AEC, HIC and SEC were separately implemented to provide molecule separations according to their main physico-chemical properties (electrical charge, hydrophobicity and molecular size). A special attention was paid on peptides since their influence has already been targeted in literature, without neglecting the potential impact of nucleic acids and carbohydrates.

AEC fractionation

First of all, it was necessary to identify the elution conditions allowing the production of three fractions containing similar amounts of biomolecules with distinct electrical charges. To do this, a batch adsorption study was performed with various gels and buffers. The best operating conditions combined a strong anion exchanger (Q Sepharose) to Trizma buffer at pH 8. The elution chromatogram of the large-scale elution is shown in Figure 4-A. The molecules in fraction A.1 can be considered as mainly neutral or positively charged since the stationary phase was positively charged. On the contrary, the molecules in fractions A.2 and A.3 interacted weakly or strongly with the AEC gel respectively and can thus be considered as poorly or strongly negatively charged.

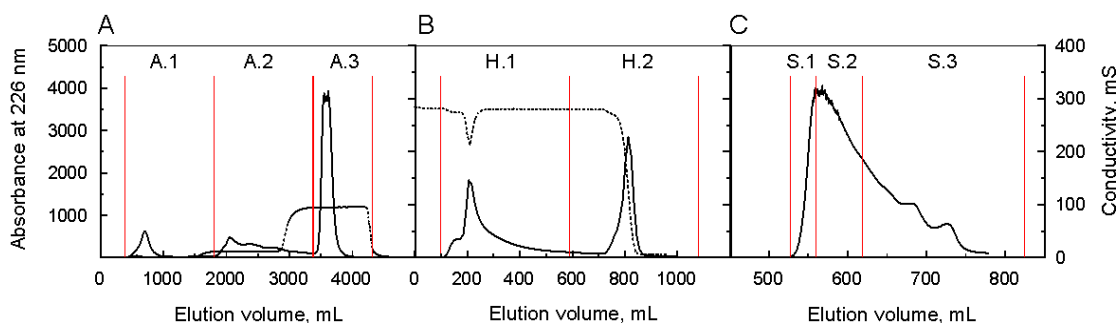


Figure 4. Chromatograms of nYE fractionation by AEC (A), HIC (B) and SEC (C). Absorbance detected at 226 nm (—), conductivity (·····) and harvested fractions (between vertical lines —).

Following AEC separation, the composition of nYE fractions in carbohydrates, nucleic acids and peptides was quantified (Table 5). Interestingly, A.1 was free from nucleic acids, while they were mainly isolated in A.3. The elution of nucleic acids in A.3 was expected considering their high negative charge content at pH 8 resulting from ionized phosphate groups. The carbohydrates were mainly divided in A.1 and A.2. The peptides were shared among the three fractions, due to the electrical charge diversity of their amino acid lateral chains that may be positive (basic amino acids), neutral or negative (acid amino acids). The analysis of acid amino acids (aspartic acid and glutamic acid) and basic amino acids (arginine, histidine and lysine) in AEC fractions was then performed in order to validate the selective separation of peptides according to their electrical charge property (Table 3). The fraction A.1 contained peptides with more basic amino acids (+ 46 %) and less acid amino acids (- 38 %) than nYE. On the opposite, the fractions A.2 and A.3 contained peptides with more acid amino acids (+ 3 % and + 32 % respectively) and less basic amino acids (- 13 % and - 47 % respectively) than nYE. Hence, AEC operating conditions allowed a significant separation of nYE peptides in three pools according to their electrical charge.

Table 5. Composition of nYE and one-step chromatographic fractions in carbohydrates, nucleic acids and peptides (g per 100 g of analyzed biomolecules). The enrichment or impoverishment percentages by comparison with nYE are given in brackets.

Chromatography	Fraction	Peptides	Nucleic acids	Carbohydrates
	nYE	59	26	15
AEC	A.1	67 (+ 14)	0 (- 100)	33 (+ 120)
	A.2	85 (+ 44)	2 (- 92)	13 (- 13)
	A.3	51 (- 14)	45 (+ 73)	4 (- 73)
HIC	H.1	33 (- 44)	11 (- 58)	56 (+ 273)
	H.2	8 (- 86)	71 (+ 173)	21 (+ 40)
SEC	S.1	39 (- 34)	33 (+ 27)	28 (+ 87)
	S.2	64 (+ 8)	22 (- 15)	14 (- 7)
	S.3	71 (+ 20)	20 (- 23)	9 (- 40)

The influence of the three AEC fractions, added at 1 g/L in control medium, on CHO cell growth is presented in Figure 3-A. Fraction A.1 demonstrated a similar effect than nYE on cell growth by increasing the total cell concentration up to 8.0×10^5 cells/mL. It has also to be noted that none of fractions A.2 and A.3 improved the cell growth as high as nYE. While fraction A.1 did not contain nucleic acids, it could be suggested that these molecules did not display a significant cell growth promoting activity, and that bioactive components were more likely positively charged peptides or carbohydrates. Despite the easy extrapolation of preparative AEC, only two works have evaluated its interest to

isolate active compounds on cell growth^{20,31}. Our results were consistent with a study reporting that a soy peptone AEC fraction, mainly composed of positively charged molecules, had a beneficial effect on CHO cell growth²⁰. So, AEC fractionation led to a simplified nYE composition, devoid of nucleic acids and enriched in positively charged peptides, without compromising the stimulating effect on CHO cell growth and with favourable contribution for downstream process and recombinant protein safety¹⁵. The AEC could be thus suggested to be a relevant separation process to simplify nYE as well as other protein hydrolysates used as culture media additive.

SEC fractionation

SEC is a well known technique to separate molecules according to their hydrodynamic volume, which is closely related to their molecular size. The previous SE-HPLC analysis showed that nYE peptides exhibited a molecular weight distribution from 200 to 2000 Da. Therefore the SEC stationary phase G-15 having a fractionation range from 300 to 1500 Da was chosen for preparative SEC fractionation. The three SEC fractions, S.1, S.2 and S.3, are indicated in the elution chromatogram of Figure 4-C. Consequently, the fractions S.1 and S.3 contained molecules with the highest and smallest molecular sizes respectively.

The composition analysis of the three fractions revealed that S.1 was enriched in carbohydrates (+ 87 %) and nucleic acids (+ 27 %) by comparison with nYE, whereas S.3 was impoverished in carbohydrates (- 40 %) and nucleic acids (- 23 %) (Table 5). Furthermore, peptides accounted for a small part of fraction S.1 and a major part of fractions S.2 and S.3. Consequently, macromolecules contained in nYE were mainly carbohydrates and nucleic acids, while peptides were smaller molecules. The molecular size distribution of peptides in each SEC fraction was then analyzed by SE-HPLC at 214 nm to evaluate the selectivity of peptide fractionation. The figure 2-B shows that the fractions S.1 and S.3 were enriched in peptides of molecular sizes between 800 to 2000 Da and 200 to 800 Da respectively, while the chromatographic profile of the fraction S.2 was similar to the nYE one. These analyses revealed a poor selectivity of the preparative SEC for peptide fractionation.

The SEC fractions, added at 1 g/L in control medium, exhibited a similar stimulating effect on cell growth than nYE by allowing a maximal concentration of 8.0×10^5 cells/mL (Figure 3-C). These results were not in agreement with literature studies which pointed out

the influence of the molecular size distribution of protein hydrolysates on cell growth activity^{5,19,20}. They could be explained both by the low selective SEC fractionation of peptides and by the presence of molecules other than peptides in yeast extract. Thus, although the SEC has been widely used to isolate molecules displaying cell growth^{5,8,19,20}, antioxidant³² or antihypertensive³³ bioactivities in protein hydrolysates, no conclusion could be drawn concerning the one-step SEC fractionation of a more complex mixture such as nYE.

HIC fractionation

In this part of the study, nYE was then fractionated by using HIC, based on the hydrophobic properties of molecules. A batch study was first performed to evaluate the proper concentration of ammonia sulphate allowing a significant coupling of hydrophobic molecules on the phenyl Sepharose gel. 3 mM ammonia sulphate in phosphate buffer at pH 7.2 were selected. The HIC elution chromatogram in Figure 4-B presents the two collected fractions. H.1 was richer in non-hydrophobic compounds while H.2 contained more hydrophobic molecules.

Regarding the composition in biomolecules of both fractions (Table 5), it appeared that nucleic acids were mainly isolated in H.2 (with an enrichment of 170 % by comparison to nYE) and that carbohydrates were mainly present in H.1 (with an enrichment of 270 %). Besides, peptides were found in very low percentages in both fractions H.1 and H.2 with a decrease of 44 % and 86 % respectively compared to nYE. They were probably partially lost during the extensive nanofiltration step applied to remove the salts. The HIC separation selectivity on peptides was assessed by analyzing the content of hydrophobic amino acids in the fractions (alanine, isoleucine, leucine, phenyl-alanine and valine) (Table 4). By comparison with nYE, H.1 was partially depleted of peptides containing hydrophobic amino acids (- 36 %), whereas H.2 was weakly enriched (+ 7 %). Thus, HIC operating conditions led to provide two different nYE molecule mixtures depending on their hydrophobic properties but relatively poor in peptides.

Both HIC fractions, supplemented at 1 g/L in control medium, improved very little the CHO cell growth leading to low maximal cell densities (2.7×10^5 cells/mL) (Figure 3-B). As H.1 and H.2 fractions were enriched with carbohydrates and nucleic acids respectively but largely depleted of peptides, these results pointed out the importance of peptide presence in nYE fractions to promote cell growth. The potential presence of residual

buffer ions in HIC fractions could also explain these low performances. Indeed, the desalting step might be compromised by the presence of di-and-trivalent ions²⁷. HIC has never been reported to isolate cell growth active molecules from protein hydrolysates. On the basis of our results, it appeared necessary to improve HIC implementation or to combine it with other chromatographies to get the most benefits of its selectivity criteria.

Three-step process for chromatographic nYE fractionation

One-step chromatographic processes led to several nYE fractions with various properties in electrical charge, molecular size or hydrophobicity. Their disparities in stimulating CHO cell growth highlighted some trends as to the nYE compounds probably involved in this impact. However, single step chromatographies, each based on one physico-chemical property, were not selective enough to draw acute conclusions on the active compounds characterization. Furthermore, non-active fractions could also result from the presence of inhibitory compounds. Therefore, a three-step chromatography process, based on successive AEC, HIC and SEC fractionations, was developed to refine the properties of nYE molecules involved in the stimulation of cell growth and IgG production (Figure 1). The operating conditions of each chromatographic step were the same than previously performed (Table 1 and Figure 4). AEC was chosen for the first step as it previously allowed the isolation of fraction A.1 that exhibited the same performance as nYE (Figure 3-A). Furthermore, as previous results underlined potential residual buffer ions in HIC fractions, SEC was used for the last step to provide, in the same time, the salt purification of HIC fractions and the separation according to molecule size. The desalting efficiency of SEC step was checked by a non overlapping of conductivity and absorbance peaks (data not shown). It has to be noted that, at the end of the overall process, 4 of the 18 expected fractions (A.1-H.2-S.3, A.2-H.1-S.3, A.2-H.2-S.3 and A.3-H.1-S.3) did not indicate a significant absorbance signal. This was probably due to a loss of matter during the fractionation process. Consequently, these fractions were not tested in CHO cell cultures. Furthermore, 10 last-step fractions were pooled in 5 fractions when the amount obtained after SEC step was too low (under 5 mg). Then, 8 fractions were evaluated for their impact on CHO cell growth and IgG production, as specified in Figure 1.

The cell growth kinetic results, observed when 1 g/L of these fractions was added in control medium, are presented in Figure 5. Six fractions allowed enhancing CHO cell growth by comparison to the control medium, while A.3-H.2-S.1 and A.3-H.2-S.2

decreased the initial cell density. In these two cases, the microscopic observation revealed an important cell lysis. The A.3 and H.2 fractions from previous one-step AEC and HIC processes respectively contained a high proportion of nucleic acids (Table 5). Thus, it could be deduced that A.3-H.2-S.1 and A.3-H.2-S.2 also contained high levels of nucleic acids that might be toxic for CHO cells. Elsewhere, A.1-H.1-S.1+S.2 and A.1-H.1-S.3, led to the same CHO cell growth improvement than nYE with a maximal cell concentration around 8×10^5 cells/mL. This result confirmed that positively charged molecules, stemmed from A.1 fraction of AEC step, contained active nYE molecules independently of their molecular sizes. Furthermore, A.1-H.2-S.1+S.2 presented a lower growth promoting activity than fractions A.1-H.1-S.1+S.2 or A.1-H.1-S.3 with a total cell concentration down to 4.0×10^5 cells/mL. Therefore, the hydrophilic nYE molecules appeared to be more efficient than the hydrophobic ones to promote CHO cell growth. Moreover, these data support the previous hypothesis to explain the negative impact of the one-step HIC fractions by residual inhibitory buffer ions. Alternatively, the remaining three fractions (A.2-H.1-S.1+S.2, A.2-H.2-S.1+S.2 and A.3-H.1-S.1+S.2) exhibited intermediate increases in CHO cell density between 2.0 and 3.5×10^5 cells/mL. These last results underlined that non positively charged molecules could also stimulate CHO cell growth but at a lower level.

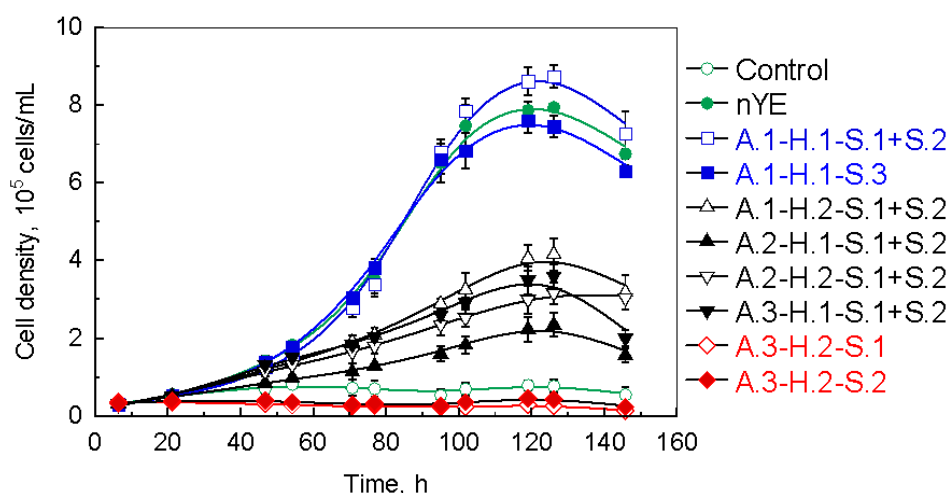


Figure 5. Growth kinetics of CHO-AMW cells in the control medium supplemented with 1 g/L of the final nYE fractions obtained with the three-step chromatographic process.

In order to complete the experiments based on cell growth, the influence of the nYE fractions was further evaluated on the recombinant IgG production. The antibody specific productions were calculated by the ratios between IgG and cell concentrations after 120

hours of culture. They were compared to the specific production obtained with nYE supplementation in Figure 6. Two fractions (A.1-H.1-S.1+S.2 and A.3-H.1-S.1+S.2) exhibited a similar impact than nYE on IgG specific production, whereas three others (A.1-H.1-S.3, A.1-H.2-S.1+S.2 and A.2-H.2-S.1+S.2) led to an increase in IgG specific production up to 30 %. Interestingly, the fraction A.1-H.1-S.3 was also found to promote cell growth as nYE. Therefore, this fraction led to a higher total IgG production than with nYE supplementation, corresponding to an increase of 22 %. Elsewhere, the supplementation with fraction A.2-H.1-S.1+S.2 did not stimulate IgG production compared to the control condition (without supplementation) and no production was observed with the fractions A.3-H.2-S.1 and A.3-H.2-S.2 which were found to induce cell lysis.

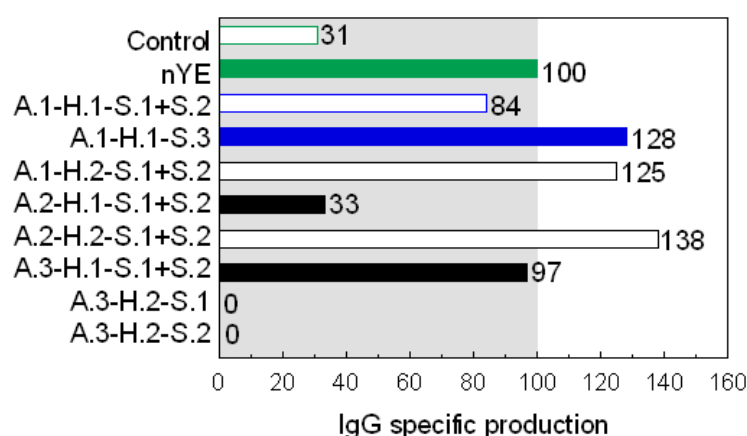


Figure 6. Specific production of the recombinant IgG1 by CHO-AMW cells observed after 120 h of cell culture in presence of various nYE fractions. Results are given in percentage of the specific production observed with nYE.

A specific attention was paid on the characterization of A.1-H.1-S.3 fraction. Based on the one-step results, it could be assumed that this fraction mainly contained basic and hydrophilic peptides with low quantities of carbohydrates and no nucleic acids. Interestingly, the analyses of total amino acids revealed high proportions of lysine and arginine residues with 40 % and 49 % of the total amino acids respectively. Thus, the three step-fractionation process allowed the isolation of a very specific mixture of peptides mainly containing these two amino acids. Moreover, as the peptide molecular sizes of S.3 fraction was observed to be mainly between 200 and 800 Da, these active molecules should be di- to penta-peptides. A recent patent pointed out that tri and di-peptides containing C-terminal arginine were responsible of the growth promoting activity of an animal-derived peptone on eukaryote and prokaryote cell lines but without specifying the

peptide structures³¹. Our results converged to similar conclusions, indicating that a nYE molecule mixture, containing basic and hydrophilic peptides, mainly composed of arginine and lysine, with low quantities of carbohydrates and no nucleic acids basic and hydrophilic peptides are most probably involved in yeast extract promoting effect on cell culture. Furthermore, short cationic peptides (from 5 to 15 residues) are currently used as vector for cell drug delivery as they are known to be cell-penetrating³⁰. Their positive charge allowed a strong electrostatically interaction with the various anionic species present at the extracellular surface of cell membrane. Then, an energy-independent, non-endocytotic and receptor independent process may be involved in their cellular entry. By consequent, in the present study, arginine and lysine rich peptides might improve CHO cell growth by promoting nutriment entry inside the cell. As cationic peptides mechanism of action is not cell specific or media dependant, our results are suggested to be extensive to further culture conditions. Therefore, this work allowed us to deepen the contribution of YE molecules to animal cell culture, as well as to evaluate some fractionation processes enable to refine and simplify a complex molecule mixture such as YE.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Dr. Regis Vanderesse (LCPM-CNRS, Nancy) for the supply of standard peptides, and Dr. Florian Wurm (EPFL, Lausanne) for the supply of the recombinant CHO cell line.

References

1. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 917-924.
2. Butler M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 68: 283-291.
3. Froud SJ. The development, benefits and disadvantages of serum-free media. *Dev Biol Stand* 1999; 99: 157-166.
4. Schlaeger EJ. 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* 1996; 194: 191-199.
5. Amiot J, Germain L, Turgeon S, Lemay M, Ory-Salam C., Auger FA. Peptides from milk protein hydrolysates to improve the growth of human keratinocytes in culture. *Int Dairy J* 2004; 14: 619-626.
6. Grillberger L, Kreil TR, Nasr S, Reiter M. Emerging trends in plasma-free manufacturing of recombinant protein therapeutics expressed in mammalian cells. *Biotechnol J* 2009; 4: 186-201.
7. Sung YH, Lim SW, Chung JY, Lee GM. 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* 2004; 63: 527-536.
8. Mendonça RZ, Oliveira EC, Pereira CA & Lebrun, I. Effect of bioactive peptides isolated from

yeastolate, lactalbumin and NZCase in the insect cell growth. *Bioprocess Biosyst Eng* 2007; 30: 157-164.

9. Shen, C.F., Kiyota, T., Jardin, B., Konishi, Y. & Kamen, A. Characterization of yeastolate fractions that promote insect cell growth and recombinant protein production. *Cytotechnology* 2007; 54, 25-34.
10. Kim SH, Lee GM. 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* 2009; 83: 639-648.
11. Heidemann R, Zhang C, Qi H, Rule JL, Rozales C, Park S, Chuppa S, Ray M, Michels J, Konstantinov K, Naveh D. The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells. *Cytotechnology* 2000; 32: 157–167.
12. Burteau CC, Verhoeve FR, Mols JF, Ballez JS, Agathos SN, Schneider YJ. 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* 2003; 39, 291-296.
13. Sommer R. Yeast extracts : production, properties and components. In: Australian institute of food science and technology editor. *International Symposium on yeasts n°9*. Australia: Australia Food; 1998. p 181-183.
14. Hermes PA, Castro CD. A fully defined, fed-batch, recombinant NS0 culture process for monoclonal antibody production. *Biotechnol Prog* 2010; 26: 1411-1416.
15. Sahoo N, Choudhury K, Manchikanti P. Manufacturing of biodrugs: need for harmonization in regulatory standards. *BioDrugs* 2009; 23: 217-229.
16. Dick LW, Kakaley JA, Mahon D, Qiu D, Cheng KC. Investigation of proteins and peptides from yeastolate and subsequent impurity testing of drug product. *Biotechnol Prog* 2009; 25: 570-577.
17. Farges-Haddani B, Tessier B, Chenu S, Chevalot I, Harscoat C, Marc I, Goergen JL, Marc A. Peptide fractions of rapeseed hydrolysates as an alternative to animal proteins in CHO cell culture media. *Process Biochem* 2006; 41: 2297-2304.
18. Chun BH, Kim JH, Lee HJ, Chung, N. Usability of size-excluded fractions of soy protein hydrolysates for growth and viability of Chinese hamster ovary cells in protein-free suspension culture. *Bioresource Technol* 2007; 98: 1000–1005.
19. Franěk F, Hohenwarter O, Katinger H. Plant protein hydrolysates: preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures. *Biotechnol Prog* 2000; 16: 688-692.
20. Michiels JF, Barbau J, De Boel S, Dessy S, Agathos SN, Schneider YJ. Characterisation of beneficial and detrimental effects of a soy peptone, as an additive for CHO cell cultivation. *Process Biochem* 2011; 46: 671-681.
21. Farges B, Chenu S, Marc A, Goergen JL. Kinetics of IFN- γ producing CHO cells and other industrially relevant cell lines in rapeseed-supplemented batch cultures. *Process Biochem* 2008. 43, 945-953.
22. Franek F, Katinger H. Specific Effects of Synthetic Oligopeptides on Cultured Animal Cells. *Biotechnol Prog* 2002; 18, 155-158.
23. Franěk F, Fussenegger, M. Survival factor-like activity of small peptides in hybridoma and CHO cells cultures. *Biotechnol Prog* 2005; 21, 96-98.
24. Rathore A, Velayudhan A. Guidelines for optimization and scale-up in preparative chromatography. *BioPharm Inter* 2003; 16, 34-42.
25. Miescher S, Zahn-Zabel M, De Jesus M, Moudry R, Fish I, Vogel M, Kobr M, Imboden MA, Kragten E, Bichler J, Mermod N, Stadler BM, Amstutz H, Wurm F. CHO expression of a novel human recombinant IgG1 anti-RhD antibody isolated by phage display. *Br J Haematol* 2000; 111, 157-166.
26. Chabanon G, Alves da Costa L, Farges B, Harscoat C, Chenu S, Gorgen JL, Marc A, Marc I, Chevalot I. Influence of the rapeseed protein hydrolysis process on CHO cell growth. *Bioresource Technol* 2008; 99, 7143–7151.
27. Martin-Orue C, Bouhallab S, Garem A. Nanofiltration of amino acid and peptide solutions: mechanisms of separation. *J Membr Sci* 1998; 142: 225-233.
28. Pownall TL, Udenigwe CC, Aluko RE. Effects of cationic property on the in vitro antioxidant

activities of pea protein hydrolysate fractions. Food Res Inter 2011; 44, 1069-1074.

29. Yamada Y, Katagiri F, Hozumi K, Kikkawa Y, Nomizu M. Cell behavior on protein matrices containing laminin α -1 peptide AG73. Biomaterials 2011; 32, 4327-4335.

30. Schmidt N, Mishra A, Lai GH, Wong GCL. Arginine-rich cell-penetrating peptides. FEBS Lett 2010; 584:1806-1813.

31. Wilkins J, Shiratori MK, Breece T. Biologically active C-terminal arginine-containing peptides. United States patent. US 2009/0143248 A1. 2009.

32. Peña-Ramos EA, Xiong YL, Arteaga GE. Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. J Sci Food Agric 2004; 84: 1908-1918.

33. Kapel R, Rahhou E, Lecouturier D, Guillochon D, Dhulster P. Characterization of an antihypertensive peptide from an Alfalfa white protein hydrolysate produced by a continuous enzymatic membrane reactor. Process Biochem 2006; 41: 1961-1966.

2.3- Résultats complémentaires

Seule l'influence des fractions ajoutées à 1 g/L a été présentée dans l'article précédent. Or, du fait du procédé de fractionnement certains mélanges ont été enrichis en diverses biomolécules présentes dans l'EXL nanofiltré. L'enrichissement des fractions pourrait engendrer un effet inhibiteur sur la croissance des cellules. C'est pourquoi, les fractions issues des procédés de chromatographie en une ou trois étapes ont aussi été évaluées à des concentrations plus faibles de 0,5 et 0,25 g/L (Figure 67 et Figure 68).

Les fractions ayant un effet promoteur sur la croissance cellulaire (A1, S1, S2, S3, A1.H1.S1S2 et A1.H1.S3) sont les mêmes quelle que soit la concentration utilisée entre 0,25 et 0,5 g/L (Figure 3 et 5 de l'article). De plus, à 0,5 ou 0,25 g/L les effets sur la croissance cellulaire n'ont pas été améliorés par rapport à 1 g/L. Nos résultats montrent donc que l'enrichissement des fractions par le procédé chromatographique n'a pas provoqué d'effet inhibiteur sur la croissance cellulaire, ce qui valide les conclusions de l'article obtenues avec 1 g/L de fractions.

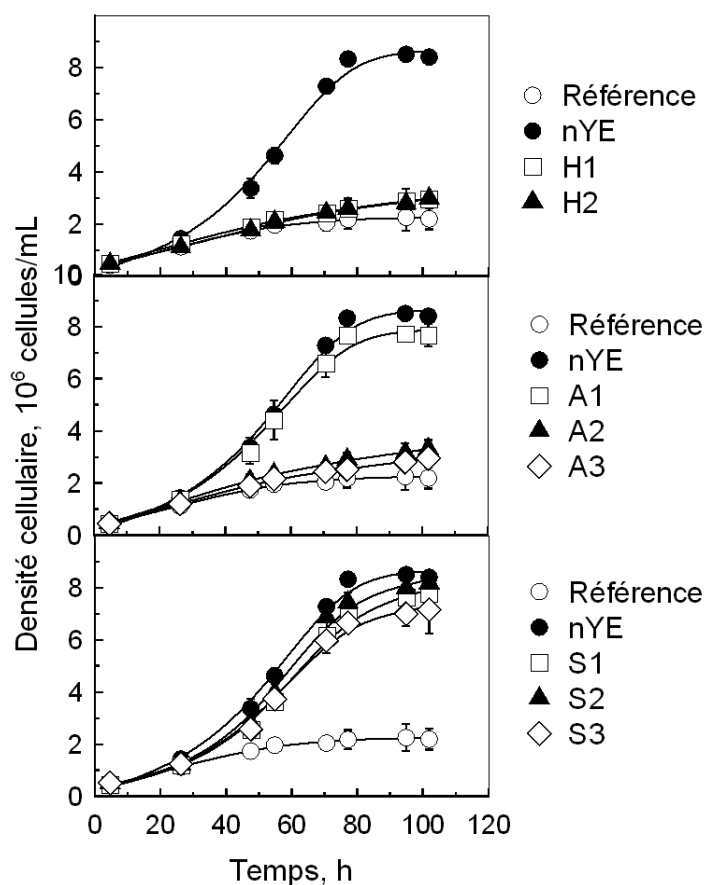


Figure 68. Influence de l'ajout de 0,5 g/L des fractions issues du procédé de fractionnement chromatographique en une étape sur la croissance des cellules CHO-AMW cultivées dans un milieu RPMI/BDM(90/10).

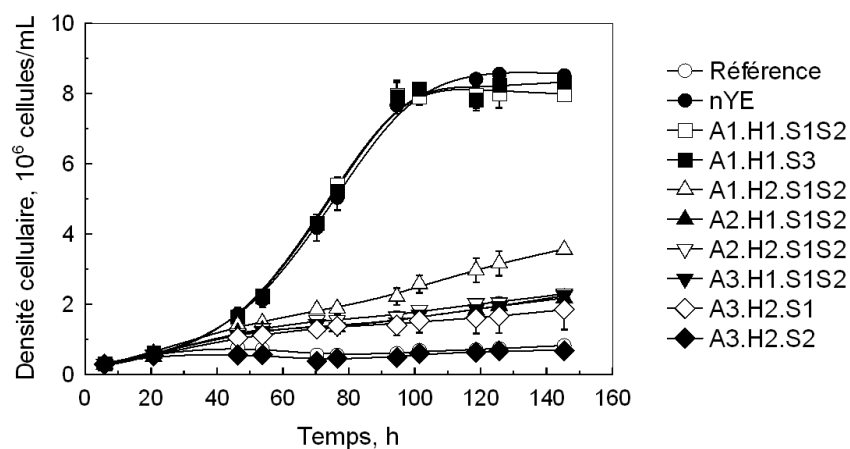


Figure 69. Influence de l'ajout de 0,25 g/L des fractions issues du procédé de fractionnement en trois étapes chromatographiques sur la croissance des cellules CHO-AMW cultivées dans un milieu RPMI/BDM(90/10).

2.4- Principales contributions de l'article

L'objectif de cette partie était de cartographier l'activité des biomolécules contenues dans l'EXL nanofiltré selon leurs propriétés physico-chimiques. Dans un premier temps, trois procédés de chromatographie par échange d'ions, exclusion de taille et interactions hydrophobes ont été mis en œuvre indépendamment pour fractionner l'EXL nanofiltré. Les fractions ont été testées sur la croissance des cellules CHO-AMW en microplaques. La CLBP EI a permis d'isoler les molécules les plus actives de l'EXL nanofiltré dans la fraction correspondant aux molécules chargées positivement (A1). Ainsi, nous avons mis en évidence la possibilité de simplifier la composition d'un EXL utilisé en culture de cellules de mammifères par une étape de CLBP EI. De plus, l'analyse de la composition de cette fraction a montré l'absence d'acides nucléiques et un enrichissement en peptides cationiques par rapport à l'EXL nanofiltré, alors que la quantité de glucides est restée constante.

Dans un second temps, un procédé de fractionnement incluant séquentiellement les trois procédés de chromatographie a été mis en œuvre. L'objectif était d'affiner la séparation des molécules impliquées dans la réponse cellulaire en isolant des groupes de molécules partageant trois critères physico-chimiques. La CLBP EI a été réalisée en première étape car elle permet d'isoler une fraction active à partir de l'EXL nanofiltré. Cependant, les autres fractions issues de la CLBP EI ont aussi été prises en compte afin d'établir si la présence de molécules inhibitrices était à l'origine de leur faible activité. Puis, la CLBP IH et la CLBP ET ont été successivement mises en œuvre. La dernière étape a permis de purifier les fractions des impuretés apportées au cours du procédé de fractionnement, telles que le NaCl, le sulfate d'ammonium, le trizma et le phosphate.

Les fractions présentant un effet promoteur de croissance cellulaire (A1.H1.S1S2 et A1.H1.S3) correspondent à des molécules cationiques et hydrophiles. Par contre, ces fractions stimulent la croissance de manière similaire quelle que soit la taille des molécules, alors que seules les molécules de plus petite taille semblent favoriser la production d'IgG. D'après les analyses réalisées sur les fractions issues d'une seule étape de fractionnement, ces deux fractions actives sont dépourvues d'acides nucléiques, sont enrichies en peptides cationiques, hydrophiles et de taille comprise entre 3 et 15 acides aminés et ne contiennent qu'une faible quantité de polysaccharides. De plus, l'analyse de la composition des peptides en acides aminés a montré que les peptides de la fraction

A1.H1.S1S2 contiennent respectivement 49 et 40 % de lysine et d'arginine. Enfin, les fractions les plus concentrées en acides nucléiques (A3.H2.S1 et A3.H2.S2) induisent la lyse des cellules CHO, confirmant l'effet négatif de ces macromolécules sur la culture de cellules.

Des peptides cationiques, tels que ceux contenus dans les fractions actives de notre étude, sont parfois utilisés comme vecteurs de médicaments vers le milieu intracellulaire. Chargés positivement, ces peptides se lient par interactions électrostatiques aux membranes lipidiques des cellules chargées négativement (Schmidt et *al.*, 2010). La stabilité de la membrane est alors perturbée et les peptides, couplés à la molécule thérapeutique, entrent dans la cellule. Ce processus, permettant le transport des macromolécules dans la cellule, ne consomme pas d'énergie cellulaire. Ainsi, le transport des peptides vers le milieu intracellulaire à faible coût énergétique pourrait être à l'origine d'un apport d'éléments nutritifs favorables à la croissance cellulaire. Ces résultats sont intéressants pour la formulation de nouveaux milieux de culture car la propriété biologique de ces peptides n'est pas spécifique aux cellules CHO mais à toutes les cellules délimitées par une bicouche lipidique (Schmidt et *al.*, 2010).

3- Validation de l'activité de la fraction sélectionnée en culture agitée

La séparation par chromatographie d'échange d'ions a permis d'isoler des molécules actives de l'EXL nanofiltré dans la fraction A1. Les trois étapes successives de chromatographie ont permis de simplifier et d'affiner la caractérisation des molécules actives en les isolant dans les fractions A1.H1.S1S2 et A1.H1.S3. La sélection des fractions actives a été réalisée sur les cellules cultivées en microplaque statique et dans un milieu défini pauvre. Ce protocole a permis de réduire la quantité de matière nécessaire au test d'activité cellulaire. Or, des travaux ont montré que ces essais en microplaque pouvaient être transposés à des cultures en mode agité plus proche des conditions d'utilisation en procédé industriel (Petiot et *al.*, 2009 ; Farges et *al.*, 2006). C'est pourquoi, dans cette partie, nous avons vérifié que les fractions sélectionnées conservaient un effet promoteur sur la croissance de cellules cultivées en fioles d'Erlenmeyer, lors de leur ajout dans un milieu plus riche. Seule la fraction active A1 a pu être obtenue en quantité suffisante pour évaluer son effet en système agité.

La Figure 69 compare l'effet de la fraction A1 et de l'EXL nanofiltré par rapport au milieu BDM choisi comme milieu de référence. Dans le milieu BDM, une concentration maximale de $3,1 \times 10^6$ cellules/mL est obtenue après 140 heures de culture. La fraction A1 et l'EXL nanofiltré améliorent légèrement cette valeur pour atteindre $3,6 \times 10^6$ cellules/mL, mais après seulement 90 heures de culture. La fraction A1 stimule donc la phase exponentielle de croissance de manière similaire à l'EXL nanofiltré. Par conséquent, il est très probable que la fraction A1 a bien permis d'isoler les molécules promotrices de la croissance, présentes initialement dans l'EXL nanofiltré.

En revanche, en présence de la fraction A1 les cellules meurent plus rapidement qu'en présence de l'EXL nanofiltré. La présence de molécules nutritives (Nyberg et *al.*, 1999 ; Heidemann et *al.*, 2000) ou de facteurs anti-apoptotiques (Franěk et *al.*, 2000 ; Franěk, 2004 ; Farges-Haddani et *al.*, 2006 ; Franěk & Fussenegger, 2005) dans l'EXL nanofiltré pourrait expliquer cette observation. De ce fait, ces résultats soulignent la diversité des activités des molécules contenues dans l'EXL permettant d'améliorer les performances du procédé de culture.

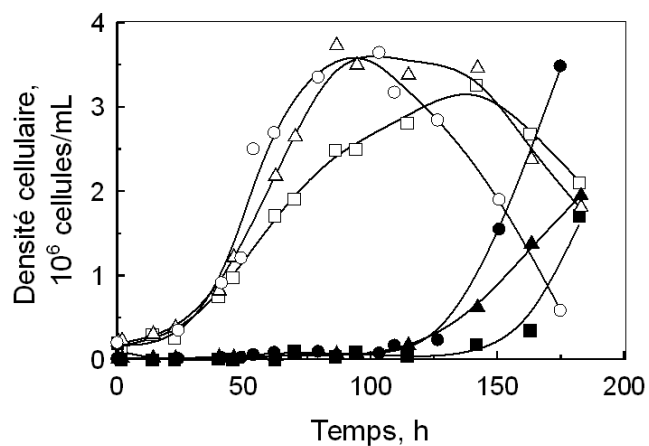


Figure 70. Influence de l'ajout de 1 g/L de la fraction A1 (●, ○) et de l'EXL nanofiltré (▲, △) dans le milieu BDM (■, □) sur la cinétique de croissance des cellules viables (symboles ouverts) et mortes (symboles fermés) cultivées en fioles d'Erlenmeyer.

4- Conclusion du *chapitre 3*

Les hydrolysats utilisés pour compléter les milieux de culture de cellules de mammifères sont des mélanges complexes de diverses molécules. L'identification des molécules d'intérêt dans ces mélanges est cruciale afin d'améliorer la reproductibilité des procédés de culture, mais aussi pour fiabiliser le procédé en simplifiant la composition des hydrolysats. Dans le chapitre précédent, deux groupes de molécules actives sur les cellules CHO-AMW ont été isolés par un procédé de nanofiltration membranaire. Nous avons montré que les molécules de faibles PM étaient métabolisées par les cellules, alors que celles de plus haut PM stimulaient la croissance cellulaire. Afin d'améliorer la caractérisation de ces molécules, une stratégie de fractionnement par chromatographie basse pression a alors été mise en œuvre (Figure 70).

Les procédés de séparation par CLBP ont permis le fractionnement des molécules de l'EXL nanofiltré selon leurs propriétés physico-chimiques : charge électrique, hydrophobie et PM. L'influence des fractions obtenues sur la croissance des cellules CHO-AMW en microplaque a permis de mieux discriminer l'activité des fractions selon leurs propriétés physico-chimiques. De manière intéressante, le procédé de CLBP EI a conduit à l'isolation des molécules actives de l'EXL nanofiltré dans une fraction unique. Ainsi, une étape de purification par CLBP EI peut être proposée pour simplifier la composition d'hydrolysats utilisés en culture de cellules de mammifères.

La mise en œuvre d'un procédé de fractionnement incluant trois étapes séquentielles de chromatographie a permis d'identifier les peptides composés majoritairement de 3 à 15 acides aminés de lysine et d'arginine comme promoteurs de la croissance de cellules CHO. Des peptides de ce type sont utilisés habituellement pour transporter des molécules thérapeutiques à l'intérieur des cellules. Il est donc fort probable que les peptides sélectionnés dans nos travaux stimulent la croissance en facilitant le transport des nutriments à l'intérieur de la cellule. L'ajout de peptides composés d'arginine et lysine dans la formulation de milieux de culture de cellules de mammifères s'avère donc très prometteur. D'autre part, nous avons montré que l'ajout d'acides nucléiques pouvait inhiber la croissance et favoriser la lyse cellulaire. Il est donc recommandé de purifier les acides nucléiques des hydrolysats utilisés pour compléter les milieux de culture de cellules de mammifères.

Le criblage de l'activité des fractions sur les cellules en microplaque a permis de sélectionner les composés promoteurs de la croissance des cellules CHO. La comparaison des effets de la fraction sélectionnée par le procédé de CLBP EI et de l'EXL nanofiltré, sur une culture de cellules en fioles d'Erlenmeyer, a confirmé leur effet similaire au cours de la phase exponentielle de croissance. De plus, les cinétiques observées en fioles d'Erlenmeyer suggèrent que l'EXL nanofiltré contient également d'autres molécules actives permettant de retarder la mort cellulaire. L'analyse détaillée de cet effet sur l'apoptose n'a pas été possible en raison de la trop faible quantité de matière obtenue après fractionnement. Un travail complémentaire d'amélioration des conditions opératoires du procédé de fractionnement pourrait permettre une réduction des pertes de matière et donc une évaluation plus complète des activités des fractions obtenues.

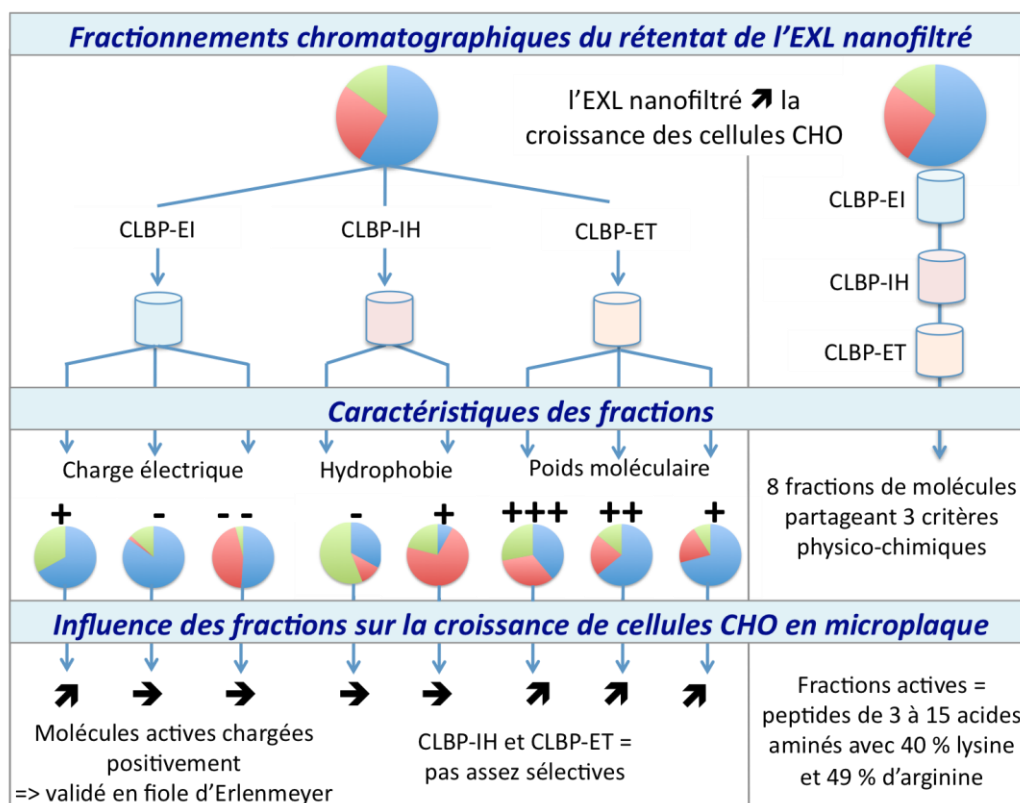


Figure 71. Synthèse des résultats du chapitre 3 (peptides : bleu ; polysaccharides: vert foncé, acides nucléiques: rouge)

Conclusion générale & perspectives

Conclusion générale

L'objectif général de ce travail était d'étudier l'intérêt de l'ajout d'hydrolysats de levure dans un procédé de culture de cellules CHO productrices d'AcM en vue de déterminer leurs conditions d'utilisation et leur rôle, et d'améliorer la caractérisation des composés actifs. Les performances des cultures, réalisées dans des systèmes agités et statiques, ont été étudiées avec ou sans ajout d'hydrolysats dans les milieux de référence BDM et BDM/RPMI (10/90). Pour chaque aspect de l'étude, nous allons tout d'abord synthétiser les principales contributions de nos travaux avant de proposer différentes perspectives visant à confirmer, compléter et élargir notre démarche.

Les hydrolysats de levure présentent-ils des effets dépendants de leurs conditions d'utilisation ?

Les hydrolysats de levure possèdent des propriétés variables selon leur composition, définie par leur procédé d'obtention.

L'impact de l'ajout de deux peptones P.A et P.B générées par hydrolyse enzymatique et d'un EXL a été évalué sur les performances d'un procédé de culture de cellules CHO productrices d'AcM. L'EXL est un autolysat, caractérisé par un haut degré d'hydrolyse, alors que la peptone P.B est un peu moins hydrolysée et la peptone P.A encore moins. Ajouté à 0,5, 1, 2 ou 4 g/L, ces trois hydrolysats améliorent les performances de culture en termes de concentrations maximales de cellules et/ ou d'anticorps. Cependant, l'hydrolysats plus fortement dégradé, comme l'EXL, est davantage favorable pour stimuler la croissance cellulaire, alors que la peptone plus faiblement dégradée présente un effet plus significatif sur la production spécifique d'AcM.

Le rôle de l'hydrolysats sur la croissance cellulaire ou la production d'AcM varie selon la concentration d'ajout.

Quelle que soit la concentration d'ajout des hydrolysats dans le milieu de référence, un effet bénéfique sur la croissance cellulaire a été observé. Néanmoins, l'ajout d'EXL à 1 ou 2 g/L permet d'obtenir de meilleures performances sur la concentration cellulaire que lorsqu'il est ajouté à 0,5 et 4 g/L. Ces résultats suggèrent, soit, une quantité limitante de molécules d'intérêt, soit, un excès de molécules défavorables. Par contre, l'ajout de 1 ou 4 g/L de peptone P.A ou P.B permet d'obtenir des performances similaires sur la

concentration maximale de cellules. D'autre part, quel que soit l'hydrolysate testé, une concentration de 4 g/L permet d'obtenir une meilleure concentration maximale d'AcM que lorsqu'il est ajouté à 1 g/L. Ainsi, une concentration optimale d'hydrolysate pour améliorer la croissance cellulaire n'est pas suffisante pour stimuler la production d'AcM.

Une combinaison d'EXL et de peptone permet d'obtenir une synergie de leurs effets.

Le mélange de 1 g/L d'EXL et de 4 g/L de peptone P.A améliore de 190 % la production d'AcM par rapport au milieu de référence. Or, ces deux hydrolysats, ajoutés indépendamment, augmentent la production d'AcM de respectivement 0 et 100 %. De plus, lorsque l'EXL est mélangé à la peptone P.A, il permet d'augmenter la concentration cellulaire de 40 % par rapport à la peptone P.A ajoutée seule. Le mélange des hydrolysats permet donc de combiner les effets bénéfiques de l'EXL sur la croissance cellulaire et de la peptone P.A sur la production d'AcM. Ces résultats soulignent ainsi la présence dans les différents hydrolysats de levure de composés présentant des rôles spécifiques sur les cellules en culture.

Le moment d'ajout des peptones dans le procédé de culture est important.

Les peptones combinées à l'EXL ont été ajoutées, soit, en début de culture, soit, au cours de la phase exponentielle de croissance. Les effets positifs sur la production d'AcM n'ont été observés que lors de l'ajout initial dans le milieu de culture. La production d'AcM est donc corrélée à la croissance cellulaire et les peptones sont indispensables dès le début de la culture pour stimuler la production spécifique.

L'ajout de glucose et de glutamine ne permet pas d'améliorer les effets de l'EXL.

Malgré la limitation en substrats carbonés observée en fin de phase de croissance cellulaire, lors de la culture supplémentée en EXL, l'ajout supplémentaire de glutamine ou de glucose en cours de culture ne permet pas de prolonger la phase de croissance cellulaire. Au contraire, l'ajout de glutamine présente un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire : une accumulation d'ions ammonium pourrait être à l'origine de cette inhibition. Par contre, l'ajout de glucose retarde la mort cellulaire.

Quelles sont les principales influences des hydrolysats de levure sur les cinétiques d'un procédé de culture ?

Les hydrolysats stimulent la vitesse spécifique de croissance cellulaire.

En fiole d'Erlenmeyer, les hydrolysats prolongent la phase de croissance cellulaire. Par contre, ils améliorent la vitesse spécifique maximale de croissance des cellules cultivées en bioréacteur. Dans les deux systèmes de culture, les effets des hydrolysats sur la concentration de cellules viables ne sont pas liés à la prévention de la mort cellulaire par lyse, nécrose ou apoptose. Les hydrolysats contiennent donc des molécules qui stimulent la croissance cellulaire.

Les hydrolysats améliorent le métabolisme énergétique.

Les hydrolysats favorisent l'intégration du pyruvate dans le cycle TCA plutôt que sa conversion en lactate. Ces évolutions du métabolisme sont corrélées à l'influence positive des hydrolysats sur la croissance cellulaire aussi bien en fiole d'Erlenmeyer qu'en bioréacteur. De plus, l'EXL et la peptone P.B contiennent des molécules qui permettent de prolonger la phase de croissance cellulaire malgré une limitation en glutamine, avec l'avantage d'induire une plus faible production d'ions ammonium.

La peptone la moins hydrolysée améliore la cinétique de production d'AcM.

La peptone P.A stimule la vitesse spécifique de production d'AcM par rapport au milieu de référence et aux milieux supplémentés avec l'EXL ou la peptone P.B plus hydrolysée. De plus, l'ajout de la peptone P.A maintient stable la concentration maximale d'IgG au cours de la phase de mort cellulaire, alors qu'elle diminue dans les autres conditions de culture. Elle pourrait donc contenir des inhibiteurs de protéases. La peptone P.A est donc particulièrement bénéfique pour la cinétique de production d'AcM.

Les influences bénéfiques des hydrolysats sont extrapolables au bioréacteur régulé et agité.

Les meilleures conditions sélectionnées en fiole d'Erlenmeyer pour améliorer les performances de culture ont été extrapolées au bioréacteur. Des différences de comportement ont été observées entre les cellules cultivées dans ces deux systèmes. Un environnement hydrodynamique différent et un pH non régulé en fiole d'Erlenmeyer sont

probablement les principales explications de ces différences. Néanmoins, les effets bénéfiques des hydrolysats sur les performances d'une culture de cellules CHO ont été confirmés en bioréacteur, avec une augmentation de la concentration maximale de cellules viables de 60 % et de la production d'AcM d'environ 200 %. Les composés actifs des hydrolysats de levure peuvent donc influencer de la même façon la réponse cellulaire, et ce, en dépit des différences des valeurs des paramètres physico-chimiques, tels que le pH, ou de la géométrie du système de culture.

Est-il possible de mieux déterminer la nature biochimique et le rôle des composés actifs des hydrolysats de levure ?

Le procédé de nanofiltration permet de simplifier l'EXL sans altérer ses effets.

Le procédé de nanofiltration, comprenant 8 étapes de diafiltrations, a permis d'isoler les molécules de hauts PM dans la fraction rétentat, qui représente 24 % de la quantité de l'EXL, et les molécules de PM inférieurs à 500 Da dans la fraction perméat. La fraction perméat améliore les performances de culture de manière similaire à l'EXL. Cette fraction a l'avantage d'être exempte de macromolécules (polysaccharides, acides nucléiques et polypeptides). L'utilisation de la fraction perméat à la place de l'EXL dans un procédé de culture de cellules facilitera les étapes de purification de la protéine recombinante. Le procédé de nanofiltration se révèle donc attractif pour simplifier la composition de l'EXL sans altérer ses effets positifs.

Les di et tri-peptides semblent être intégrés dans le métabolisme énergétique des cellules.

Le perméat de nanofiltration est composé, d'une part, de molécules déjà contenues dans le milieu de culture, tels que les acides aminés, les vitamines, le glucose, les nucléosides et les sels, et, d'autre part, de tréhalose et de di et tri-peptides. Les fractions d'acides aminés et de tréhalose ont été reconstituées artificiellement. Ces mélanges de molécules n'ont montré aucun effet sur la cinétique de croissance des cellules cultivées dans le milieu de référence. Les acides aminés et le tréhalose ne sont donc pas à l'origine de l'effet stimulateur du perméat. Par ailleurs, le perméat apporte des substrats azotés métabolisés par les cellules qui permettent aux cellules de proliférer malgré une faible concentration en glutamine. Nos résultats suggèrent donc fortement l'intérêt des di et tri-peptides en tant que composés nutritifs efficaces pour améliorer les performances de culture. L'existence

de transporteurs spécifiques sur les membranes plasmiques des cellules CHO pourrait être à l'origine de cette amélioration.

Le rétentat de nanofiltration stimule la vitesse spécifique de croissance et améliore le métabolisme énergétique.

Le rétentat de nanofiltration stimule la vitesse spécifique de croissance des cellules. De manière concomitante, il favorise l'intégration du pyruvate et de l' α KG dans le cycle TCA. Il augmente donc la production d'énergie via le cycle oxydatif. Par contre, il n'améliore pas le rendement de cellules produites par mole de glutamine consommée. Le rétentat n'alimente donc pas le cycle TCA en substrats azotés malgré une quantité importante de peptides (47 % g/g). Les résultats suggèrent donc la présence de molécules non nutritives dans le rétentat, de PM supérieur à 500 Da, qui stimulent la vitesse spécifique de croissance et améliorent parallèlement le métabolisme énergétique.

L'augmentation de la proportion de molécules de haut PM dans l'EXL améliore ses effets positifs.

Un procédé de nanofiltration, incluant deux étapes de diafiltrations au lieu de huit, a été mis en œuvre pour produire un rétentat partiellement exempt de molécules de faibles PM. Ce rétentat améliore l'effet de l'EXL sur la cinétique de croissance cellulaire. Ces résultats confirment l'intérêt de combiner l'effet de molécules de tailles différentes et possédant des fonctions différentes comme suggéré lors des études sur le mélange d'EXL et de peptone P.A.

Comment caractériser les propriétés physico-chimiques des composés actifs d'hydrolysats de levure par fractionnements chromatographiques ?

La chromatographie d'échange d'ions permet d'isoler une fraction active chargée positivement.

Un procédé de CLBP-EI a été mis en œuvre pour fractionner les molécules de l'EXL nanofiltré (rétentat de nanofiltration) selon leur charge électrique. A l'issue du procédé, une fraction chargée positivement et deux fractions chargées plus ou moins négativement ont été isolées. Seule la fraction contenant les molécules chargées positivement présente une activité similaire à celle de l'EXL nanofiltré sur la croissance des cellules CHO. Ainsi,

les molécules actives de l'EXL nanofiltré sont chargées positivement et n'incluent pas les acides nucléiques qui ont été isolés dans les autres fractions. Le procédé de CLBP-EI est donc intéressant pour améliorer le procédé de raffinage de l'EXL.

La chromatographie d'exclusion de taille ne permet pas de sélectionner les composés actifs selon leur PM.

Un procédé de CLBP-ET a permis d'obtenir trois fractions à partir de l'EXL nanofiltré dont une qui contient une distribution de peptides similaires à l'EXL nanofiltré et deux enrichies en peptides de 200 à 800 Da et de 800 à 2000 Da. Ces fractions stimulent la croissance cellulaire de manière similaire à l'EXL. L'activité des molécules de l'EXL nanofiltré ne semble pas être liée à leur PM. Ces résultats peuvent aussi s'expliquer par le manque de sélectivité du fractionnement par CLBB-ET mis en œuvre ou la faible gamme de PM des molécules contenues dans l'EXL nanofiltré.

Grâce à un fractionnement séquentiel par trois procédés chromatographiques, l'effet spécifique de peptides cationiques a été mis en évidence.

Un procédé de fractionnement, qui inclut séquentiellement une CLBP-EI, IH et ET, a été mis en œuvre pour isoler les biomolécules de l'EXL nanofiltré selon leur charge électrique, leur hydrophobie et leur PM. En utilisant ces fractions en culture, l'activité des biomolécules de l'EXL sur la croissance cellulaire a pu être reliée à leurs propriétés physico-chimiques. De plus, l'analyse de certaines fractions a permis de caractériser plus précisément les molécules responsables de l'activité de l'EXL nanofiltré. Ainsi, les peptides composés de 3 à 15 acides aminés de lysine et arginine ont été identifiés comme promoteurs de la croissance de cellules CHO. Ces peptides cationiques ont déjà été décrits dans la littérature pour leur intérêt à transporter des molécules thérapeutiques à l'intérieur des cellules. C'est donc le transport de nutriments à l'intérieur des cellules qui pourrait expliquer l'effet promoteur de ces peptides. L'utilisation de peptides cationiques dans la formulation de milieux de culture de cellules de mammifères s'avère donc une piste prometteuse.

Les effets des composés chargés positivement sont validés en système de culture agité.

Les travaux réalisés avec des cultures en microplaque ont permis de sélectionner les fractions chromatographiques qui présentent un effet promoteur similaire à celui de l'EXL sur la croissance des cellules CHO. De plus, l'effet de la fraction chargée positivement, issue du procédé par CLBP-EI, a été validé avec des cellules cultivées en fiole agitée.

Ainsi, nos résultats permettent de mieux appréhender le mécanisme d'action des hydrolysats de levure sur des cellules CHO productrices d'anticorps recombinants. Ils précisent également l'importance de mieux contrôler leur mode d'utilisation. De plus, ils aboutissent à une caractérisation physico-chimique fine des composés actifs de l'EXL. Enfin, nos résultats proposent des voies d'optimisation pour l'amélioration et la simplification de suppléments de milieux de culture dédiés à la culture de cellules de mammifères.

Perspectives

Nos travaux ont mis en évidence l'intérêt de compléter un milieu de culture de cellules CHO productrices d'AcM par des hydrolysats de levure pour améliorer les performances du procédé. Nous avons étudié l'influence de différentes conditions d'utilisation de trois hydrolysats (concentration, temps d'ajout, mélange) sur les paramètres cinétiques de culture. Les résultats montrent que les conditions d'utilisation des hydrolysats influencent grandement les performances de culture. Ainsi, pour optimiser l'utilisation d'hydrolysat dans un procédé de culture la gamme des paramètres testés pourrait être élargie en s'orientant par exemple vers des études de mélanges. D'autre part, le suivi du glucose et de la glutamine a souligné la limitation de ces substrats en fin de phase de croissance. Cependant, alors que le glucose n'a pas permis d'améliorer la concentration maximale de croissance, un effet inhibiteur de la glutamine a été observé. L'accumulation de métabolites secondaires, comme les ions ammonium ou le lactate, est sans doute à l'origine de cette inhibition. Il pourrait être pertinent de lever ces limitations en substrats en cultivant les cellules dans un bioréacteur semi-continu ou perfusé. De plus, bien que l'ajout d'hydrolysats en cours de culture n'ait pas permis de stimuler la production d'IgG, contrairement à un ajout initial, il serait intéressant d'évaluer leur potentiel pour maintenir la croissance de cellules cultivées dans un réacteur perfusé.

Notre étude a également apporté une meilleure compréhension de l'influence des hydrolysats sur la physiologie des cellules CHO, par des analyses cinétiques détaillées de la production d'AcM, de la croissance, de la mort et du métabolisme cellulaires. Néanmoins, une étude approfondie des intermédiaires clés du métabolisme central carboné, comme le pyruvate, le citrate ou l' α KG, permettrait de mieux caractériser l'effet des hydrolysats sur le métabolisme énergétique. De même, une analyse des flux métaboliques pourrait aussi être une méthode pertinente pour compléter ces travaux. D'autre part, nous avons mis en évidence l'effet d'une peptone sur la production spécifique d'IgG. L'analyse, par RT-PCR, de la quantité d'ARNm codant pour l'AcM par rapport aux ARNm totaux permettrait de définir si la peptone stimule spécifiquement l'expression de l'IgG ou si elle augmente globalement l'activité de synthèse des cellules. De plus, le suivi de la dégradation de l'IgG, avec ou sans peptone, permettrait de confirmer l'hypothèse de son activité anti-protéasique.

L'approche intégrative, développée dans notre étude qui inclut un procédé de fractionnement, la caractérisation des fractions, leur reconstitution et l'étude de leur influence sur les paramètres cinétiques de culture, a permis de mettre en évidence le bénéfice des di et tri-peptides apportés par l'EXL sur les performances de culture. Cette activité peut s'expliquer par l'existence de transporteurs spécifiques de di et tri-peptides, PepT1 et PepT2, connus pour être moins énergivores que ceux des acides aminés libres (Daniel et *al.*, 1992). Néanmoins, les cellules CHO n'exprimeraient que faiblement ces transporteurs (Fujisawa et *al.*, 2006). Il serait donc intéressant de caractériser leur taux d'expression pour mieux comprendre le mode d'action des di et tri-peptides. Selon les résultats, il pourrait être envisagé d'augmenter leur taux d'expression pour améliorer l'hôte cellulaire. De plus, un fractionnement par CLBP-ET de la fraction de l'EXL exclue par la membrane de nanofiltration pourrait être réalisé afin d'isoler les di et tri-peptides. Ainsi, nous pourrions valider que l'effet de l'EXL sur la croissance cellulaire est principalement lié à la présence de ces peptides. De même, ces travaux permettraient de diminuer la complexité de l'EXL et de proposer des formulations mieux maîtrisées des milieux de culture. Enfin, le fractionnement de ces peptides par des procédés de chromatographie d'échange d'ions ou d'interactions hydrophobes permettrait d'évaluer l'influence de leur séquence.

D'autre part, la production d'AcM n'a pu être améliorée que par un ajout de 4 g/L de perméat, bien que la croissance cellulaire soit similaire à 1 ou 4 g/L. De plus, le faible impact des hydrolysats sur l'osmolarité du milieu de culture a suggéré la présence, dans les hydrolysats, de facteurs qui stimulent la production d'AcM. De manière intéressante, nous avons montré que l'ajout de 4 g/L de perméat augmentait de manière significative la quantité de trois vitamines par rapport à celles contenues dans le milieu de référence. Or, des travaux ont montré que l'ajout de vitamines dans un milieu de référence améliore la production spécifique de protéines recombinantes (Kurano et *al.*, 1990 ; Kim et *al.*, 2006). Il serait donc intéressant d'évaluer spécifiquement le rôle des vitamines de l'EXL sur la production d'AcM. De même, il serait pertinent de mettre en œuvre la même démarche d'étude, pour mieux identifier la nature biochimique et le rôle des molécules d'intérêt de la peptone P.A qui contient apparemment des facteurs spécifiques améliorant la production d'AcM.

Le fractionnement séquentiel par CLBP-EI, IH et ET, couplé à la caractérisation de certaines fractions, a mis en évidence l'activité promotrice de la croissance cellulaire de peptides cationiques. De nombreux travaux décrivent le mécanisme d'action des peptides cationiques, utilisés pour transporter des molécules thérapeutiques à l'intérieur des cellules (Schmidt et *al.*, 2010). Le transport des nutriments à l'intérieur des cellules pourrait donc expliquer l'effet promoteur de croissance de ces peptides. Nous avons effectivement montré que la fraction rétentat qui contient ces peptides présente un effet sur la croissance cellulaire qui est couplé à une amélioration de la production d'énergie via le cycle oxydatif. Il est donc vraisemblable que les peptides cationiques stimulent la prolifération cellulaire en facilitant l'apport de nutriments à l'intérieur de la cellule permettant ainsi une meilleure alimentation du cycle TCA. L'étude de l'influence de peptides cationiques synthétiques sur le métabolisme cellulaire permettrait de confirmer cette hypothèse. Pour finir, il serait indispensable de valider et d'élargir nos travaux à d'autres procédés de culture mettant en œuvre d'autres lignées cellulaires.

Ainsi, nos travaux ouvrent un large champ d'investigation pour une meilleure compréhension des exigences des cellules de mammifères cultivées à grande échelle. A terme, ces études pourraient permettre d'envisager la formulation de milieux de culture chimiquement définis, sans protéines et sans molécules d'origine animale qui soient aussi performants que ceux actuellement complétés avec des hydrolysats.

Références bibliographiques

A

Afshari CA & Barrett JC, 1994.

Disruption of G0-G1 arrest in quiescent and senescent cells treated with phosphatase inhibitors. *Cancer Research*, 54(9): 2317–2321.

Ahn WS & Antoniewicz MR, 2011.

Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metabolic Engineering*, 13(5): 598-609.

Ajibola CF, Fashakin JB, Fagbemi TN & Aluko RE, 2011.

Effect of Peptide Size on Antioxidant Properties of African Yam Bean Seed (*Sphenostylis stenocarpa*) Protein Hydrolysate Fractions. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10): 6685–6702.

Al-Rubeai M, Singh RP, Glodman MH & Emery AN, 1995.

Death mechanisms of animal cells in conditions of intensive agitation. *Biotechnology and Bioengineering*, 45(6): 463–472.

Al- Rubeai M, Khoo SHG & Singh RP, 2009.

Apoptosis. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, bioseparation, and cell technology*, edited by Flickinger MC, 2009 John Wiley & Sons, Inc., Irelande.

Altamirano C, Parades C, Illanes A, Cairo JJ & Godia F, 2004.

Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. *Journal of Biotechnology*, 110(2): 171–179.

Altamirano C, Illanes A, Casablanco A, Gamez X, Cairo JJ & Godia C, 2001.

Analysis of CHO Cells Metabolic Redistribution in a Glutamate-Based Defined Medium in Continuous Culture. *Biotechnology Progress*, 17(6): 1032–1041.

Altamirano C, Illanes A, Becerra S, Cairo JJ & Godia F, 2006.

Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *Journal of biotechnology*, 125(4): 547–556.

Altamirano C, Parades C, Cairo JJ & Godia F, 2000.

Improvement of CHO Cell Culture Medium Formulation: Simultaneous Substitution of Glucose and Glutamine. *Biotechnology Progress*, 16(1): 69–75.

Amiot J, Germain L, Turgeon S, Lemay M, Ory-salam C & Auger A, 2004.

Peptides from milk protein hydrolysates to improve the growth of human keratinocytes in culture. *International Dairy Journal*, 14(7): 619–626.

Arden N & Betenbaugh MJ, 2006.

Regulating apoptosis in mammalian cell cultures. *Cytotechnology*, 50(1-3): 77–92.

Armand R, Cooper S, Song F & Zhao D, 2011.

Accelerating cell culture media and feed process using high-throughput platforms and

workflows. *Poster presentation ESACT vienna - Merck EMD-Millipore.*

B

Babcock JF, Antosh A, Benedict K & Benson D, 2011.

Cottonseed hydrolysate facilitates the consumption of lactate in CHO cell cultures resulting in an extended growth profile and a significant increase in target protein yield. *Poster presentation ESACT vienna - Sheffield Bio-Science.*

Babcock JF, Benedict K & Perlan AL, 2011.

Application of complex and chemically-defined medium supplements towards cell line specific performance of biopharmaceutical production systems. *Poster presentation ESACT vienna - Sheffield Bio-Science.*

Balcarcel RR & Stephanopoulos G, 2001.

Rapamycin reduces hybridoma cell death and enhances monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 76(1): 1–10.

Ballez JS, Mols J, Burtéau C, Agathos SN & Schneider YJ, 2004.

Plant protein hydrolysates support CHO-320 cells proliferation and recombinant IFN-gamma production in suspension and inside microcarriers in protein-free media. *Cytotechnology*, 44(3): 103–114.

Barbouche N, 2008.

Réponse biologique de cellules animales à des contraintes hydrodynamiques: simulation numérique, expérimentation et modélisation en bioréacteurs de laboratoire. *PHD. INPL. Procédés biotechnologiques et alimentaires*: 349.

Barnes LM & Dickson AJ, 2006.

Mammalian cell factories for efficient and stable protein expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(4): 381–6.

Batista FR, Pereira CA, Mendonça RZ & Moraes AM, 2008.

Formulation of a protein-free medium based on IPL-41 for the sustained growth of *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Cytotechnology*, 57(1): 11–22.

Bauer DE, Harris MH, Plas DR, Lum JJ, Hammerman PS, Rathmell JC, Riley JL & Thompson CB, 2004.

Cytokine stimulation of aerobic glycolysis in hematopoietic cells exceeds proliferative demand. *The FASEB Journal*, 18(11): 1303–1305.

Berrios J, Altamirano C, Nelson O & Gonzalez R, 2011.

Continuous CHO cell cultures with improved recombinant protein productivity by using mannose as carbon source: Metabolic analysis and scale-up simulation. *Chemical Engineering Science*, 66(11): 2431–2439.

Birch JR & Racher AJ, 2006.

Antibody production. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(5-6): 671–685.

- Bonarius HP, Houtman JH, Schmid G, de Gooijer CD & Tramper J, 2000.
Metabolic-flux analysis of hybridoma cells under oxidative and reductive stress using mass balances. *Cytotechnology*, 32(2): 97–107.
- Bonarius HP, Hatzimanikatis V, Meesters KP, de Gooijer CD, Schmid G & Tramper J, 1996.
Metabolic flux analysis of hybridoma cells in different culture media using mass balances. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(3): 299–318.
- Brand K, 1985.
Glutamine and glucose metabolism during thymocyte proliferation. Pathways of glutamine and glutamate metabolism. *Biochemical Journal*, 228(2): 353–361.
- Brinkmann M, Lutkemeyer D, Gudermann F & Lehmann J, 2002.
New technologies for automated cell counting based on optical image analysis: the Cellscreen. *Cytotechnology*, 38(1): 119–127.
- Burky JE, Wesson MC, Young A, Farnsworth S, Dionne B, Zhu Y, Hartman TE, Qu L, Zhou W & Sauer PW, 2007.
Protein-free fed-batch culture of non-GS NS0 cell lines for production of recombinant antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(2): 281–293.
- Burteau CC, Verhoeve FR, Mols JF, 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-gamma producing CHO cell line. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 39(7): 291–296.
- Burton DR & Woof JM, 1992.
Human antibody effector function. *Advances in Immunology*, 51: 1–84.
- Butler M, 2005.
Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(3): 283–291.

C

- Carter PJ, 2011.
Introduction to current and future protein therapeutics: A protein engineering perspective. *Experimental Cell Research*, 317(9): 1261–1269.
- Carvalho AV, Marcelino I & Carrondo, MJT, 2003.
Metabolic changes during cell growth inhibition by p27 overexpression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(2): 164–173.
- Carvalho AV, Santos SS, Calado J, Haury M, Carrondo MJ, 2003.
Cell Growth Arrest by Nucleotides, Nucleosides and Bases as a Tool for Improved Production of Recombinant Proteins. *Biotechnology Progress*, 19(1): 69–83.
- Carvalho AV, Santos SS & Carrondo MJ, 2011.

Extracellular purine and pyrimidine catabolism in cell culture. *Biotechnology Progress*, 27(5): 1373–1382.

Castillo A, Victores S, Fernandez O, Dustet J, Pazos F, Rodriguez Y & Torres F, 2011. Evaluation of different protein free media for NSO cell line using a statistical design and metabolic flux analysis. *Poster presentation ESACT vienna - Havana University, Cuba*.

Chabanon G, Alves da Costa L, Farges B, Harscoat C, Chenu S, Goergen JL, Marc A, Marc I & Chevalot I, 2008.

Influence of the rapeseed protein hydrolysis process on CHO cell growth. *Bioresource Technology*, 99(15): 7143–7151.

Chabeaud A, Vandanjon L, Bourseau P, Jaouen P & Guerrard F, 2009.

Fractionation by ultrafiltration of a saithe protein hydrolysate (*Pollachius virens*): Effect of material and molecular weight cut-off on the membrane performances. *Journal of Food Engineering*, 91(3): 408–414.

Chakraborty N, Menze MA, Malsam J, Aksan A, Hand SC & Toner M, 2011.

Cryopreservation of spin-dried mammalian cells. *PloS One*, 6(9): e24916.

Chang KH, Kim KS & Kim JH, 1999.

N-acetylcysteine increases the biosynthesis of recombinant EPO in apoptotic Chinese hamster ovary cells. *Free Radical Research*, 30(2): 85–91.

Chartrain M & Chu L, 2008.

Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in Mammalian cell expression systems: an overview of the current upstream technologies. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9(6): 447–467.

Chen A, Chitta R, Chang D & Amanullah A, 2009.

Twenty-four well plate miniature bioreactor system as a scale-down model for cell culture process development. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1): 148–160.

Chen K, Liu Q, Xie L, Sharp PA & Wang DI, 2001.

Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(1): 55–61.

Chen P & Harcum SW, 2006.

Effects of elevated ammonium on glycosylation gene expression in CHO cells. *Metabolic Engineering*, 8(2): 123–132.

Chon JH & Zarbis-Papastoitsis G, 2011.

Advances in the production and downstream processing of antibodies. *New Biotechnology*, 28(5): 458–463.

Chong WP, Yusufi FN, Lee DY, Reddy SG, Wong NS, Heng CK, Yap MG & Ho YS, 2011.

Metabolomics-based identification of apoptosis-inducing metabolites in recombinant fed-batch CHO culture media. *Journal of Biotechnology*, 151(2): 218–224.

- Christie A & Butler M, 1999.
The adaptation of BHK cells to a non-ammoniagenic glutamate-based culture medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 64(3): 298–309.
- Christie A & Butler M, 1994.
Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase. *Journal of Biotechnology*, 37(3): 277–290.
- Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL & Cantley LC, 2008.
The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*, 452(7184): 230–233.
- Chua FK, Yap MG & Oh SK, 1994.
Hyper-stimulation of monoclonal antibody production by high osmolarity stress in eRDF medium. *Journal of Biotechnology*, 37(3): 265–275.
- Chun BH, Kim JH, Lee HJ & Chung N, 2007.
Usability of size-excluded fractions of soy protein hydrolysates for growth and viability of Chinese hamster ovary cells in protein-free suspension culture. *Bioresource technology*, 98(5): 1000–1005.
- Chuppa S, Tsai YS, Yoon S, Shackleford S, Rozales C, Bhat R, Tsay G, Matanguihan C, Konstantinov N & Naveh D, 1997.
Fermentor temperature as a tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 55(2): 328–338.
- Clincke MF, Goergen JL, Guedon E, 2011.
Procédés de production de protéines recombinantes thérapeutiques: vers une maîtrise de la glycosylation. *Technique de l'ingénieur*, BIO62000.
- Clincke MF, Guedon E, Yen TF, Ogier V, Roitel O, Goergen JL, 2011.
Effect of surfactant pluronic F-68 on CHO cell growth, metabolism, production, and glycosylation of human recombinant IFN- γ in mild operating conditions. *Biotechnology progress*, 27(1):181-190.
- Collarini EJ & Oxender DL, 1987.
Mechanisms of Transport of Amino Acids Across Membranes. *Annual Review of Nutrition*, 7(1): 75–90.
- Cruz HJ, Moreira JL & Carrondo MJ, 1999.
Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 66(2): 104–113.
- Cudna RE & Dickson AJ, 2003.
Endoplasmic reticulum signaling as a determinant of recombinant protein expression. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(1): 56–65.
- Cudna RE & Dickson AJ, 2006.
Engineering responsiveness to cell culture stresses: Growth arrest and DNA damage gene

153 (GADD153) and the unfolded protein response (UPR) in NS0 myeloma cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(3): 514–521.

D

Daniel H, Morse EL & Adibi SA, 1992.
Determinants of substrate affinity for the oligopeptide/H⁺ symporter in the renal brush border membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(14): 9565–9573.

Desclaux S & Remigy JC, 2007.
Filtration membranaire (OI, NF, UF) - Présentation des membranes et modules. *Techniques de l'ingénieur* : w4090.

Dez C & Tollervey D, 2004.
Ribosome synthesis meets the cell cycle. *Current Opinion in Microbiology*, 7(6): 631–637.

Dick LW, Kakaley JA, Mahon D, Qiu D & Cheng KC, 2009.
Investigation of proteins and peptides from yeastolate and subsequent impurity testing of drug product. *Biotechnology Progress*, 25(2): 570–577.

Donaldson MS, Shuler ML, 1998.
Low-cost serum-free medium for the BTI-Tn5B1-4 insect cell lin. *Biotechnology Progress*, 14(4):573-579.

Dorai, H, Kyung YS, Ellis D, Kinney C, Lin C, Jan D, Moore G & Betenbaugh MJ, 2009.
Expression of anti-apoptosis genes alters lactate metabolism of Chinese Hamster Ovary cells in culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(3): 592–608.

Dudziak G, Fey S, Hasbach L, Kragl U, 1999.
Nanofiltration for purification of nucleotide sugars. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 18(1): 41-49.

Duval D, Demengel C, Miossec S & Geahel I, 1992.
Role of metabolic waste products in the control of cell proliferation and antibody production by mouse hybridoma cells. *Hybridoma*, 11(3): 311–322.

E

Eagle H, 1959.
Amino acid metabolism cell cultures. *Science*, 130(3373):432-437.

Engström W & Zetterberg A, 1984.
The relationship between purines, pyrimidines, nucleosides, and glutamine for fibroblast cell proliferation. *Journal of Cellular Physiology*, 120(2): 233–241.

Europa AF, Gambhir A, Fu PC, Hu WS, 2000.
Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of

mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(1): 25–34.

F

Farges B, Chenu S, Marc A & Goergen JL, 2008.

Kinetics of IFN-gamma producing CHO cells and other industrially relevant cell lines in rapeseed-supplemented batch cultures. *Process Biochemistry*, 43(9): 945–953.

Farges-Haddani B, Tessier B, Chenu S, Chevalot I, Marc I, Goergen JL, Marc A, 2006.

Peptide fractions of rapeseed hydrolysates as an alternative to animal proteins in CHO cell culture media. *Process Biochemistry*, 41(11): 2297–2304.

Feron O, 2009.

Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiotherapy and Oncology*, 92(3), p.329–333.

Franěk F & Fussenegger M, 2005.

Survival factor-like activity of small peptides in hybridoma and CHO cells cultures. *Biotechnology Progress*, 21(1): 96–98.

Franěk F, Hohenwarter O & Katinger H, 2000.

Plant protein hydrolysates: preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures. *Biotechnology Progress*, 16(5): 688–692.

Franěk F & Katinger H, 2002.

Specific Effects of Synthetic Oligopeptides on Cultured Animal Cells. *Biotechnology Progress*, 18(1): 155–158.

Franěk F, 2004.

Gluten of spelt wheat (*Triticum aestivum* subspecies *spelta*) as a source of peptides promoting viability and product yield of mouse hybridoma cell cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13): 4097–4100.

Franěk F, Eckschlager T & Katinger H, 2003.

Enhancement of monoclonal antibody production by lysine-containing peptides. *Biotechnology Progress*, 19(1): 169–174.

Froud SJ, 1999.

The development, benefits and disadvantages of serum-free media. *Developments in biological standardization*, 99(1999): 157–166.

Fujisawa Y, Tateoka R, Nara T, Kamo N, Taira T & Miyauchi S, 2006.

The extracellular pH dependency of transport activity by human oligopeptide transporter 1 (hPEPT1) expressed stably in Chinese hamster ovary (CHO) cells: a reason for the bell-shaped activity versus pH. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29(5): 997–1005.

G

Gagnon M, Hiller G, Luan YT, Kittredge, DeFelice J & Frapeau D, 2011.
High-End pH-controlled delivery of glucose effectively suppresses lactate accumulation in CHO Fed-batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(6): 1328–1337.

Genzel Y, Ritter JB, König S, Alt R & Reichl U, 2005.
Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. *Biotechnology Progress*, 21(1): 58–69.

Gerber DE, 2008.
Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *American Family Physician*, 77(3): 311–319.

Glacken MW, Fleischaker RJ & Sinskey AJ, 1986.
Reduction of waste product excretion via nutrient control: Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(9): 1376–1389.

Godoy- Silva R, Chalmers JJ, Casnocha SA, Bass La & Ma N, 2009.
Physiological responses of CHO cells to repetitive hydrodynamic stress. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(6): 1103–1117.

Godia F, Cairo JJ, Panesar PS & Kennedy JF, 2006.
Ozturk SS and Hu WS, Editors, cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies, CRC Press, Taylor & Francis group, Boca Raton, FL, USA, 2006. International journal of biological macromolecules 39 (4-5)-321-321.

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(3): 189–195.

Gomez N, Ouyang J, Nguyen MD, Vinson AR, Lin AA & Yuk IH, 2010.
Effect of temperature, pH, dissolved oxygen, and hydrolysate on the formation of triple light chain antibodies in cell culture. *Biotechnology Progress*, 26(5): 1438–1445.

González-Leal IJ, Carrillo-Cocom LM, Ramirez-Medrano A, Lopez-Pacheco F, Bulnes-Abundis D, Webb-Vargas Y & Alvarez MM, 2011. Use of a Plackett-Burman statistical design to determine the effect of selected amino acids on monoclonal antibody production in CHO cells. *Biotechnology Progress*, 27(6): 1709–1717.

Grillberger L, Kreil TR, Nasr S & Reiter M, 2009. Emerging trends in plasma-free manufacturing of recombinant protein therapeutics expressed in mammalian cells. *Biotechnology Journal*, 4(2): 186–201.

Guppy M, Greiner E & Brand K, 1993.
The role of the crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes. *European journal of biochemistry*, 212(1):95-99.

H

Ham RG, 1974.

Unique requirements for clonal growth. *Journal of the National Cancer Institute*, 53(5):1459-1463.

Han YK, Koo TY & Lee GM, 2009.

Enhanced interferon-beta production by CHO cells through elevated osmolality and reduced culture temperature. *Biotechnology Progress*, 25(5): 1440–1447.

Hansen K, Kjalke M, Rasmussen PB, Kongerslev L & Ezban M, 1997.

Proteolytic cleavage of recombinant two-chain factor VIII during cell culture production is mediated by protease(s) from lysed cells : The use of pulse labelling directly in production medium. *Cytotechnology*, 24(3): 227–234.

Hansen HA & Emborg C, 1994.

Extra- and intracellular amino acid concentrations in continuous chinese hamster ovary cell culture. *Applied microbiology biotechnology*, 41(5):560-564.

Heidemann R, Zhang C, Qi H, Larrick Rule J, Rozales C, Park S, Chuppa S, Ray M, Michaels J, Konstantinov K & Naveh D, 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(2): 157–167.

Hermes PA & Castro CD, 2010.

A fully defined, fed-batch, recombinant NS0 culture process for monoclonal antibody production. *Biotechnology Progress*, 26(5): 1411–1416.

Hink WF, 1970.

Established insect cell line from the cabbage looper, trichoplusia ni. *Nature*, 226(5244):466-470.

Ho Y, Varley J & Mantalaris A, 2006.

Development and analysis of a mathematical model for antibody-producing GS-NS0 cells under normal and hyperosmotic culture conditions. *Biotechnology Progress*, 22(6): 1560–1569.

Holben DH & Smith AM, 1999.

The diverse role of selenium within selenoproteins. *J am diet assoc*, 99(7):836-843.

Hossler P, Khattak SF & Li ZJ, 2009.

Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology*, 19(9): 936 –949.

Hou JJC, Codamo J, Pilbrough W, Hughes B, Gray PP & Munro TP, 2011.

New frontiers in cell line development: challenges for biosimilars. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86(7): 895–904.

Hu W, Berdugo C & Chalmers JJ, 2011.

The potential of hydrodynamic damage to animal cells of industrial relevance: current understanding. *Cytotechnology*, 63(5): 445–460.

Hwang SO & Lee GM, 2008.

Nutrient deprivation induces autophagy as well as apoptosis in Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(3): 678–685.

Hyde R, Taylor PM & Hundal HS, 2003.

Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. *The Biochemical Journal*, 373(Pt 1): 1–18.

I

Ibarra N, Watanabe S, Bi JX, Shuttleworth J & Al-Rubeai M, 2003.

Modulation of cell cycle for enhancement of antibody productivity in perfusion culture of NS0 cells. *Biotechnology Progress*, 19(1): 224–228.

Ikonomou L, Bastin G, Schneider YJ & Agathos SN, 2001.

Design of an efficient medium for insect cell growth and recombinant protein production. *In vitro cellular & Developmental Biology- Animal*, 37(9):549-559.

J

Jain E & Kumar A, 2007. Upstream processes in antibody production: Evaluation of critical parameters. *Biotechnology Advances*, 26(1): 46–72.

Jan DC, Jones SJ, Emery AN & Al-Rubeai, 1994.

Peptone, a low-cost growth-promoting nutrient for intensive animal cell culture. *Cytotechnology*, 16(1): 17–26.

Jayapal KP, Wlaschin KF, Hu WS & Yap MGS, 2007.

Recombinant protein therapeutics from CHO cells: 20 years and counting. *Chemical Engineering Progress*, 103(10): 40–47.

Jefferis R, 2005.

Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnology Progress*, 21(1): 11–16.

Jefferis R, 2009.

Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(7): 356–362.

Jenkins HA, Butler M & Dickson AJ, 1992.

Characterization of glutamine metabolism in two related murine hybridomas. *Journal of Biotechnology*, 23(2): 167–182.

de Jesus MJ, Girard P, Bourgeois M, Baumgartner G, Jacko B, Amstutz H & Wurm FM,

2004.

TubeSpin satellites: a fast track approach for process development with animal cells using shaking technology. *Biochemical Engineering Journal*, 17(2004): 217-223.

de Jesus M & Wurm FM, 2011.

Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(2): 184–188.

Jiang Z & Sharfstein ST, 2008.

Sodium butyrate stimulates monoclonal antibody over-expression in CHO cells by improving gene accessibility. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(1): 189–194.

Joost HG & Thorens B, 2001.

The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Molecular Membrane Biology*, 18(4): 247–256.

Joyner DE, Jones KB, Lessnick SL, Schiffman JD & Randall RL, 2011.

Potential for modulation of the fas apoptotic pathway by epidermal growth factor in sarcomas. *Sarcoma*, 847409.

Ju HK, Hwang SJ, Jeon CJ, Lee GM, Yoon SK, 2009.

Use of NaCl prevents aggregation of recombinant COMP-Angiopoietin-1 in Chinese hamster ovary cells. *Jornal of Biotechnology*, 143(2): 145-150.

K

Kapel R, Rahhou E, Lecouturier D, Guillochon D & Dhulster P, 2006.

Characterization of an antihypertensive peptide from an Alfalfa white protein hydrolysate produced by a continuous enzymatic membrane reactor. *Process Biochemistry*, 41(9):1961-1966.

Kang S, Mullen J, Miranda LP & Deshpande R, 2012.

Utilization of tyrosine- and histidine-containing dipeptides to enhance productivity and culture viability. *Biotechnology and bioengineering*, in press: DOI 10.1002/bit.24507.

Kantardjieff A, Nissom PM, Chuah SH, Yusufi F, Jacob NM, Mulukutla BC, Yap M &

Hu Wu, 2009. Developing genomic platforms for Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Advances*, 27(6): 1028–1035.

Kastan MB & Bartek J, 2004.

Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432(7015): 316–323.

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(3): 153–163.

Kelley B, 2009.

Industrialization of mAb production technology The bioprocessing industry at a crossroads. *mAbs*, 1(5): 443–452.

Kim DY, Lee JC, Chang HN & Oh DJ, 2006.
Development of serum-free media for a recombinant CHO cell line producing recombinant antibody. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3): 426–433.

Kim SH & Lee GM, 2009.
Development of serum-free medium supplemented with hydrolysates for the production of therapeutic antibodies in CHO cell cultures using design of experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(4): 639–648.

Kimura R & Miller WM, 2000.
Effects of elevated pCO₂ and/or osmolality on the growth and recombinant tPA production of CHO cells. *Biotechnology and bioengineering*, 52(1): 152-160.

Kochonawski N, Siriez G, Roosens S & Malphettes L, 2011.
Medium and feed optimization for fed-batch production of a monoclonal antibody in CHO cells. *BMC Proceedings 2011*, 5(Suppl 8): 75.

Kohler G & Milstein C, 1975.
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517): 495–497.

Kuczewski M, Schirmer E, Lain B & Zarbis-Papastoitsis G, 2011.
A single- use purification process for the production of a monoclonal antibody produced in a PER.C6 human cell line. *Biotechnology Journal*, 6(1): 56–65.

Kumar N, Gammell P, Meleady P, Henry M & Clynes M, 2008.
Differential protein expression following low temperature culture of suspension CHO-K1 cells. *BMC Biotechnology*, 8: 42.

Kurano S, Kurano N, Leist C & Fiechter A, 1990.
Utilization and stability of vitamins in serum-containing and serum-free media in CHO cell culture. *Cytotechnology*, 4(3): 243–250.

Kurokawa M & Sato S, 2011.
Growth and poliovirus production of Vero cells on a novel microcarrier with artificial cell adhesive protein under serum-free conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(5): 600–604.

Kuwae S, Ohda T, Tamashima H, Miki H & Kobayashi K, 2005.
Development of a fed-batch culture process for enhanced production of recombinant human antithrombin by Chinese hamster ovary cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(5): 502–510.

L

Lao MS & Toth D, 1997.

Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology Progress*, 13(5): 688–691.

Lee JC, Kim DY, Oh DJ & Chang HN, 2008.

Long-term operation of depth filter perfusion systems (DFPS) for monoclonal antibody production using recombinant CHO cells: Effect of temperature, pH, and dissolved oxygen. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(4): 401–409.

Legazpi L, Laca A & Díaz M, 2009.

Kinetic analysis of hybridoma cells viability under mechanical shear stress with and without serum protection. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(6): 717–722.

Legrand C, Bour JM, Jacob C, Capiaumont J, Martial A, Marc A, Wudtke M, Kretzmer G, Demangel C, Duval D et al. & Hache J, 1992.

Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in medium. *Journal of biotechnology*, 31(2):234.

Li F, Vijayasankaran N, Shen AY, Kiss R & Amanullah A, 2010.

Cell culture processes for monoclonal antibody production. *mAbs*, 2(5): 466–477.

Limke T, 2009.

Impact of ultrafiltration of hydrolysates. *Genetic engineering & biotechnology news*, 29 (1).

Lindgren K, Salmén A, Lundgren L, Bylund L, Ebler A, Fäldt E, Sörvik L, Fenge C & Skoging-Nyberg U, 2009.

Automation of cell line development. *Cytotechnology*, 59(1): 1–10.

Link, T, Bäckström M, Graham R, Essers R, Zörner K, Gätgens J, Burchell J, Taylor-Papadimitiou J, Hansson GC & Noll T, 2004.

Bioprocess development for the production of a recombinant MUC1 fusion protein expressed by CHO-K1 cells in protein-free medium. *Journal of Biotechnology*, 110(1): 51–62.

Liu CH, Chu IM & Hwang SM, 2001.

Factorial designs combined with the steepest ascent method to optimize serum-free media for CHO cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(4-5): 314–321.

Luo J, Vijayasankaran N, Autsen J, Santuray R, Hudson T, Aanullah A & Li F, 2012.

Comparative metabolite analysis to understand lactate metabolism shift in Chinese hamster ovary cell culture process. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(1): 146–156.

Luo Y & Chen G, 2007.

Combined approach of NMR and chemometrics for screening peptones used in the cell culture medium for the production of a recombinant therapeutic protein. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(6): 1654–1659.

M

- Ma N, Ellet J, Okediadi C, Hermes P, McCormick E & Casnocha S, 2009.
A single nutrient feed supports both chemically defined NS0 and CHO fed-batch processes: Improved productivity and lactate metabolism. *Biotechnology Progress*, 25(5): 1353–1363.
- Maranga L & Goochee CF, 2006.
Metabolism of PER.C6 cells cultivated under fed-batch conditions at low glucose and glutamine levels. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(1): 139–150.
- Martin-Orue C, Bouhallab S & Garem A, 1998.
Nanofiltration of amino acid and peptide solutions: mechanisms of separation. *Journal of Membrane Science*, 142(2): 225–233.
- Matés JM, Segura JA, Alonso FJ & Marquez J, 2008.
Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Archives of Toxicology*, 82(5): 273–299.
- Mendonça RZ, de Oliveira EC, Pereira CA & Lebrun I, 2007.
Effect of bioactive peptides isolated from yeastolate, lactalbumin and NZCase in the insect cell growth. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30(3): 157–164.
- Mercille & Massie, 1994.
Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells? *Biotechnology and bioengineering*, 44(9):1140-1154.
- Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, Mattaini KR, Yang J, Hiller K, Jewell CM, Johnson ZR, Irvine DJ, Guarente L, Kelleher JK, Vander Heiden MG, Iliopoulos O & Stephanopoulos G, 2011.
Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*, 481(7381): 380-384.
- Michiels JF, Barbau J, de Boel S, Dessy S, Agathos SN & Schneider YJ, 2011.
Characterisation of beneficial and detrimental effects of a soy peptone, as an additive for CHO cell cultivation. *Process Biochemistry*, 46(3): 671–681.
- Michiels JF, Sart S, Schneider YJ & Agathos SN, 2011.
Effects of a soy peptone on IFN- γ production steps in CHO-320 cells. *Process Biochemistry*, 46(9): 1759–1766.
- Miescher S, Zahn-Zabal M, de Jesus M, Moudry R, Fisch I, Vogel M, Kobr M, Imboden MA, Kragten E, Bichler J, Mermod N, Stadler BM, Amstutz H & Wurm F, 2000.
CHO expression of a novel human recombinant IgG1 anti-RhD antibody isolated by phage display. *British Journal of Haematology*, 111(1): 157-166
- Mols J, Peeters-Joris C, Agathos SN & Schneider YJ, 2004.
Origin of rice protein hydrolysates added to protein-free media alters secretion and extracellular proteolysis of recombinant interferon-gamma as well as CHO-320 cell

growth. *Biotechnology Letters*, 26(13): 1043–1046.

Mosser M, Kapel R, Aymes A, Bonnanno LM, Olmos E, Chevalot I, Marc I & Marc A, 2012.

Chromatographic fractionation of yeast extract: a strategy to identify physicochemical properties of compounds promoting CHO cell culture. *Process Biochemistry*, 47(7): 1178–1185.

Mulukutla B, Gramer M & Hu WS, 2012.

On metabolic shift to lactate consumption in fed-batch culture of mammalian cells. *Metabolic Engineering*, 14(2): 138–149.

Murakami H, Masui H, Sato GH, Sueoka N, Chow TP & Kano-Sueoka T, 1982.

Growth of hybridoma cells in serum-free medium: ethanolamine is an essential component. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(4): 1158–1162.

Mussauer H, Sukhorukov VL & Zimmermann U, 2001.

Trehalose improves survival of electrotransfected mammalian cells. *Cytometry*, 45(3): 161–169.

N

Nelson DL & Cox MM, 2004.

Amino acids, peptides and proteins. In Freeman WH & Co (Ed) *Lehninger: principles of biochemistry*, 4th edn, New York: chapter 3.

Nienow AW, 2006.

Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology*, 50(1-3): 9–33.

Nimmerjahn F & Ravetch JV, 2008.

Fc-gamma receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 8(1): 34–47.

Nyberg GB, Balcarcel RR, Follstad BD, Stephanopoulos G & Wang DIC, 1999.

Metabolism of peptide amino acids by chinese hamster ovary cells grown in a complex medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 62(3): 324–335.

O

O’Callaghan PM & James DC, 2008.

Systems biotechnology of mammalian cell factories. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 7(2): 95–110.

Olivier S & Mehtali M, 2009.

Alternative production systems for therapeutic monoclonal antibodies. *Medecine Sciences*, 25(12): 1163–1168.

P

Pasupuleti VK & Braum S, 2010.

State of the art manufacturing of protein hydrolysates. In Pasupuleti VK, Demain AL (ed) *Protein hydrolysates in biotechnology*, 1st edn. Springer, Netherland: 11-32.

Pasupuleti VK, Holmes C & Demain A, 2010.

Applications of protein hydrolysates in biotechnology. In Pasupuleti VK, Demain AL (ed) *Protein hydrolysates in biotechnology*, 1st edn. Springer, Netherland: 1-11.

Peña-Ramos EA, Xiong YL & Arteaga GE, 2004.

Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 84(14): 1908-1918.

Perreault J & Lemieux R, 1993.

Essential role of optimal protein synthesis in preventing the apoptotic death of cultured B cell hybridomas. *Cytotechnology*, 13(2): 99–105.

Peshwa MV, Kyung YS, McClure DB & Hu WS, 1993.

Cultivation of mammalian cells aggregates in bioreactors: effect of calcium concentration of spatial distribution of viability. *Biotechnology and Bioengineering*, 41(2):179-87.

Peterson E, Owens SM & Henry RL, 2006.

Monoclonal antibody form and function: manufacturing the right antibodies for treating drug abuse. *The AAPS Journal*, 8(2): 383–390.

Petiot E, Guedon E, Blanchard F, Gény C, Pinton H & Marc A, 2010.

Kinetic characterization of vero cell metabolism in a serum- free batch culture process. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(1): 143–153.

Petiot E, Fournier F, Gény C, Pinton H & Marc A, 2009.

Rapid Screening of Serum-Free Media for the Growth of Adherent Vero Cells by Using a Small-Scale and Non-invasive Tool. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(6): 1600–1615.

Pfeiffer T, Schuster S & Bonhoeffer S, 2001.

Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science*, 292(5516): 504–507.

Picot L, Ravallec R, Fouchereau-Péron M, Vandanjon L, Jaouen P, Chaplain-Derouiniot M, Guérard F, Chabeaud A, Legal Y, Alvarez OM, Bergé JP, Piot JM, Batista I, Pires C, Thorkelsson G, Delannoy C, Jakobsen G, Johansson I & Bourseau P, 2010.

Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11): 1819–1826.

van der Pol L & Tramper J, 1998.

Shear sensitivity of animal cells from a culture-medium perspective. *Trends in Biotechnology*, 16(8): 323–328.

Porter RR, 1959.

The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochemical Journal*, 73(1): 119–127.

Pouliot Y, Wijers MC, Gauthier SF & Nadeau L, 1999.

Fractionation of whey protein hydrolysates using charged UF/NF membranes. *Journal of Membrane Science*, 158(1-2): 105–114.

Pownall TL, Udenigwe CC & Aluko RE, 2011.

Effects of cationic property on the in vitro antioxidant activities of pea protein hydrolysate fractions. *Food Research International*, 44(4): 1069–1074.

Puck TT, Cieciura SJ & Robinson A, 1958.

Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *The Journal of Experimental Medicine*, 108(6): 945–956.

Q

Qian, Y, Khattak SF, Xing Z, He A, Kayne PS, Qian NX, Pan SH & Li ZJ, 2011.

Cell culture and gene transcription effects of copper sulfate on chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Progress*, 27(4): 1190–1194.

Quek LE, Dietmair S, Krômer JO & Nielsen LK, 2010.

Metabolic flux analysis in mammalian cell culture. *Metabolic Engineering*, 12(2): 161–171.

Quesney S, Marvel J, Marc A, Gerdil C & Meignier B, 2001.

Characterization of vero cell growth and death in bioreactor with serum-containing and serum-free media. *Cytotechnology*, 35: 115–125.

R

Racher AJ, Looby D & Griffiths JB, 1990.

Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability. *Cytotechnology*, 3(3): 301–307.

Raff MC, 1992.

Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, 356(6368): 397–400.

Rathore A, Velayudhan A, 2003.

Guidelines for optimization and scale-up in preparative chromatography. *BioPharmaceutical International*, 16(1): 34–42.

Reichert JM, 2011.

Antibody-based therapeutics to watch in 2011. *mAbs*, 3(1), p.76–99.

Reitzer LJ, Wice BM & Kennell D, 1979.

Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(8): 2669–2676.

Rita Costa A, Elisa Rodrigues M, Henriques M, Azeredo J, Oliveira R, 2010. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74(2): 127–138.

Ruoslahti E, 1996.

RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell Biology*, 12: 687-715.

Ryan, J., 2008.

Endotoxins and Cell Culture. *Life science action, corning incorporated*.

S

Sahoo N, Choudhury K & Manchikanti P, 2009.

Manufacturing of biodrugs: need for harmonization in regulatory standards. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceutics and Gene Therapy*, 23(4): 217–229.

Sato G, 1974.

The establishment of hormone-dependent cell lines. *Methods in Enzymology*, 32(Part B):557-561.

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(1996):191-199.

Schmidt N, Mishra A, Lai GH, Wong GC, 2010.

Arginine-rich cell-penetrating peptides. *FEBS Letters*, 584(9): 1806–1813.

Schneider YJ, 1989.

Optimisation of hybridoma cell growth and monoclonal antibody secretion in a chemically defined, serum- and protein-free culture medium. *Journal of immunological methods*, 116(1): 65-77.

Schwartz H, Ray K, Caple M, Blasberg J & Cutak B, 2009.

Quality Control of a Wheat Gluten Hydrolysate for Use as a Raw Material in Cell Culture Media. *Poster presentation at ESACT Dublin, Sigma-Aldrich*.

Sengupta N, Rose ST & Morgan JA, 2011.

Metabolic flux analysis of CHO cell metabolism in the late non-growth phase. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(1): 82–92.

Seth G, Hossler P, Yee JC & Hu WS, 2006.

Engineering cells for cell culture bioprocessing--physiological fundamentals. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 101: 119–164.

- Shen CF, Kiyota T, Jardin B, Konishi Y & Kamen A, 2007.
Characterization of yeastolate fractions that promote insect cell growth and recombinant protein production. *Cytotechnology*, 54(1): 25–34.
- Shen D, Kiehl TR, Khattak SF, Li ZJ, He A, Kayne PS, Patel V, Neuhaus IM & Sharfstein ST, 2010.
Transcriptomic responses to sodium chloride- induced osmotic stress: A study of industrial fed- batch CHO cell cultures. *Biotechnology Progress*, 26(4): 1104–1115.
- Siberil S, Dutertre CA, Boix C & Teillaud JL, 2005.
Anticorps monoclonaux à usage thérapeutique : un peu d’histoire, beaucoup d’ingénierie, et ... quelques succès cliniques. *Transfusion Clinique et Biologique*, 12(2): 114–122.
- Siemensa A, Babcock J, Wilcox C, Huttinga H, 2010.
Towards an understanding of how protein hydrolysates stimulate more efficient biosynthesis on cultured cells. In Pasupuleti VK, Demain AL (Ed) Protein hydrolysates in biotechnology, 1st edn. Springer, Netherland: 33-54.
- Smelko JP, Wiltberger KR, Hickman EF, Morris BJ, Blackburn TJ, Ryll T, 2011.
Performance of high intensity fed-batch mammalian cell cultures in disposable bioreactor systems. *Biotechnology Progress*, 27(5): 1358–1364.
- Sommer R, 1998.
Yeast extracts : production, properties and components. *Food Australia*, 50(4): 181–183.
- Stern B, Oslen LC, Trösse, Ravneberg H & Pryme IF, 2006.
Improving mammalian cell factories : The selection of signal peptide has a major impact on recombinant protein synthesis and secretion in mammalian cells. *Trends in cell & molecular biology*.
- Sung YH, Lim SW, Chung JY & Lee GM, 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(5): 527–536.
- Sunley K & Butler M, 2010.
Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. *Biotechnology Advances*, 28(3): 385–394.

T

- Takagi M, Hia HC, Jang JH & Yoshida T, 2001.
Effects of High Concentrations of Energy Sources and Metabolites on Suspension Culture of Chinese Hamster Ovary Cells Producing Tissue Plasminogen Activator. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(5): 515–521.
- Tanzeglock T, Soos M, Stephanopoloulos G & Morbidelli M, 2009.
Induction of mammalian cell death by simple shear and extensional flows. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(2): 360–370.

- Tessier B, Harscoat-Schiavo C & Marc I, 2006.
Selective separation of peptides contained in a rapeseed (*Brassica campestris* L.) protein hydrolysate using UF/NF membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(10): 3578–3584.
- Thaisuchat H, Baumann M, Pontiller J, Hesse F & Ernst W, 2011.
Identification of a novel temperature sensitive promoter in CHO cells. *BMC Biotechnology*, 11(1): 51.
- Tharmalingam T, Ghebeh H, Wuerz T & Butler M, 2008.
Pluronic enhances the robustness and reduces the cell attachment of mammalian cells. *Molecular Biotechnology*, 39(2): 167–177.
- Tintó A, Gabernet C, Vives J, Prats E, Cairó JJ, Cornudella L & Gòdia F, 2002.
The protection of hybridoma cells from apoptosis by caspase inhibition allows culture recovery when exposed to non-inducing conditions. *Journal of Biotechnology*, 95(3): 205–214.
- Tissot S, Oberbek A, Reclari M, Dreyer M, Hacker DL, Baldi L, Farhat M & Wurm FM, 2011.
Efficient and reproducible mammalian cell bioprocesses without probes and controllers? *New Biotechnology*, 28(4): 382–390.
- Trummer E, Fauland K, Seidinger S, Schriebl K, Lattenmayer C, Kunert R, Vorauer-Uhl K, Weik R, Borth N, Katinger H & Müller D, 2006.
Process parameter shifting: Part I. Effect of DOT, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(6): 1033–1044.
- Trummer E, Fauland K, Seidinger S, Schriebl K, Lattenmayer C, Kunert R, Vorauer-Uhl K, Weik R, Borth N, Katinger H & Müller D, 2006.
Process parameter shifting: Part II. Biphasic cultivation-A tool for enhancing the volumetric productivity of batch processes using Epo-Fc expressing CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(6): 1045–1052.
- Tsao YS, Cardoso AG, Condon RG, Voloch M, Lio P, Lagos JC, Kearns BG & Liu Z, 2005.
Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism. *Journal of Biotechnology*, 118(3): 316–327.

V

- Vandanjon L, Grignon M, Courois E, Bourseau P & Jaouen P, 2009.
Fractionating white fish fillet hydrolysates by ultrafiltration and nanofiltration. *Journal of Food Engineering*, 95(1): 36–44.
- Vander Heiden MG, Cantley LC & Thompson CB, 2009.

Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324(5930): 1029–1033.

Vaughn JL & Fan F, 1997.

Differential requirements of two insect cell lines for growth in serum-free medium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 33(6): 479–482.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR & Berneman ZN, 2003.

The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36(3): 131–149.

W

Wahl A, Sidorenko Y, Dauner M, Genzel Y & Reichl U, 2008.

Metabolic flux model for an anchorage- dependent MDCK cell line: Characteristic growth phases and minimum substrate consumption flux distribution. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(1): 135–152.

Walsh G, 2006.

Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nature Biotechnology*, 24(7): 769–776.

Walsh G, 2010.

Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nature Biotechnology*, 28(9): 917–924.

Want AJ, Nienow AW, Hewitt CJ & Coopman K, 2012.

Large-scale expansion and exploitation of pluripotent stem cells for regenerative medicine purposes: beyond the T flask. *Regenerative Medicine*, 7(1): 71–84.

Warburg O, 1956.

On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124(3215): 269–270.

Wilcox CP, Abitorabi MA, Benedict KA, Perlman AL & Babcock JF, 2011.

Non nutritives small mlecules postively impact cell culture performance. *Poster presentation Esact 2011 Vienna, Sheffield - Bio-science*.

Wilkens CA, Altamirano C & Gerdtzen ZP, 2011.

Comparative metabolic analysis of lactate for CHO cells in glucose and galactose. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(4): 714–724.

Wilkins J, Shiratori MK & Breece T, 2009.

Biologically active C-terminal arginine-containing peptides. *US Pattern 2009/0143248A1*.

Williams GH & Stoeber K, 2012.

The cell cycle and cancer. *The Journal of Pathology*, 226(2): 352–364.

Wise DR & Thompson CB, 2010.

Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(8): 427–433.

Wlaschin KF & Hu WS, 2007.

Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport. *Journal of Biotechnology*, 131(2): 168–176.

Wood IS & Trayhurn P, 2003.

Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *The British Journal of Nutrition*, 89(1): 3–9.

Wurm FM, 2004.

Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells, *Nature Biotechnology*, 22(11): 1393-1398.

X

Xing Z, Kenty B, Koyrakh I, Borys M, Pan SH & Li ZJ, 2011.

Optimizing amino acid composition of CHO cell culture media for a fusion protein production. *Process Biochemistry*, 46(7): 1423–1429.

Y

Yabe N & Matsui H, 1997.

Effects of iron chelates on the transferrin-free culture of rat dermal fibroblasts through active oxygen generation. *In vitro cellular and developmental biology-animal*, 33(7):527-535.

Yamada Y, Katagiri F, Hozumi K, Kikkawa Y & Nomizu M, 2011.

Cell behavior on protein matrices containing laminin α -1 peptide AG73. *Biomaterials*, 32(19): 4327-4335.

Yamamoto K & Niwa A, 1993.

Amino acid and vitamin requirements in mammalian cultured cells. *Amino acids*, 5(1): 1-16.

Yoon SK, Kim SH, Song JY & Lee GM, 2006.

Biphasic culture strategy for enhancing volumetric erythropoietin productivity of Chinese hamster ovary cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3): 362–365.

Yoon SK, Choi SL, Song JY & Lee GM, 2005.

Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese hamster ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0 degrees C. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(3): 345–356.

Yun Z, Takagi M & Yoshida T, 2001.

Effect of antioxidants on the apoptosis of CHO cells and production of tissue plasminogen activator in suspension culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(6): 581–585.

Z

- Zhang J, Reddy J, Buckland B & Greasham R, 2003.
Toward consistent and productive complex media for industrial fermentations; studies on yeast extract for a recombinant yeast fermentation process. *Biotechnology and bioengineering*, 82(6): 640-652.
- Zhang F, Sun X, Yi X & Zhang Y, 2006.
Metabolic characteristics of recombinant Chinese hamster ovary cells expressing glutamine synthetase in presence and absence of glutamine. *Cytotechnology*, 51(1): 21–28.
- Zhou M, Crawford Y, Ng D, Tung J, Pynn AF, Meier A, Yuk IH, Vijayasankaran N, Leach K, Joly J, Snedecor B, Shen A, 2011.
Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. *Journal of Biotechnology*, 153(1-2): 27–34.
- Zhu, J., 2011.
Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology Advances*, in press, doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.022
- Zhu MM, Goyal A, Rank DL, Gupta SK, Vanden Boom T, Lee SS, 2005.
Effects of elevated pCO₂ and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: a case study. *Biotechnology Progress*, 21(1): 70–77.
- deZengotita VM, Abston LR, Schmelzer AE, Shaw S, Miller WM, 2002.
Selected amino acids protect hybridoma and CHO cells from elevated carbon dioxides and osmolality. *Biotechnology and bioengineering*, 78(7):41-52.

Intérêt des hydrolysats de levure dans les procédés de culture de cellules CHO productrices d'anticorps : analyse cinétique, fractionnements et caractérisation des composés actifs

Résumé. Ce travail étudie l'intérêt de l'ajout d'hydrolysats de levure dans un procédé de culture de cellules CHO productrices d'anticorps en vue, d'une part, de déterminer leur condition d'utilisation et leur rôle, et, d'autre part, de caractériser les composés actifs. Pour répondre à ces objectifs, une démarche intégrant des études cinétiques, des stratégies de fractionnement et l'analyse biochimique des hydrolysats et de leurs fractions a été développée. En premier lieu, il a été montré que les hydrolysats de levure présentent des effets significatifs sur les cultures selon leur composition et les conditions d'ajout. De même, des effets synergiques ont été mis en évidence par le mélange d'hydrolysats générés à partir de différents procédés. D'autre part, des études cinétiques ont permis de corréler l'influence positive des hydrolysats sur la croissance cellulaire à l'amélioration du métabolisme énergétique. Dans un deuxième temps, la nature biochimique et le rôle des composés actifs ont été étudiés par la mise en œuvre d'un procédé de nanofiltration membranaire et la reconstitution de mélanges de molécules contenues dans un extrait de levure (EXL). Ces résultats ont mis en évidence l'intérêt des di et tri-peptides pour approvisionner le métabolisme énergétique et de molécules non nutritives, de poids moléculaire supérieur à 500 Da, pour stimuler la vitesse spécifique de croissance des cellules. Finalement, le rétentat issu de la nanofiltration de l'EXL a été fractionné à l'aide de divers procédés chromatographiques, unitaires ou associés, pour caractériser les propriétés physico-chimiques des composés actifs. L'effet des fractions sur la culture de cellules a alors souligné l'intérêt des molécules chargées positivement, et plus particulièrement, des peptides hydrophiles et cationiques pour stimuler la croissance des cellules. Ainsi, nos travaux permettent de mieux appréhender les mécanismes d'action des hydrolysats de levure sur les cellules CHO productrices d'anticorps et proposent des voies d'optimisation pour la simplification d'additifs complexes dans les milieux de culture dédiés à la culture de cellules animales.

Mots clés : hydrolysats de levure, cellules animales CHO, anticorps monoclonaux, bioréacteur agité, études cinétiques, procédés de fractionnement, nanofiltration membranaire, procédés chromatographique.

Benefit of yeast hydrolysates in culture processes of antibody-producing CHO cells: kinetics, fractionation and characterization of active compounds

Abstract. This work studies the interest of the addition of yeast hydrolysates in culture medium of CHO cell producing antibody, to determine the operating conditions and their role, but also to improve the characterization of active compounds. In this way, an integrated approach including kinetic studies, fractionation strategies and biochemical analysis of hydrolysates and of their fractions was developed. First, we showed that yeast hydrolysates exhibited various properties depending on their composition and the operating conditions. In addition, synergistic effects were observed with different hydrolysate mixtures. Besides, kinetic studies underlined that the positive influence of hydrolysates on cell growth is correlated with energetic metabolism improvement. Then, the biochemical nature and the role of active compounds were studied by the implementation of a nanofiltration process and the reconstitution of mixtures of molecules contained in a yeast extract (YE). The results highlighted the interest of di- and tri-peptides to supply energetic metabolism, and of non-nutritive molecules, exhibiting a molecular weight greater than 500 Da, to stimulate the specific cell growth rate. Finally, the retentate fraction of nanofiltrated YE was fractionated by various chromatographic processes to characterize the physico-chemical properties of active compounds. The effect of fractions on cell culture emphasized the positive effect of positively charged molecules, especially hydrophilic and cationic peptides, to stimulate the cell growth. Thus, our work provides important insights in yeast hydrolysate mechanisms on CHO cells and suggests procedures to simplify such a complex additive of media dedicated to mammalian cell culture.

Keywords: yeast hydrolysates, CHO animal cells, monoclonal antibodies, stirred bioreactors, kinetics, fractionation processes, membrane nanofiltration, chromatographic processes.