AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

INSTITUT **N**ATIONAL **P**OLYTECHNIQUE DE **L**ORRAINE
Ecole **N**ationale **S**upérieure d'**A**gronomie et des **I**ndustries **A**limentaires
Laboratoire des **S**ciences du **G**énie **C**himique - CNRS

THESE
présentée à l'INPL par

Nadine KOCHANOWSKI

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : *Procédés Biotechnologiques et Alimentaires*

Sujet

Influence des précurseurs de la glycosylation sur la macrohétérogénéité de l'IFN-γ produit en bioréacteur par des cellules CHO

Soutenue publiquement le 27 octobre 2005 devant la commission d'examen

Membres du jury :

Président :	M. Otto Merten - Responsable du Département de Développement du Généthon, Evry
Rapporteurs :	M. Loïc Faye - Directeur de Recherche au CNRS à l'Université de Rouen M. Otto Merten - Responsable du Département de Développement du Généthon, Evry
Examinateurs :	M. Jean-Louis Goergen - Professeur à l'ENSAIA-INPL, Nancy Mme Annie Marc - Directeur de Recherche au LSGC-CNRS, Nancy M. Emmanuel Guedon - Chargé de Recherche au LSGC-CNRS, Nancy M. Frédéric Chirat - Maître de Conférences à l'Université des Sciences et Techniques de Lille
Invitée :	Mme Isabelle Knott - Responsable du Département de Recherche et Développement en Culture Cellulaire de GlaxoSmithKline, Rixensart

REMERCIEMENTS

Ce projet a été réalisé au Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC) de Nancy, au sein du Groupe des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires (GPBA). Je remercie les directeurs respectifs, Monsieur Michel Sardin et Monsieur Michel Fick de m'y avoir acceuillie.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont permis de mener à bien ce projet :

Mes encadrants :

Je tiens à remercier sincèrement Monsieur Jean-Louis Goergen, Professeur à l'INPL, pour sa disponibilité et l'intérêt montré à ce travail. Votre rigueur scientifique, vos encouragements et vos conseils m'ont permis d'acquérir une solide formation et je vous en remercie.

J'exprime toute ma reconnaissance à Madame Annie Marc, Directeur de Recherche au LSGC-CNRS, pour son encadrement et ses conseils apportés durant cette période.

Je remercie Monsieur Emmanuel Guedon, Chargé de Recherche au LSGC-CNRS, pour ses conseils et sa disponibilité. Tu as toujours accepté de me consacrer un peu de ton temps pour répondre à mes questions et je t'en suis reconnaissante.

Je remercie chaleureusement Monsieur Frédéric Chirat, Maître de Conférences à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, d'avoir accepté de participer à ce jury. Merci également pour ta gentillesse et l'intérêt constant que tu as montré à ce travail, malgré la distance…

Les membres du jury :

J'exprime ma profonde gratitude à Messieurs Otto Merten, Responsable du Département de Développement du Généthon à Evry, et Loïc Faye, Professeur à l'Université de Rouen, d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je tiens également à remercier Madame Isabelle Knott, Responsable du Département de Recherche et Développement en Culture Cellulaire de GlaxoSmithKline à Rixensart (Belgique) d'avoir accepté de participer au jury.

Au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Villeneuve d'Ascq :

Je remercie tous les membres du 020 pour m'avoir accueillie si chaleureusement au sein du laboratoire (Monsieur René Cacan, Sandrine, Anne-Marie, Christèle et François) ainsi que les membres du 017 (Sylvain, Bénédicte, Marie-Ange et Mélanie) que j'ai pu rencontrer au cours de mes passages ponctuels dans la cité lilloise.

Au Laboratoire de Chimie Biologique à Louvain-la-Neuve :

Un grand merci à Monsieur Yves-Jacques Schneider, Professeur à l'Université Catholique de Louvain-la-Neuve, ainsi qu'à Virginie, pour l'aide qu'ils ont pu m'apporter dans la mise au point du western blot. Quel instant fugace de bonheur que la visualisation de ces trois glycoformes !!!

Au MTM à Vandoeuvre-lès-Nancy :

Je remercie également les membres du MTM, et tout particulièrement Sandrine, de m'avoir si bien acceuillie dans leurs locaux et m'avoir permis d'y effectuer les révélations chimiluminescentes.

Enfin, ces quelques mots pour remercier tous ceux dont j'ai pu croiser la route durant ces quatre années, et qui m'ont apporté leur aide technique, leur sympathique collaboration, leur soutien et leur bonne humeur.

Les membres du GPBA :

Un grand merci à Naziha, Eric, Fabrice, Isabelle, Manu, Evelyne, Xavier, Stéphane, Bernard, Joseph, Frantz, Françoise et Valérie. Je n'oublie pas non plus toutes les personnes que j'ai cotoyées sur la plate-forme SVS ainsi que les stagiaires qui ont particpé à la réalisation de ce travail.

Bien sûr, une pensée toute particulière pour Bérangère, ma collègue « Cellules animales » avec qui j'ai partagé « les hauts et les bas » tout au long de ces années. Merci pour ton réconfort et tous les bons moments passés ensemble Béran !

Toute la petite équipe d'Aria :

Que dire, que dire… Si ce n'est que cette association m'a donné l'occasion de faire de formidables rencontres humaines. Il m'est impossible de ne pas remercier Ghozlène (merci pour tout ma p'tite Rozy !!!), Reine, Sandrine, Bertrand, Lionel (et Laurence), ainsi que Marie-Noëlle et Magda, pour les nombreux fous-rires mémorables! Merci à tous pour votre générosité et votre soutien….

Enfin, je souhaiterais terminer ces quelques lignes en remerciant du fond du cœur mes proches et ma famille, et tout particulièrement mes parents et ma sœur Aurélie, qui ont toujours su me soutenir et m'apporter du réconfort…Tout simplement merci d'avoir été présents à mes côtés au quotidien !

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique codant
ADP : adénosine-5'-diphosphate
AMP : adénosine-5'-monophosphate
ANTS : 8-aminonaphtalène-1,3,6-sulfonate
ARN : acide ribonucléique
Asn : asparagine
ATCA : acide trichloroacétique
ATF : activating transcription factor
ATP : adénosine-5'-triphosphate
BHK : baby hamster kidney
CA~Asp : carbamoyl-aspartate
CA~P : carbamoyl-phosphate
CBF : CCAAT-binding factor
CDG : congenital disorder of glycosylation
CDP : cytidine-5'-diphosphate
CHO : Chinese hamster ovary
CLHP : chromatographie liquide à haute performance
CMP : cytidine-5'-monophosphate
CNX : calnexine
COP : coat protein complex
CRT : calréticuline
CTP : cytidine-5'-triphosphate
Dhfr : dihydrofolate réductase
DHO : acide dihydroorotique
DMSO : diméthylsulfoxide
Dol : dolichol
Dol-P-Glc : dolichol-phosphoglucose
Dol-P-Man : dolichol-phosphomannose
DpN : Danaus plexippus
EDTA : éthylène diamine tétra-acétique
EGF : epidermal growth factor
ELISA : enzyme linked immuno-sorbent assay
EPO : érythropoïétine
ERAD : endoplasmic reticulum-associated response
ERGIC : ER-Golgi intermediate compartment
FACE : fluorophore assited-carbohydrate electrophoresis
FDA : Food and Drug Administration
Fru-6-P : fructose-6-phosphate
FSH : follicule stimulating hormone
Fuc-1-P : fucose-1-phosphate
G1PT : dol-P N-acétylglucosamine-1-phosphotransférase
Gal-1-P : galactose-1-phosphate
GalNAc : N-acétylgalactosamine
G-CSF : granulocyte colony stimulating factor
GDP-Fuc : GDP-fucose
GDP-Man : GDP-mannose
GH : growth hormone
Glc : glucose
Glc-1-P : glucose-1-phosphate

Glc-6-P : glucose-6-phosphate
GlcN : glucosamine
GlcN-6-P : glucosamine-6-phosphate
GlcNAc : N-acétylglucosamine
GlcNAc-1-P : glucosamine-1-phosphate
GlcNAc-6-P : glucosamine-6-phosphate
Gln : glutamine
Glu : glutamate
GPI : glucosamine-6-phosphate isomérase
GPS : glucosamine-6-phosphate synthase
GRP : glucose-related protein
GTP : guanosine-5'-triphosphate
HCl : acide chlorhydrique
HDL : high density lipoprotein
HEK : human embryonic kidney
Hepes : acide 4-(2-hydroxyéthyl) pipérazine-1-éthane sulfonique
IFN : interféron
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
IMP : inosine-5'-monophosphate
JNK : Jun N-terminal protein kinase
LDL : low density lipoprotein
m : masse
Man : mannose
Man-1-P : mannose-1-phosphate
Man-6-P : mannose-6-phosphate
ManNAc : N-acéylmannosamine
ManNAc-6-P : N-acéylmannosamine-6-phosphate
M-CSF : macrophage colony stimulating factor
M-CSF : macrophage- colony stimulating factor
MEM : Modified Eagle medium
NAD : nicotinamide-adénine-dinucléotide
NeuAc : acide N-acétylneuraminique
NeuGc : acide N-glycolylneuraminique
NF-Y : nuclear factor Y
OMP : orotidine monophosphate
OST : oligosaccharyltransférase
PBS : phosphate buffer saline solution
PDGF : platelet-derived growth factor
PDI : protéine disulfure isomérase
PERK : protein-like endoplasmic reticulum kinase
PF-BDM : protein-free basal defined medium
PhRMA : Pharmaceutical Research and Manufacturers of America
PID : proportionelle-intégrale-dérivée
PNGase : peptide-N-glycosidase
PRPP : 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate
PTA : acide phosphotungstique
Réf : référence
RER : reticulum endoplasmique rugueux
RMN : résonance magnétique nucléaire
RPMI : Roswell Park Memorial Institute
SDS : dodécylsulfate de sodium
SeAP : phosphatase alcaline sécrétée
Ser : sérine
Sf9 : Spodoptera frugiperda

STAT : signal transducer and activator of transcription
THF : tétrahydrofuranne
Thr : thréonine
Tn : Trichoplusia ni
t-PA : tissue plasminogen activator
UDP : uridine-5'-diphosphate
UDP-Gal : UDP-galactose
UDP-GalNAc : UDP-N-acétylgalactosamine
UDP-Glc : UDP-glucose
UDP-GlcNAc : UDP-N-acétylglucosamine
UDP-GNAc : UDP-GlcNAc+UDP-GalNAc
UGGT : UDP-glc : glycoprotéine glycosyltransférase
UMP : uridine-5'-monophosphate
UPR : unfolded protein response
UTP : uridine-5'-triphosphate
vol : volume
XBP : X-box binding protein
XMP : xanthosine-5'-monophosphate

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE 12

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 18

I. La production de protéines recombinantes en biotechnologie 19
1. Les enjeux économiques 19
2. Les protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique 20
3. Les différents systèmes d'expression utilisés pour la production de protéines recombinantes 24
3.1 Avantages et inconvénients des différents systèmes d'expression 24
3.2 Les capacités de glycosylation des différents systèmes d'expression 31

II. La culture en masse des cellules animales 39
1. Le milieu de culture 39
1.1 La composition du milieu de culture 39
1.2 Le sérum de veau fœtal 41
2. La culture de cellules de mammifères en bioréacteurs 42
2.1 Les paramètres opératoires contrôlés 42
2.2 Les modes de culture et les technologies des bioréacteurs 43

III. La glycosylation des protéines dans les cellules animales 44
1. Macrohétérogénéité et microhétérogénéité 45
2. N-glycosylation et O-glycosylation 45
2.1 La O-glycosylation 45
2.2 La N-glycosylation 47
3. Biosynthèse des N-glycosylprotéines dans les cellules de mammifères 49
3.1 Le cycle des dolichols 49
3.2 Maturation des glycoprotéines dans le RE et l'appareil de Golgi 66
3.3 Le contrôle qualité des N-glycosylprotéines 69
3.4 L'UPR dans les cellules de mammifères 72

IV. Maîtrise de la glycosylation des protéines recombinantes au cours du procédé de culture 75
1. Fonctions biologiques des glycannes pour les protéines 75
2. Facteurs susceptibles d'influencer la glycosylation des protéines recombinantes au cours du procédé 76
2.1 Influence de l'environnement extracellulaire sur la glycosylation 77
2.2 Les paramètres opératoires 82
2.3 Les modes de culture 83
2.4 Influence des paramètres intracellulaires sur la glycosylation 84
3. L'interféron-gamma 87
3.1 La structure protéique 87
3.2 Les structures N-glycanniques associées à l'interféron-gamma 88
3.3 Fonctions biologiques de l'interféron-gamma 89

MATERIELS ET METHODES 92

1. Culture cellulaire 93
1.1 Lignées cellulaires 93
1.2 Conservation des lignées 93
1.3 Numération cellulaire 94
1.4 Propagation des cellules 95
1.5 Milieux de culture 97

2. Exploitation des résultats cinétiques 102
2.1 Mode discontinu 102
2.2 Mode semi-continu 103

3. Dosages des métabolites et produits extracellulaires 104
3.1 Le glucose 104
3.2 Le lactate 104
3.3 La glutamine 105
3.4 Les ions ammonium 105

4. L'interféron-gamma 106
4.1 Quantification de la production d'interféron-gamma par test ELISA 106
4.2 Caractérisation de la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'interféron-gamma par western-blot 107
4.3 Supplémentation en interféron-gamma 110

5. Caractérisation des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides 110
5.1 Marquages métaboliques radioactifs 110
5.2 Analyse des glycannes associés aux précurseurs oligosaccharidiques par « *Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis* » 117

6. Analyse des nucléotides et nucléotides-sucres intracellulaires par chromatographie liquide à haute performance de paire d'ions 119
6.1 Extraction des nucléotides et nucléotides-sucres intracellulaires à l'acide perchlorique 119
6.2 Analyse par chromatographie liquide à haute performance de paire d'ions 120

CHAPITRE III. INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE SUR LA MACROHETEROGENEITE DE LA GLYCOSYLATION DE L'IFN-GAMMA AU COURS DE CULTURES DISCONTINUES DE CELLULES CHO 123

1. Etude cinétique et physiologique des lignées CHO 320 et C5 cultivées en mode discontinu dans différents milieux de culture 126
1.1 Cinétique de croissance et de décès cellulaires 126
1.2 Cinétique de production d'interféron-gamma 128
1.3 Cinétique de consommation de glucose et de production de lactate 130
1.4 Cinétique de consommation de la glutamine et de production d'ions ammonium 133

2. Macrohétérogénéité de la glycosylation de l'interféron-gamma 135

3. Discussion 138

4. Influence de la supplémentation en interféron-gamma sur la glycosylation 142
4.1 Influence de la supplémentation en interféron-gamma sur la croissance cellulaire 143
4.2 Influence de supplémentation en interféron-gamma sur la vitesse spécifique de synthèse des dol-PP-oligosaccharides et des glycoprotéines 144
4.3 Discussion 154

5. Conclusion du chapitre III 155

CHAPITRE IV. LES PRECURSEURS OLIGOSACCHARIDIQUES ET LA MACROHETEROGENEITE DE LA GLYCOSYLATION DE L'INTERFERON-GAMMA 156

1. Mise au point au point de l'analyse qualitative des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides au cours de cultures discontinues de cellules CHO en bioréacteurs 158
1.1 Principe du marquage au [2-3H] mannose 158
1.2 Mise au point des conditions de marquage 159
1.3 Conclusion 166

2. Analyse qualitative des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides au cours d'une culture discontinue de cellules CHO C5 cultivées en milieu RPMI sans sérum 167
2.1 Croissance, décès et métabolisme des cellules CHO C5 cultivées en milieu RPMI sans sérum en mode discontinu 168
2.2 Evolution de la capacité des cellules CHO C5 à incorporer le mannose radioactif au cours d'une culture discontinue 170
2.3 Comparaison des vitesses spécifiques de synthèse des glycoprotéines et des protéines avec la vitesse spécifique de croissance cellulaire 172
2.4 Evolution des vitesses spécifiques de synthèse des différentes populations oligomannosidiques 174
2.5 Analyse de la structure des glycannes par CLHP couplée à un détecteur de radioactivité 177
2.6 Discussion 182

3. Analyse quantitative des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides par « *Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis* » (FACE) 184
3.1 Principe de la méthode d'analyse 184
3.2 Détermination du seuil de détection et du pourcentage d'erreur sur la mesure de la méthode FACE 185
3.3 Application de la méthode FACE à des cultures discontinues de cellules CHO cultivées dans différents milieux de culture 186
3.4 Discussion 191

4. Conclusion du chapitre IV 193

CHAPITRE V. LES POOLS INTRACELLULAIRES DE NUCLEOTIDES ET NUCLEOTIDES-SUCRES ET LA MACROHETEROGENEITE DE LA GLYCOSYLATION DE L'IFN-GAMMA 194

1. Développement d'une méthode d'analyse des pools intracellulaires de nucléotides et nucléotides-sucres par CLHP de paire d'ions 196

2. Suivi des pools intracellulaires de nucléotides et nucléotides-sucres au cours d'une culture discontinue de cellules CHO productrices d'interféron-gamma dans différents milieux de culture 231
2.1 Les nucléotides puriques et pyrimidiques 232
2.2 Les nucléotides-sucres 234
2.3 La charge énergétique 242
2.4 Discussion 243

3. Suivi des pools intracellulaires de nucléotides et nucléotides-sucres au cours d'une culture semi-continue de cellules CHO productrices d'interféron-gamma cultivées en milieu de culture 248
3.1 Etude macrocinétique de la culture semi-continue 249
3.2 Evolution des pools intracellulaires de nucléotides et nucléotides-sucres et de la charge énergétique au cours de la culture semi-continue de cellules CHO productrices d'interféron-gamma 254
3.3 Discussion 256

4. Conclusion du chapitre V 258

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 260

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 268

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Grâce aux progrès accomplis dans les techniques du génie génétique, l'introduction, dans une cellule procaryote ou eucaryote, d'un gène provenant d'un autre organisme a permis d'utiliser la cellule hôte en tant qu'usine de production de protéines recombinantes. Ainsi, l'expansion des biotechnologies a pu offrir de nouvelles potentialités dans la conception, et la fabrication même, de médicaments innovants. De nombreuses molécules d'intérêt pharmaceutique sont actuellement produites de cette façon et les biomédicaments, issus des recherches en biotechnologies, représentent aujourd'hui environ 35% de tous ceux mis sur le marché en France et en Europe. Dans le domaine de la santé, le développement des biotechnologies a contribué à la mise au point de nombreux molécules thérapeutiques : l'insuline recombinante dans le traitement du diabète se susbtitue depuis plus de vingt ans aux produits d'extraction; le facteur VIII dans le traitement de l'hémophilie ou l'hormone de croissance recombinante apportent une meilleure tolérance et une sécurité sanitaire accrue.

Bien qu'étant gouvernée par la chaîne polypeptidique, l'activité biologique des protéines résulte également de la présence de nombreuses maturations post-traductionnelles. Parmi l'ensemble des modifications que peut subir une protéine, l'une des plus importantes est la glycosylation. En effet, la plupart des protéines produites chez les eucaryotes sont des glycoprotéines. La glycosylation consiste en l'ajout d'un complexe glucidique (glycanne) sur la chaîne polypeptidique. Les fonctions jouées par les glycannes d'une glycoprotéine biologiquement active peuvent être classées en trois principales catégories. Leur première vocation est d'ordre physico-chimique : les glycannes contribuent à la mise en place de la structure tridimensionnelle de la protéine en influençant son repliement. Ils jouent également un rôle sur la solubilité de la molécule de par leur caractère hydrophile. Enfin, ils couvrent plus ou moins la surface de la protéine, jouant ainsi un rôle déterminant dans la résistance aux protéases ou dans le masquage d'épitopes, potentiellement immunogènes. La deuxième fonction des structures glycanniques n'est pas directement liée à l'activité biologique des glycoprotéines, mais la présence de glycannes est susceptible de réguler ou moduler fortement l'activité des protéines en contrôlant leur demi-vie. Enfin, les glycannes peuvent eux-mêmes porter une fonction biologique, par le biais de leur interaction spécifique avec des molécules cibles. Néanmoins, les fonctions biologiques des glycannes diffèrent d'une protéine à l'autre :

dans certains cas, l'absence de glycosylation ne modifie guère la fonction de la protéine considérée alors que dans d'autres cas, la protéine peut ne plus être fonctionnelle. Ainsi, faute de connaissances plus précises sur le rôle des glycannes, il convient de reproduire le plus fidèlement possible les glycoprotéines humaines, en choisissant judicieusement le système d'expression de la protéine recombinante en fonction de ses potentialités de glycosylation. Parmi les systèmes d'expression existant actuellement, les bactéries ne réalisent qu'une glycosylation sommaire et les levures produisent des glycannes de structures très différentes de celles retrouvées sur les protéines humaines. Il en est de même pour les cellules végétales ou les cellules d'insectes, qui en l'absence de manipulations génétiques, génèrent des protéines portant des structures glycanniques susceptibles d'induire des réactions immunitaires en thérapie humaine. En revanche, les cellules de mammifères, et en particulier les cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO), constituent un hôte d'expression privilégié pour la production de glycoprotéines recombinantes à visée thérapeutique car elles possèdent un équipement enzymatique leur permettant de produire des protéines portant des structures glycanniques très voisines de celles retrouvées sur les protéines humaines.

Néanmoins, le système CHO présente toutefois des imperfections. En effet, il apparaît que le profil de glycosylation de certaines glycoprotéines recombinantes évolue au cours de leur production dans des cultures discontinues de cellules CHO. C'est le cas, par exemple, de l'IFN-γ humain recombinant : l'occupation des sites de glycosylation (macrohétérogénéité) de l'IFN-γ n'est pas constante tout au long du procédé et cela se manifeste par une diminution du pourcentage de molécules glycosylées en début de culture. Ainsi, la glycosylation de la protéine d'intérêt, produite au début, diffère de celle obtenue à la fin du procédé. Or, d'un point de vue industriel et réglementaire, il paraît essentiel d'assurer la production d'une glycoprotéine recombinante de qualité constante tout au long du procédé, mais également d'un procédé à l'autre. Ainsi, la volonté d'une meilleure maîtrise de la qualité des glycoprotéines recombinantes s'est imposée aux glycobiologistes ces dernières années.

Contrairement à la synthèse des protéines qui repose entièrement sur la reproduction fidèle à partir d'instructions présentes dans l'ADN, la synthèse des glycannes ne répond pas à un programme établi, mais dépend de l'ordonnancement de nombreuses réactions enzymatiques et de leur contrôle au sein de différents compartiments cellulaires. Dans les cellules animales, la biosynthèse d'une glycoprotéine se déroule en trois étapes : l'élaboration

du précurseur oligosaccharidique, appelé dol-PP-oligosaccharide, le transfert en bloc de la structure glycannique portée par ce précurseur sur la protéine en voie de synthèse et la maturation des glycannes associés aux protéines. La synthèse des structures glycanniques est assurée par l'action séquentielle d'enzymes spécifiques, les glycosyltransférases et les glycosidases. Le produit de la réaction d'une enzyme représente le substrat de l'enzyme suivante. Chaque enzyme a une localisation cellulaire précise et les différentes réactions sont compartimentées, principalement dans le reticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Chaque type cellulaire possède un équipement enzymatique qui lui est propre, et il est aisé de comprendre que toutes les lois régissant ces modifications post-traductionnelles ne sont pas encore clairement établies. D'autre part, les paramètres opératoires et les conditions de culture influencent de manière non négligeable la glycosylation des protéines recombinantes. En revanche, peu de données sont disponibles, à ce jour, quant à leur effet sur les précurseurs intracellulaires impliqués dans le processus de glycosylation, et en particulier dans le cas de la culture en masse de cellules animales.

Ainsi, l'objectif principal de notre travail a été d'identifier les facteurs intracellulaires susceptibles d'influencer la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ produit au cours de cultures discontinues et semi-continues de cellules CHO.

Ce projet s'est inscrit dans le cadre d'un programme de recherches du CNRS intitulé « Protéomique et Génie des Protéines ». Ce travail a également fait l'objet d'une collaboration avec le Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Villeneuve-d'Ascq dans le cadre du Groupement de Recherche « Génie et Génomique des Glycosyltransférases » (GDR CNRS n°2590). Enfin, il a également bénéficié de la collaboration ponctuelle avec le Laboratoire de Biochimie cellulaire de Louvain-la-Neuve (Belgique).
Clairement, notre approche a visé à approfondir les connaissances des mécanismes intracellulaires régissant le processus de la glycosylation, au travers du suivi cinétique des paramètres intracellulaires au cours de cultures de cellules CHO en bioréacteurs. Pour cela, trois questions majeures ont motivé notre démarche :

- Quels sont les facteurs intracellulaires susceptibles d'influencer la glycosylation de l'IFN-γ ?
- Peut-on identifier des étapes limitantes du processus de glycosylation responsables de la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ ?

- ❖ Peut-on définir des conditions de culture permettant le maintien d'un profil de glycosylation constant de l'IFN-γ au cours d'un procédé ?

Afin de répondre à ces différentes questions, l'approche expérimentale adoptée au cours de notre étude est présentée sur la figure A.

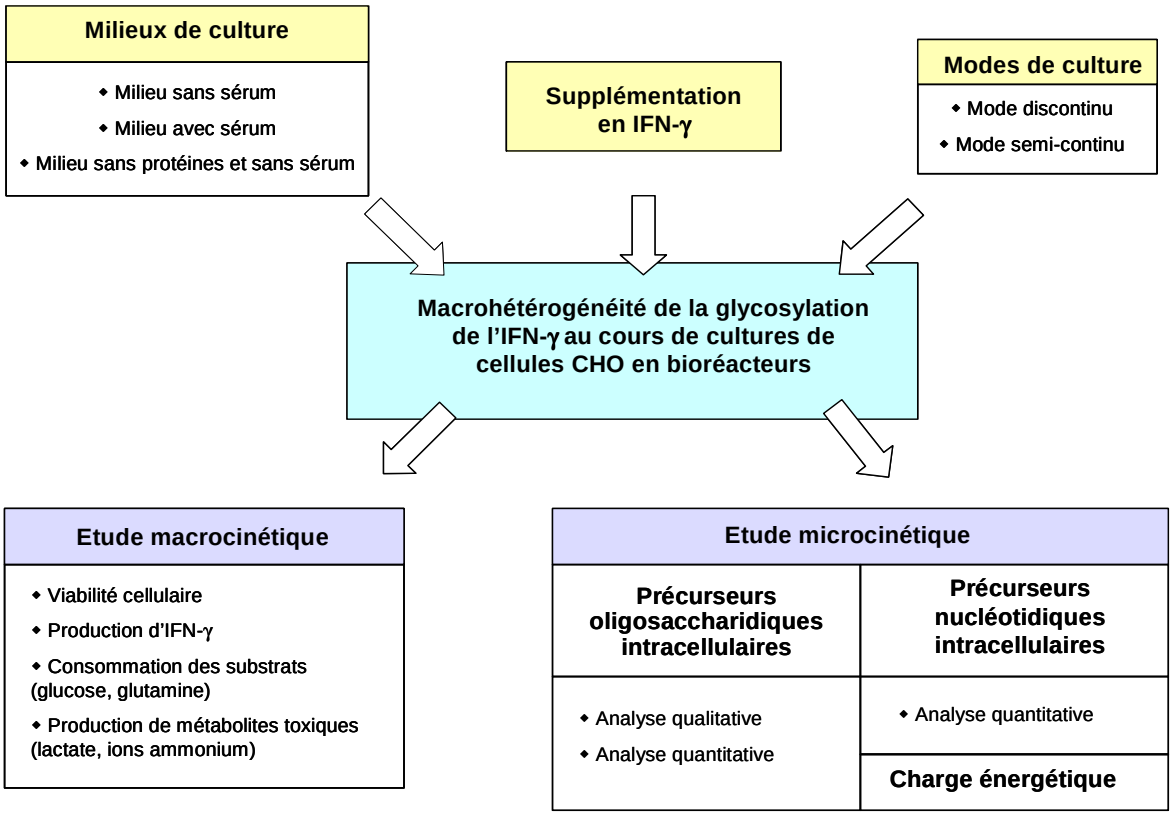


Figure A : Démarche expérimentale adoptée au cours de notre étude.

Ce mémoire est stucturé en six parties distinctes. La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique, et décrit notamment les différents systèmes d'expression utilisés pour la production de glycoprotéines à visée thérapeutique et de diagnostic ainsi que leurs capacités de glycosylation. Les connaissances actuelles relatives aux différents facteurs susceptibles d'influencer le processus de glycosylation dans les cellules animales sont également présentées.

La seconde partie détaille les différentes méthodologies expérimentales et les techniques analytiques utilisées au cours de notre étude.

La troisième partie développe nos résultats concernant l'influence de la composition du milieu de culture sur la glycosylation de l'IFN-γ. Des cultures discontinues de cellules CHO ont été mises en œuvre dans différents milieux de culture (milieux avec et sans sérum, milieu sans protéines) dont les compositions diffèrent d'un point de vue quantitatif et qualitatif. Outre l'étude physiologique, la macrohétérogénéité de la glycosylation a été suivie au cours du temps. Par ailleurs, afin de tester l'influence de l'IFN-γ sur sa propre glycosylation, des cultures de cellules CHO supplémentées par de l'IFN-γ humain recombinant ont été réalisées.

Dans la quatrième partie du mémoire, nous nous sommes attachés à réaliser une étude qualitative et quantitative des structures glycanniques associées aux précurseurs oligosaccharidiques. Ceci constitue une approche particulièrement originale de notre travail car l'évolution de ces précurseurs intracellulaires n'a jamais été suivie en cours de culture. Ces expériences, conduites en mode discontinu, ont ainsi eu pour objectif, de déterminer, d'une part, si l'évolution de la structure des dol-PP-oligosaccharides au cours des cultures pourrait être responsable de la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ et, d'autre part, si la quantité de dol-PP-oligosaccharides synthétisés ne constituerait pas un facteur limitant pour la glycosylation de l'IFN-γ.

Dans la cinquième partie, une méthode d'analyse par chromatographie liquide à haute performance des pools intracellulaires de nucléotides et nucléotides-sucres a été développée. Alors que peu d'études relatent l'évolution simultanée de ces molécules au cours du temps, nous avons suivi l'évolution des contenus intracellulaires en treize nucléotides et nucléotides-sucres, ainsi que de la charge énergétique, au cours des cultures discontinues de cellules CHO effectuées dans différents milieux de culture. Une culture en mode semi-continu a également été mise en œuvre. Ces analyses devraient nous permettre de déterminer si la disponibilité moindre en nucléotides et nucléotides-sucres intracellulaires est susceptible d'engendrer la diminution du pourcentage de molécules d'IFN-γ glycosylées sur deux sites.

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

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Depuis la découverte en 1953, par James Watson et Francis Crick, de la structure en double hélice de l'ADN, et la confirmation de son rôle en tant que support du programme génétique des cellules, la connaissance des mécanismes biologiques et biochimiques régissant le vivant et les cellules qui le constituent, s'est considérablement étendue. Ainsi, l'explosion de la biologie moléculaire au début des années 1970, puis du génie génétique dans les années 1980, a conduit à d'énormes progrès dans le traitement des maladies humaines. La capacité à manipuler les séquences d'ADN a notamment rendu possible la production de protéines d'intérêt à visée diagnostique ou thérapeutique. En effet, la recombinaison génétique permet désormais la production, par une cellule, de protéines étrangères à celle-ci. Cette technologie a pu être étendue à toute une série de nouveaux hôtes, particulièrement des micro-organismes utilisés industriellement, tels les bactéries, les levures, les champignons filamenteux et les cellules animales. En 2003, plus de 40% des nouvelles molécules thérapeutiques mises sur le marché mondial étaient d'origine biologique et cette tendance n'ira qu'en s'accentuant dans les années à venir (PhRMA, 2004).

I. La production de protéines recombinantes en biotechnologie

1. Les enjeux économiques

En 2004, 108 molécules issues des biotechnologies, dites biopharmaceutiques, ont obtenu une autorisation de mise sur le marché délivrée par la *Food and Drug Administration* (FDA) (PhRMA, 2004). Le chiffre d'affaires généré par la commercialisation de ces molécules a atteint 34 milliards de dollars en 2004 (Pavlou et Reichert, 2004). En effet, le marché des protéines recombinantes est aujourd'hui en pleine expansion et les experts estiment que ce marché devrait atteindre 52 milliards de dollars en 2010 et représenter 12% du marché mondial du biomédicament (Pavlou et Reichert, 2004). Entre 2004 et 2009, 80 à 140 nouvelles biomolécules devraient être commercialisées puisque 384 molécules sont actuellement en phase d'essais précliniques et cliniques (PhRMA, 2004). Parmi ces 384 molécules en développement, 105 sont des protéines recombinantes, 88 sont des vaccins, 81 sont des anticorps monoclonaux, 23 sont des gènes thérapeutiques, 14 sont des médicaments anti-sens et 11 sont des thérapies cellulaires. Même si les protéines recombinantes

continueront à dominer le marché des produits biopharmaceutiques, les anticorps monoclonaux et les vaccins recombinants constituent deux marchés en plein essor. Le seul marché mondial des anticorps monoclonaux représentait 250 millions de dollars en 1997, 3,2 milliards en 2001 et devrait atteindre 16 milliards de dollars d'ici 2010 (Werner, 2004).

2. Les protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique

Le développement des technologies utilisant l'ADN recombinant dans les années 1970 a marqué le début de l'ère des biotechnologies modernes. Auparavant extraite de pancréas de porc ou de bœuf, la première protéine recombinante d'intérêt thérapeutique, issue des biotechnologies, a été l'insuline humaine produite chez la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*). Elle obtint une autorisation de mise sur le marché et fut commercialisée en 1982 par la société américaine Eli Lilly. De nombreuses molécules, autrefois directement extraites de sources biologiques ou obtenues par synthèse chimique, peuvent aujourd'hui être produites en intégrant dans des cellules un matériel génétique étranger. En 1986, l'activateur tissulaire du plasminogène humain (t-PA) a été la première protéine thérapeutique recombinante produitedans des cellules de mammifères (cellules CHO) à obtenir une autorisation de mise sur le marché délivrée par la FDA. Actuellement, les protéines recombinantes utilisées en thérapie humaine sont essentiellement des hormones, des facteurs sanguins, des facteurs de croissance hématopoïétiques, des cytokines (interférons et interleukines), des anticorps et des vaccins. Des exemples de molécules thérapeutiques commercialisées en 2005 sont présentés dans le tableau I.1.

Tableau I.1 : Exemples de molécules recombinantes à usage thérapeutique issues des biotechnologies et ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché délivrée par la FDA (PhRMA, 2004).

Nom commercial	Molécule	Société	Indications (date 1ère A.M.M.)
Actimmune®	Interféron-γ 1b	InterMune Ph.	Maladie granulomateuse chronique (déc. 2000), Ostéoporose (fév. 2000)
Activase®	Alteplase (t-PA)	Genentech	Infarctus du myocarde (nov. 1987; avril 1995) Embolie pulmonaire (juin 1990)
Adagen™	Enzyme thérapeutique Pegademase bovine	Enzon	Immunodéficience combinée sévère (mars 1990)
Aldurazyme®	Iraonidase	BioMarin Ph. Genzyme	Mucopolysaccharidose-I (mai 2003)
Aranesp®	Darbérythropoïétine α	Amgen	Anémie (sept 2001)
Avastin®	Anticorps monoclonal	Genentech	Cancer du colon (fév. 2004)
Avonex®	Interféron-β 1a	Biogen	Sclérose en plaques (mai 1996)
BeneFIX™	Facteur IX humain	Wyeth	Hémophilie B (fév. 1997)
Betaseron®	Interféron-β 1b	Berlex Laboratoires Chiron	Sclérose en plaques (juil. 1993)
Bexxar®	Anticorps monoclonal	Corixa GlaxoSmithKline	Lymphomes non-hodgkiniens (juin 2003)
BioTropin™	hGH	Bio-Technology General	Nanisme (mai 1995)
Campath®	Anticorps monoclonal	Berlex Laboratoires ILEX Oncology	Leucémie (mai 2001)
CEA-Scan®	Anticorps monoclonal	Immunomedics	Détection du cancer du colon (juin 1996)
Cerezyme®	Enzyme thérapeutique (glucocérébrosidase)	Genzyme	Maladie de Gaucher (mai 1994)
Comvax™	Vaccin	Merck	Infection par le virus *Haemophilus influenzae* de type b (oct. 1996) Hépatite B (oct. 1996)
Elitek®	Enzyme thérapeutique	Sanofi-Aventis	Hyperuricémie liée à un cancer (juil. 2002)
Embrel®	Récepteur soluble	Amgen Wyeth	Arthrite rhumatoïde (nov. 1998) Psoriasis (avril 2004)
Engerix-B®	Vaccin	GlaxoSmithKline	Hépatite B (sept. 1989)
EPOGEN®	Erythropoiétine α	Amgen	Anémie (juin 1989)
Fabrazyme®	Enzyme thérapeutique (Agalsidase β)	Genzyme	Maladie de Fabry (avril 2003)
FluMist™	Vaccin	MedImmune	Infection par le virus *Haemophilus influenzae* de type a et b (juin 2003)
Follistim®	FSH	Organon	Stérilité (sept. 1997)

Nom commercial	Molécule	Société	Indications (date 1ère A.M.M)
Genotropin®	hGH	Pfizer	Nanisme (août 1995) Syndrome de Prader-Willi (juin 2001)
Geref®	hGH-releasing factor	Serono	Déficience en hormone de croissance (oct. 1997)
GlucaGen®	Glucagon	Novo Nordisk Ph.	Hypoglycémie (juin 1998)
Gonal-F®	hFSH	Serono	Infertilité féminine (sept. 1997)
Helixate®FS	Facteur antihémophilique	Sanofi-Aventis	Hémophilie A (juin 2000)
Herceptin®	Anticorps monoclonal	Genentech	Cancer du sein (sept. 1998)
Humalog ®	Insuline	Eli Lilly	Diabètes (oct. 1982)
Humatrope®	Somatropine	Eli Lilly	Nanisme (mars 1987)
Humira®	Anticorps monoclonal	Abbot Laboratories	Arthrite rhumatoïde (déc. 2002)
Humulin®	Insuline	Eli Lilly	Diabètes (oct. 1982)
Infergen®	Interféron-α1	Amgen	Hépatite C chronique (oct. 1997)
Intron®A	Interféron-α 2b	Schering-Plough	Leucémie (juin 1986) Mélanomes malins (nov. 1997)
Kineret®	Protéine recombinante	Amgen	Arthrite rhumatoïde (nov 2001)
KoGENate®	Facteur antihémophilique	Bayer	Hémophilie A (fév. 1993)
KoGENate®FS	Facteur antihémophilique	Berlex Laboratories	Hémophilie A (juin 2000)
Leukine™	GM-CSF	Berlex Laboratories	Prévention du rejet de transplantations (mars 1991, nov. 1995) Leucémie (sept. 1995)
LYMErix™	Vaccin	GlaxoSmithKline	Maladie de Lyme (déc. 1998)
Mylotarg™	Anticorps monoclonal	Wyeth	Leucémie (mars 2000)
Neumega®	Anticorps monoclonal	Wyeth	Thromboses (nov. 1997)
NEUPOGEN®	G-CSF	Amgen	Prévention du rejet de la transplantation de moelle osseuse (juin 1994) Leucémie (avril 1998)
Norditropin®	Somatropine	Novo Nordisk Ph.	Nanisme (mai 1995)
Novolin®70/30	Insuline	Novo Nordisk Ph.	Diabètes (juin 1991)
NovoSeven®	Facteur VIIa	Novo Nordisk Ph.	Hémophilie A et B (mars 1999)
Nutropin®	hGH	Genentech	Nanisme (mars 1994) Syndrome de Turner (déc. 1996)
OncoScint®CR/OV	Anticorps monoclonal	Cytogen	Détection du cancer colo-rectal (fév. 1994)
ORTHOCLONE OKT®3	Anticorps monoclonal	Ortho Biotech	Prévention du rejet de la transplantation rénale (juin 1991), du cœur et foie (juin 1993)

Nom commercial	Molécule	Société	Indications (date 1ère A.M.M.)
Ovidrel®	Choriogonadotropine α	Serono	Induction de la maturation folliculaire (oct. 2003)
Pegasys®	Interféron-α2a / ribivirin	Roche	Hépatite chronique C (déc. 2002)
PROCRIT®	Erythropoéitine α	Ortho Biotech	Anémie (déc. 1990)
Proleukin®	IL-2	Chiron	Carcinomes rénaux (mai 1992) Mélanomes métastatiques (janv. 1998)
ProtaScint®	Anticorps monoclonal	CYTOGEN	Détection des adénocarcinomes de la prostate (oct. 1996)
Protopin®	hGH	Genentech	Nanisme (mars 1985)
Raptiva™	Anticorps monoclonal	Genentech	Psoriasis (oct. 2003)
Rebetron™	Interféron-α 2b/ ribivirin	Schering-Plough	Hépatite chronique C (déc. 1999)
Rebif®	Interféron-β 1a	Serono	Sclérose en plaque (mars 2002)
RECOMBIVAX HB®	Vaccin	Baxter Healthcare	Hépatite B (juil. 1986)
ReFacto®	Facteur VIII	Wyeth	Hémophilie A (mars 2000)
Regranex®	hPDGF	Ortho-McNeil Ph	Ulcères liés aux diabètes (déc. 1997)
Remicade™	Anticorps monoclonal	Centocor	Maladie de Crohn (août 1998, juil. 2002) Arthrite rhumatoïde (fév. 2002)
ReoPro®	Anticorps monoclonal	Centocor Elli Lilly	Angioplastie coronaire (déc. 1994) Angine de poitrine (nov. 1997)
Revatase®	t-PA	Centocor	Infarctus du myocarde (oct. 1996)
Rituxan®	Anticorps monoclonal	Genentech Biogen Idec	Lymphomes non-hodgkiniens (nov. 1997)
Roferon®-A	Interféron-α 2a	Roche	Leucémie (juin 1886) Hépatite C (nov. 1996)
Saizen®	Somatropine	Serono	Nanisme (oct. 1996)
Simulect®	Anticorps monoclonal	Novartis Ph.	Prévention du rejet des transplantations rénales (mai 1998)
Synagis®	Anticorps monoclonal	Abbott Laboratories MedImmune	Virus syncytial respiratoire (juin 1998)
Thyrogen®	Tyrotrophine α	Genzyme	Détection/Traitement du cancer de la glande thyroïde (nov. 1998)
Velolusin®BR	Insuline	Novo Nordisk Ph.	Diabètes (juil. 1999)
Verluma®	Anticorps monoclonal	DuPont Ph.	Cancer du poumon (août 1996)
Xolair®	Anticorps monoclonal	Genentech Novartis Ph.	Asthme (juin 2003)
Zenapax®	Anticorps monoclonal	Roche	Prévention du rejet des transplantations du foie (déc. 1997)
Zevalin™	Anticorps monoclonal	IDEC Ph.	Lymphomes (fév. 2002)
Zorbtive™	hGH	Serono	Syndrome de Bowel (déc. 2003)

3. Les différents systèmes d'expression utilisés pour la production de protéines recombinantes

Une protéine recombinante résulte de l'expression par un organisme ou une cellule hôte d'un ADN étranger. La protéine, synthétisée par une cellule différente de sa cellule d'origine, est ainsi dite hétérologue ou recombinante. Un système efficace de production de protéines recombinantes s'appuie sur (i) un gène ou un ADN complémentaire codant la protéine d'intérêt, (ii) un vecteur d'expression transportant le gène d'intérêt, (iii) une cellule hôte qui « exécute » les instructions fournies par la séquence codante pour synthétiser la protéine. Actuellement, il existe divers systèmes d'expression voués à la production et la purification de protéines recombinantes mais les trois principaux, en terme de rentabilité économique, sont la bactérie *E. coli*, la levure *Saccharomyces cerevisiae* et les cellules *Chinese Hamster Ovary* (CHO). D'autres systèmes d'expression font également l'objet de nombreux travaux. Parmi ceux-ci, la levure *Pichia pastoris*, les cellules d'insectes, les animaux et les plantes transgéniques peuvent être mentionnées.

Compte tenu du temps nécessaire à la mise au point et au développement d'un procédé de production, et de l'investissement financier engendré par la commercialisation d'un produit biopharmaceutique, il est nécessaire de choisir judicieusement le système d'expression (Schmidt, 2004). Plusieurs systèmes sont aujourd'hui disponibles et chacun d'eux présente des avantages et des inconvénients. Le choix de l'hôte d'expression sera en partie dicté par les impératifs économiques, mais la qualité du produit recombinant constituera également un paramètre déterminant, en particulier dans le cas de la production de molécules destinées à être injectées chez l'homme.

3.1 Avantages et inconvénients des différents systèmes de production

3.1.1 Les procaryotes

La bactérie *E. coli* fut et reste le premier hôte utilisé pour la production de protéines recombinantes (Dodet, 1990). Ses avantages incontestables sont une excellente caractérisation génétique et physiologique, un temps de génération court et une bonne adaptation à la culture en masse. De nombreux vecteurs plasmidiques ont été construits et sont disponibles afin

d'insérer et d'exprimer un gène étranger, et permettent également de sélectionner les clones recombinants. *E. coli* possède une grande capacité à accumuler des protéines étrangères, puisqu'elles peuvent représenter plus de 20% des protéines cellulaires totales. Le taux d'expression de la protéine hétérologue peut atteindre plusieurs grammes par litre.
Néanmoins, cette bactérie est incapable de synthétiser des protéines recombinantes possédant une conformation tridimensionnelle identique à celle de la protéine naturelle, en raison de l'absence de protéines impliquées dans le repliement (Baneyx et Mujacic, 2004). De plus, *E. coli* étant pourvue de faibles capacités sécrétoires (Sandkvist and Bagdasarian, 1996), les protéines recombinantes sont souvent accumulées, dans le cytoplasme ou le périplasme, sous formes d'agrégats insolubles, appelés corps d'inclusions (Strandberg et Enfors, 1991; Kane et Hartley, 1988). Il est souvent difficile de récupérer ces protéines mal repliées, car les étapes successives de purification et de renaturation sont susceptibles d'amoindrir l'activité biologique des protéines. Enfin, *E. coli* étant une entérobactérie, il est important de s'assurer de l'absence d'endotoxines dans les protéines recombinantes purifiées.

De nombreuses études ont été menées afin d'améliorer l'expression et le repliement des protéines hétérologues produites par *E. coli* (Swartz *et al*., 2001). Des étapes de renaturation ont permis de produire des protéines comportant plusieurs ponts disulfures, le pourcentage de protéines correctement repliées étant compris entre 30 et 80% (Wilkins *et al*., 1993; Yamanishi *et al*., 1991). Le rhM-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) a été produit sous forme active, avec un taux de repliement de 95%, après renaturation en présence de glutathion réductase et de faibles concentrations en agents dénaturants, telle l'urée ou le chlorure de guanidium (Tran-Moseman *et al*., 1999). Une stratégie alternative a consisté à co-exprimer la protéine d'intérêt avec des molécules chaperonnes (Levy *et al*., 2001). Par exemple, la co-expression de la protéine Deg-P, protéase périplasmique nécessaire à la protéolyse dans l'enveloppe cellulaire, minimise la formation des corps d'inclusion, car celle-ci possède une activité *chaperon-like* à basse température (Lin *et al*., 2001). La surexpression de protéines responsables du repliement, telles les disulfures oxydoréductases DsbA ou DsbC, a permis de produire une molécule de t-PA sous forme active possédant neuf ponts disulfures dans le cytoplasme d'*E. coli* (Bessette *et al*., 1999).

Des essais de « synthèse de protéines sans cellules » ont également donné lieu à des résultats prometteurs (Liu *et al*., 2005; Kang *et al*., 2000). Relativement fastidieuse et n'autorisant pas de procédés à grande échelle pour le moment, cette technologie offre l'avantage de pouvoir produire des protéines normalement toxiques pour la cellule hôte. Le

procédé demeure néanmoins onéreux, de par la nécessité d'apporter en continu des réactifs en grand volume, et en particulier des nucléotides et des sources d'énergie (Zawada *et al*., 2003).

3.1.2 Les levures

Les levures sont utilisées depuis l'Antiquité dans l'alimentation humaine, pour la fabrication du pain et des boissons alcoolisées. La plus connue est *S. cerevisiae*, la levure de boulanger. Les levures sont capables de proliférer rapidement et dans un milieu de culture simple, peu coûteux, en absence de facteurs de croissance d'origine animale. S'adaptant bien à la culture en masse, les fermentations produisent en général une haute densité cellulaire et le taux d'expression de la protéine hétérologue est généralement voisin de la centaine de milligrammes par litre. Les levures offrent également l'avantage de n'être ni pyrogènes, ni pathogènes (organismes GRAS, *Generally Regarded as Safe*) et constituent ainsi un organisme de choix pour la production de protéines à visée thérapeutique. D'autre part, la sécrétion des protéines hétérologues peut être effective chez les levures, elle fonctionne très bien pour de petits polypeptides comme l'insuline, mais les résultats sont moins probants pour les protéines de grande taille, bien que la sécrétion et la maturation puissent être améliorées par adjonction de signaux spécifiques (Eckart et Bussineau, 1996).

D'autres organismes semblent être de bons candidats pour la production de protéines recombinantes, en particulier parce qu'ils sont de meilleurs sécréteurs. C'est le cas de la levure méthylotrophe *P. pastoris* (Cereghino *et al*., 2002). Plus de 120 protéines recombinantes ont été exprimées dans cet hôte, la plupart étant d'origine humaine ou mammalienne. Le rendement est généralement meilleur que dans *S. cerevisiae*. Récemment, *P. pastoris* a été utilisée pour la production de protéines d'intérêt thérapeutique, dont certaines sont actuellemnt testées en essais cliniques (Walsh, 2003). Le gène d'intérêt peut être placé sous le contrôle du promoteur de l'alcool oxydase (AOX1), réprimé en présence de glucose et inductible en présence de méthanol. *P. pastoris* est également capable de convertir 30 à 40% de son poids en protéines (Dodet, 1990). Ainsi, de grandes quantités de la protéine d'intérêt, de l'ordre de quelques grammes par litre, peuvent être obtenues en utilisant ce système d'expression.

3.1.3 Les plantes transgéniques

Le développement des plantes comme usine cellulaire a débuté à la fin des années 1980. L'insertion d'un gène étranger dans une plante est rendue possible grâce à la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* (Gelvin, 2003). Cette bactérie Gram$^-$ est un pathogène des plantes dicotylédons (maïs, tabac…) qui provoque des tumeurs cancéreuses au point de l'infection. *A. tumefaciens* possède un plasmide *Tumor inducing* ADN (ADN-Ti) capable de s'introduire dans une cellule infectée et de s'intégrer de façon stable dans les chromosomes des cellules végétales. Ainsi, cette propriété a été mise à profit pour transformer les cellules végétales avec des plasmides comportant le gène codant la protéine d'intérêt. Les plantes transgéniques générées, à partir de ces cellules transformées, représentent une source considérable et très bon marché de protéines recombinantes (Hellwig *et al*., 2004; Giddings *et al*., 2000). Chez le tabac, la luzerne et quelques autres espèces, le feuillage abondant constitue la cible du transgène. Chez le maïs, le colza, la carthame, le soja et le riz, les vecteurs d'expression sont responsables de l'accumulation des protéines recombinantes dans la graine mais les taux de croissance cellulaire et de production protéique demeurent relativement faibles (Fischer *et al*., 2000).

Les phases initiales d'extraction et de purification demeurent délicates dans la plupart des cas, en particulier en raison de la protéolyse rapide qui a lieu dès l'homogénéisation des tissus. Le risque de contamination par des agents pathogènes viraux de mammifères et de prions mammaliens ne semble plus être un problème. En revanche, des directives réglementaires s'appliquant spécifiquement aux plantes doivent envisager la présence éventuelle de résidus de pesticides et d'herbicides. Les effets sur l'environnement soulèvent également quelques inquiétudes, au regard de l'introduction volontaire de cultures transgéniques dans la chaîne alimentaire ou de la dissémination non contrôlée dans l'envionnement.

3.1.4 Les animaux transgéniques

La transgénèse animale a été réalisée avec succès pour la première fois en 1986 avec la naissance des premières souris transgéniques, qui produisaient, dans leur lait, du t-PA. Les techniques du génie génétique ont rendu possible l'induction de l'expression tissu-spécifique de la protéine recombinante, et son adressage, en particulier dans le lait de

l'animal. L'opération consiste à isoler le gène codant la protéine d'intérêt, à l'associer à des éléments régulateurs capables de diriger la synthèse et la sécrétion de la protéine, puis d'introduire le gène dans un embryon au stade une cellule (Houdebine, 1998). Ce système permet alors la production de protéines correctement repliées et possédant des maturations post-traductionnelles très similaires à celles retrouvées sur les protéines humaines.

Le temps nécessaire à la génération d'une protéine recombinante par ce procédé est relativement long. Par ailleurs, il convient de bien choisir la protéine à produire en fonction de l'hôte, car celle-ci peut avoir des effets secondaires indésirables sur les animaux transgéniques. Par exemple, le gène de l'hormone de croissance humaine associé au promoteur WAP de lapin s'exprime suffisamment en dehors de la glande mammaire pour perturber la croissance et la reproduction des animaux (Devinoy *et al*., 1994). De même, le gène de l'érythropoïétine (EPO) humaine dans les mêmes conditions altère gravement la santé des lapins qui la produisent (Massoud *et al*., 1996). Certaines protéines ne peuvent donc pas être produites par cette méthode. De plus, l'expression du transgène demeure relativement aléatoire, et en comparaison avec d'autres systèmes d'expression, les risques de contamination par des agents pathogènes, tels les prions, demeurent non négligeables. En outre, la purification de la protéine recombinante dans des quantités commercialement viables est une étape délicate, compte-tenu de la complexité de la composition du lait (Goldman, 2003). Enfin, l'intérêt de la production de protéines recombinantes dans le lait d'animaux transgéniques se heurte également à des niveaux d'investissements très lourds, puisque le coût de la production d'un animal transgénique peut être estimé approximativement à 500 000 dollars (Wall, 1996).

Aucune molécule n'est actuellement mise sur le marché mais la production de protéines recombinantes dans le lait d'animaux transgéniques est en passe de devenir une réalité industrielle puisque la société GTC Biotherapeutics, une filiale de Genzyme, a terminé les essais cliniques et devrait obtenir une autorisation de mise sur le marché européen permettant la commercialisation de l'anti-thrombine III dans le lait de chèvre en Octobre 2005. D'autres molécules vont probablement se retrouver sur le marché d'ici peu : la société britannique PPL a développé la production d'α_1-antitrypsine chez la brebis, actuellement en phase d'essais cliniques. La société néerlandaise Pharming réalise également les essais cliniques en phase II pour la production, chez le lapin, de la protéine inhibiteur C1 (Keefer, 2004).

3.1.5 Les cellules animales

3.1.5.1 Les cellules d'insectes

Le système baculovirus-cellules d'insectes s'appuie sur l'insertion du ou des gènes à exprimer dans le génome d'un baculovirus vecteur, et sur l'infection de cellules de lépidoptères par le virus recombinant. Ce système offre l'avantage de pouvoir obtenir, dans des temps relativement courts, des vecteurs recombinants faciles à sélectionner et de très hauts niveaux d'expression, allant de quelques dizaines à quelques centaines de milligrammes par litre de culture (Fraser, 1992). Une autre considération importante est liée à la sécurité : aucun virus de vertébré ne peut se multiplier dans les cellules de lépidoptères employées et aucun prion n'a à ce jour été identifié chez ces insectes. Quant au baculovirus, il ne peut accomplir sa multiplication que dans les cellules d'insectes. La simplicité de la composition du milieu de culture avec laquelle peuvent se cultiver les cellules d'insectes (absence de sérum et de protéines) constitue un atout économique non négligeable (Altmann *et al*., 1999). Les cellules d'insectes présentent également une meilleure tolérance à l'osmolarité et aux co-produits du métabolisme cellulaire.

Un inconvénient majeur réside dans la nécessité de procéder à la réinfection virale à chaque nouvelle culture, compte tenu du cycle lytique du virus. D'autre part, les cellules d'insectes possèdent les équipements enzymatiques leur permettant d'effectuer la maturation et les modifications post-traductionnelles, mais ces dernières sont cependant très différentes de celles retrouvées chez les eucaryotes supérieurs (Marchal *et al*., 2001; Marz *et al*., 1995).

3.1.5.2 Les cellules de mammifères

Actuellement, 60-70% des protéines recombinantes pharmaceutiques sont produites dans les cellules de mammifères (Wurm, 2004). La plupart de ces protéines sont exprimées dans les cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO), mais aussi dans d'autres lignées telles les cellules de rein de hamster nouveau-né, BHK (*Baby Hamster Kidney*), des myélomes murins tels les cellules NSO, les cellules rénales d'embryons humains (HEK-293), les cellules humaines PER-C6… Le gène recombinant ainsi que les éléments transcriptionnels régulateurs sont introduits dans la cellule. La présence d'un agent de sélection, appliqué quelques jours après la transfection, permet de sélectionner les cellules ayant intégré le gène codant la protéine d'intérêt. Le marqueur de sélection le plus communément utilisé est le gène codant

la dihydrofolate réductase, une enzyme clé impliquée dans le métabolisme des nucléotides (Urlaub et Chasin, 1980). Un autre système de sélection utilise le gène codant la glutamine synthétase (Bebbington *et al.*, 1992). Les éléments régulateurs contrôlant l'expression de la protéine d'intérêt sont fréquemment isolés à partir de génomes viraux tels l'adénovirus, le cytomégalovirus humain (CMV) ou le virus simien 40 (SV 40) (Werner et Noé, 1993). Le gène d'intérêt peut également être amplifié *in vitro* (Goergen et Monaco, 2004). Les cellules animales se prêtent bien à la culture en masse en bioréacteurs, même si les rendements en protéines recombinantes sont plus faibles qu'avec des bactéries ou des levures, de l'ordre d'une dizaine de milligrammes par litre de milieu (Butler, 2005). Les cellules animales sont relativement exigeantes en éléments nutritifs, et la culture est ainsi délicate et coûteuse. Néanmoins, leur physiologie est relativement bien connue et l'optimisation des rendements fait l'objet de nombreuses études (Hesse et Wagner, 2000). Parallèlement au développement de vecteurs toujours plus puissants, il est notamment possible de travailler sur le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose, afin d'augmenter la productivité et améliorer la qualité des protéines recombinantes synthétisées (Fussenegger et Betenbaugh, 2002; Fussenegger *et al.*, 1999) ou sur le contrôle de l'expression des gènes endogènes (Warner, 1999). Par ailleurs, les cellules CHO sont capables de synthétiser des protéines complexes, de poids moléculaire élevé, correctement repliées, maturées et possédant les modifications post-traductionnelles très proches de celles retrouvées sur les protéines humaines.

Parmi les principales cellules de mammifères utilisées pour la production de protéines recombinantes, on peut citer le cas des hybridomes, résultant de la fusion d'un lymphocyte B (producteur d'un anticorps spécifique) et d'un myélome (cellule à propriétés tumorales). Les hybridomes sont essentiellement utilisés pour la production des anticorps monoclonaux à usage diagnostic (Little *et al.*, 2000). Le marché mondial des anticorps monoclonaux thérapeutiques connaît une croissance exponentielle, puisque ces molécules représentent 20% des molécules thérapeutiques commercialisées. Fin 2001, dix anticorps monoclonaux étaient commercialisés et utilisés à des fins thérapeutiques, quatre étaient en voie d'autorisation de mise sur le marché et dix-sept testés dans des essais cliniques de phase III. Environ 160 autres font actuellement l'objet d'essais cliniques de phases I et II, et plusieurs centaines sont testés dans des essais précliniques. Le seul marché des dix anticorps monoclonaux commercialisés en 2001 représentait 8 milliards de dollars et devrait atteindre 16 milliards en 2008 (Pavlou et Belsey, 2005). Actuellement, 18 anticorps monoclonaux sont commercialisés (PhRMA,

2004). Le premier anticorps monoclonal (OKT3), produit dans des hybridomes murins a obtenu l'autorisation de mise sur le marché en 1986. Les espoirs portés dans le traitement contre les rejets d'allogreffes n'ont cependant pas atteint les résultats escomptés, car l'administration de ces anticorps chez l'homme a déclenché de fortes réactions immunitaires (Fagnani, 1994), et ce en raison des quantités importantes d'anticorps devant être injectées aux patients (150 à 1125 mg/dose). Il a donc été nécessaire de développer des voies de recherche sophistiquées afin de produire des anticorps monoclonaux thérapeutiques recombinants pouvant être utilisés en thérapie humaine (Chowdhury et Wu, 2005; Tsurushita *et al*., 2005). Ces travaux ont abouti à la production d'anticorps chimériques, c'est-à-dire composés de régions constantes murines et de régions variables humaines, ou d'anticorps totalement humanisés. Les systèmes de production des anticorps monoclonaux recombinants ont considérablement évolué ces dernières années. Même si les hybridomes et les cellules CHO sont les plus utilisés pour de telles productions (Chadd et Chamow, 2002), d'autres systèmes d'expression tels les animaux transgéniques (Houdebine, 2002) et les plantes (Ma *et al*., 2005; Fischer *et al*., 2003; Larrick *et al*., 2001; Peeters *et al*., 2001) font l'objet de nombreuses études et pourraient constituer des alternatives économiquement intéressantes.

3.2 Les capacités de glycosylation des différents systèmes d'expression

Pour qu'elles soient biologiquement actives, les protéines doivent subir de nombreuses étapes de maturation. Ces modifications, consistant en l'ajout d'éléments non peptidiques, se produisent après ou pendant la traduction du message génétique en une chaîne d'acides aminés. Co- ou post-traductionnelles, ces modifications sont spécifiques du type de cellule considérée et diffèrent d'une espèce à l'autre. Parmi les modifications souvent requises pour assurer la fonction et la stabilité de la protéine, ainsi que son acheminement vers le lieu où elle est active, la glycosylation est l'une des plus fréquentes. Les glycannes associés aux protéines sont extrêmement variables en fonction de l'hôte dans lequel la protéine d'intérêt est exprimée. Des exemples de structures glycanniques caractéristiques des systèmes de production décrits précédemment sont présentés dans la figure I.1.

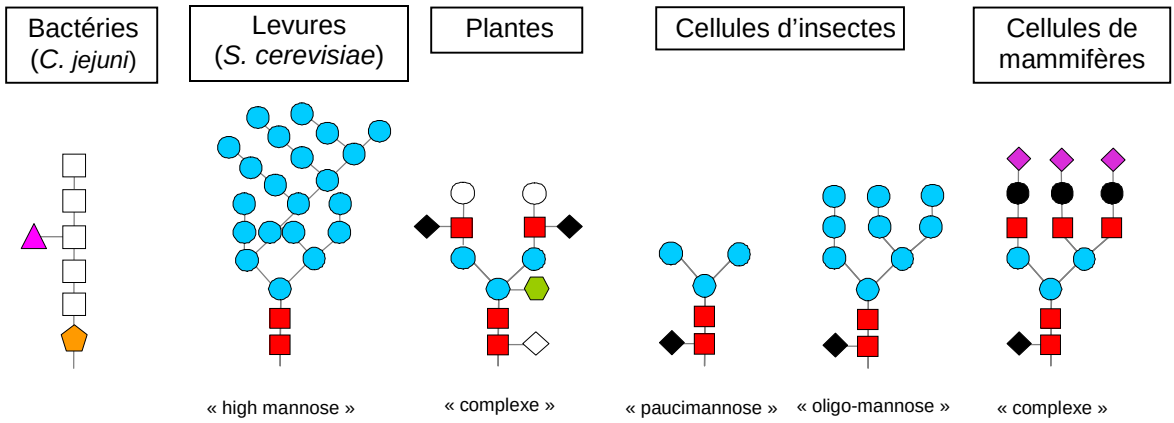


Figure I.1 : Exemples de structures N-glycanniques caractéristiques des glycoprotéines en fonction du système d'expression considéré.
Glucose (▲), GlcNAc (■), mannose (●), α1,6-fucose (◆), α1,3-fucose (◇), β1,2-xylose (⬣), GalNAc (□), bacillosamine (⬟), β1,4-galactose (●), β1,3-galactose (○), acide sialique (◆).

3.2.1 Les procaryotes

Il a longtemps été postulé que les bactéries ne possédaient pas de machinerie intracellulaire capable d'effectuer les modifications post-traductionnelles, en particulier la N-glycosylation et la O-glycosylation. Cependant, des structures N-glycanniques ont été caractérisées chez les archaebactéries alors que des O-glycannes semblent être présents de façon prépondérante chez les eubactéries (Schäffer *et al*., 2001; Moens et Vanderleyen, 1997). Des glycoprotéines possédant des N-glycannes ont également été détectées chez *Campylobacter jejuni*, bactérie Gram$^-$ (Wacker *et al*., 2002). L'isolement du gène *pglB* codant une protéine transmembranaire et possédant des homologies de séquences avec le gène *sst3p* codant une des huit sous-unités du complexe de l'OST de la levure, suggère que la protéine PglB est une homologue bactérienne de l'OST eucaryotique (Wacker *et al*., 2002). L'analyse de la structure des N-glycannes de 22 glycoprotéines par spectrométrie de masse et RMN révèle la présence d'un heptasaccharide, composé d'un résidu bacillosamine (2,4-diacétoamido-2,4,6-tridésoxy-D-glucopyrannose), cinq résidus GalNAc et un résidu glucose branché (Young *et al*., 2002) (figure I.1). Comme chez les eucaryotes, la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr, appelée séquon, constitue un site potentiel de N-glycosylation. Néanmoins, la présence de ce séquon sur la protéine est essentielle mais non suffisante pour la glycosylation. En effet, pour que la protéine soit glycosylée, il faut que la chaîne polypeptidique soit au préalable exportée vers le périplasme, compartiment cellulaire où a lieu le transfert du précurseur oligosaccharidique sur la protéine (Nita-Lazar *et al*., 2004).

Bien que les travaux récents aient mis en évidence l'existence d'un processus de N-glycosylation dans les bactéries, les structures N-glycanniques identifiées diffèrent considérablement de celles retrouvées sur les glycoprotéines humaines. Ces structures sont susceptibles d'engendrer des réactions immunitaires chez l'homme, c'est pourquoi des systèmes d'expression eucaryotiques seront davantage privilégiés pour la production de protéines dont les modifications post-traductionnelles sont essentielles à l'activité biologique.

3.2.2 Les levures

3.2.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Les levures sont capables de réaliser certaines modifications post-traductionnelles mais la glycosylation n'est cependant pas identique à celle retrouvée chez l'homme. En effet, ces micro-organismes produisent des N-glycannes de type oligomannosidique (*high-mannose*) (figure I.1), c'est-à-dire constitués d'une cinquantaine à une centaine de résidus mannose (Gemmill *et al*., 1999). Ces glycannes ne ressemblent guère aux glycannes des cellules des animaux supérieurs, si bien que les glycoprotéines produites dans ces systèmes d'expression sont souvent antigéniques pour l'homme.

3.2.2.2 *Pichia pastoris*

En comparaison avec *S. cerevisiae,* trois différences principales apparaissent quant à la structure des N-glycannes associés aux protéines hétérologues exprimées chez *P. pastoris* (Cereghino *et al*., 2000). Il est fréquent de ne pas trouver de structures N-glycanniques hyper-mannosylées. Il semble que les structures glycanniques identifiées soient majoritairement de type $Man_8GlcNAc_2$ ou $Man_9GlcNAc_2$ (Montesino *et al*., 1998). Une autre différence réside dans la présence de résidus α1,6-mannose sur le noyau des N-glycannes associés à l'invertase (Trimble *et al*., 1991), le t-PA (Miele *et al*., 1997) ou d'autres protéines (Montesino *et al*., 1996). Enfin, les N-glycannes ne possèdent pas de résidus mannose terminaux liés en α1,3 (Verostek et Trimble, 1995). En plus de la présence de N-glycannes de type *high-mannose*, des structures de type O-mannose, absentes sur les protéines natives, ont été mises en évidence sur l'anti-thrombine III produite chez *P. pastoris* (Mochizuki *et al*., 2001). Dans ce cas, la présence des O-glycannes réduit de 50% l'activité de la glycoprotéine

produite. Ainsi, toutes ces différences font des protéines produites par *P. pastoris* des molécules difficilement utilisables en thérapeutique humaine.

Compte tenu des atouts économiques attractifs des levures, plusieurs équipes se sont intéressées aux possibilités d'« humaniser » les voies de glycosylation dans ces hôtes, de façon à produire des glycoprotéines similaires aux glycoprotéines humaines (Gerngross, 2004). Deux stratégies ont été adoptées pour produire des protéines recombinantes humanisées : la modification de la séquence en acides aminés afin d'éliminer des sites de glycosylation (Asami *et al*., 2000) ou la construction de souches génétiquement modifiées possédant des voies de glycosylation « humaines ». Ainsi, en exprimant le gène codant une 1,2-α-D-mannosidase, Callewaert *et al*. (2001) ont réussi à convertir le précurseur $Man_8GlcNAc_2$ en $Man_5GlcNAc_2$, qui ne peut plus être le substrat des hyperglycosylations. La délétion de gènes codant certaines glycosyltransférases et l'insertion de gènes codant d'autres glycosyltransférases humaines ou mammaliennes, non exprimées chez la levure, ont également abouti à la production de glycannes complexes humanisés, possédant des résidus galactose terminaux chez *P. pastoris*. (Bobrowicz *et al*., 2004).

3.2.3 Les plantes transgéniques

Sous leur forme actuelle, les plantes ne sont pas encore idéales pour la production en masse de protéines recombinantes car elles synthétisent des molécules dont la glycosylation n'est pas toujours compatible avec une application thérapeutique chez l'homme. C'est seulement dans les compartiments tardifs de l'appareil de Golgi que la maturation des N-glycannes diffère chez les plantes, en particulier en raison de l'ajout de résidus β1,2-xylose et d'α1,3-fucose à de très nombreux glycannes végétaux (Faye *et al*., 2001; Lerouge *et al*., 1998) (figure I.1). L'administration de protéines thérapeutiques portant de telles structures glycanniques peut se révéler être fortement immunogène pour l'homme.

De nombreux travaux de type génie métabolique sont actuellement en cours afin d'améliorer la machinerie de glycosylation des végétaux. La plupart des stratégies étudiées afin d'humaniser les N-glycannes concernent l'inhibition de glycosyltransférases résidentes de l'appareil de Golgi (von Schaewen *et al*., 1993) ou l'expression de nouvelles glycosyltransférases telles la N-acétylglucosaminyl transférase I humaine (von Schaewen *et*

al., 1993), l'α2,6-sialyltransférase (Wenderoth *et al*., 2000) ou la β1,4-galactosyltransférase (Bakker *et al*., 2001). La présence de glycannes sialylés endogènes chez les plantes est sujette à controverse : les résultats de Shah *et al*. (2003) ont montré l'existence de glycoconjugués sialylés dans les cellules végétales, alors que les mêmes expériences reproduites par Séveno *et al*. (2003) ont révélé que si l'acide sialique est détecté, il n'était pas associé aux structures N-glycanniques. L'obtention de glycannes sialylés chez les plantes, en adaptant la machinerie de maturation des N-glycannes végétaux, nécessiterait le transfert d'au moins cinq gènes hétérologues différents codant des enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'acide sialique dans le cytosol et son transport dans l'appareil de Golgi (Faye *et al*., 2005). Ainsi, la production de glycoprotéines recombinantes sialylées chez les plantes représente un nouveau défi dans le domaine des biotechnologies végétales.

Plusieurs protéines d'intérêt pharmaceutique ont été produites chez les plantes mais de façon relativement restreinte : des protéines plasmatiques, des vaccins, des anticorps, des facteurs de croissances, hormones et cytokines, des enzymes…A l'heure actuelle, seules deux protéines sont commercialisées : l'avidine (Hood *et al*., 1997) et la β-glucuronidase (Witcher *et al*., 1998). Mais de nombreuses molécules produites dans des systèmes végétaux font l'objet de tests cliniques et les plantes sont essentiellement utilisées pour la production d'anticorps (Ko et Koprowski, 2005; Stoger *et al*., 2002) et de vaccins (Streatfield et Howard, 2003; Walmsley et Arntzen, 2003). Des vaccins contre l'antigène de surface du virus de l'hépatite B ou d'autres antigènes sont notamment à l'étude. Plusieurs anticorps, encore appelés « planticorps », parfaitement actifs, ont été obtenus par l'utilisation des plantes comme système d'expression. L'un d'eux, CaroRX, ajouté à la nourriture est capable de protéger des souris contre l'espèce bactérienne *Streptococcus mutans,* responsables des caries dentaires, et est actuellement en phase d'essais cliniques (Ma *et al*., 1998).

3.2.4 Les animaux transgéniques

La glande mammaire des animaux transgéniques ne procède pas toujours de manière satisfaisante aux maturations post-traductionnelles des protéines, et ce, d'une manière peu prévisible. Peu de travaux ont été menés quant à l'étude de la glycosylation des protéines recombinantes dans le lait d'animaux transgéniques. Néanmoins, James *et al*. (1995) et Cole

et al. (1994) ont montré que peu de protéines possédant des glycannes de type complexe étaient produites dans le lait de souris et de chèvres transgéniques respectivement.
Cependant, les animaux transgéniques sont capables de produire des glycoprotéines relativemant complexes, sans manipulations génétiques préalables. Par exemple, la superoxyde dismutase humaine produite dans le lait de lapins transgéniques est active, sous forme dimérique, normalement glycosylée et associée à l'ion cuivre (Strömqvist *et al*., 1997). En revanche, l'α1-antitrypsine humaine, synthétisée par la glande mammaire de la brebis, n'est pas complètement glycosylée. Dans le cas de la production de l'anti-thrombine III humaine dans le lait de chèvre, celle-ci possède des glycannes de structure appropriée pour une utilisation en thérapeutique humaine. En effet, l'anti-thrombine III possède un ratio NeuAc/NeuGc plus élevé que la protéine plasmatique humaine, les acides sialiques sont liés exclusivement en α2,6 et les résidus α1,3 galactose sont susbtitués par des résidus GalNAc (Zhou *et al*., 2005).

Compte-tenu de la complexité du système de production que constituent les animaux transgéniques, peu de travaux d'humanisation des voies métaboliques de la glycosylation ont été conduits jusqu'à présent. Bry *et al*. (1996) ont réussi à faire exprimer une α1,3/4 fucosyltransférase à des souris transgéniques adultes. Cependant, la majorité des études publiées consiste en l'élimination ou la réduction de l'expression de xénoépitopes α1,3 galactose présents sur les glycannes des protéines, car ces épitopes sont immunogènes pour l'homme, particulièrement dans le cas des xénotransplantations (Sandrin *et al*., 2001). Des tentatives de blocage des xénoépitopes immunogènes par knock-out ont permis la production d'α-galactosidase et d'α1,2-fucosyltransférase (Osman *et al*., 1997). Le progrès des technologies de xénotransplantations et des techniques de clonage ont ensuite rendu possible la production de porcs transgéniques dont les cellules n'expriment pas d'α1,3-galactosyltransférase (Ramsoondar *et al*., 2003; Lai *et al*., 2002). Pour éviter les problèmes générés par des protéines possédant des structures glycanniques produites par l'animal transgénique différentes de celles présentes sur les protéines humaines, Parker *et al*. (2004) ont éliminé, par mutagénèse, le site de N-glycosylation de la fétoprotéine produite dans le lait de chèvre. Dans ce cas, la protéine recombinante présente une activité identique à la protéine humaine. Il va de soi que ce type de stratégie ne sera envisageable que si la glycosylation n'est pas essentielle pour l'activité biologique de la protéine d'intérêt.

3.2.5 Les cellules animales

3.2.5.1 Les cellules d'insectes

Contrairement aux structures glycanniques complexes et multi-antennées observées sur les protéines produites par les cellules de mammifères, les N-glycannes synthétisés par les cellules d'insectes sont de type oligomannose (Man_{9-5}-$GlcNAc_2$) ou pauci-mannose (Man_3-$GlcNAc_2$). En outre, ces dernières portent souvent, sur le résidu GlcNAc d'attache, un résidu fucose lié en α1,6, et chez certaines espèces, en α1,3 (Altmann *et al*., 1999) (figure I.1).

De nombreux travaux ont alors été menés afin d'humaniser les glycoprotéines recombinantes produites par le système baculovirus-cellules d'insectes (Jarvis *et al*., 2003). L'objectif étant la production de glycoprotéines portant des structures N-glycanniques de type complexe, les cellules d'insectes, ou les virus, ont été transfectés avec des gènes codant la β1,4-galactosyltransférase et l'α2,6-sialyltransférase. La lignée cellulaire *Trichoplusia ni*-4h a ainsi été générée (Hollister et Jarvis, 2001). Il a, en effet, longtemps été considéré que les cellules d'insectes n'étaient pas capables de réaliser la sialylation en raison de la présence en faible quantité d'acide sialique (Lawrence *et al*., 2000) et de la non détection de CMP-acide sialique, substrat des sialyltransférases (Tomiya *et al*., 2001; Hooker *et al*., 1999) dans les cellules *Spodoptera frugiperda* (Sf9). Récemment, l'existence d'acide sialique sur les glycoprotéines a été mise en évidence dans les cellules *Trichoplusia ni*-4h, cultivées en présence de sérum : cette lignée cellulaire est capable de sialyler la phosphatase alcaline placentaire sécrétée (SeAP) avec un taux de sialylation de 20% (Joosten et Schuler, 2003; Joshi *et al*., 2001). Hollister *et al*. (2003) ont montré que ces cellules pouvaient produire des glycoprotéines sialylées lorsqu'elles étaient cultivées en présence d'une source exogène d'acide sialique, en l'occurrence les acides sialiques présents dans le sérum ou sur la fétuine. Il semblerait que l'acide sialique porté par les glycoprotéines sialylées extracellulaires soit utilisé pour la synthèse de CMP-acide sialique, transporté dans l'appareil de Golgi puis utilisé pour la sialylation *de novo* des glycoprotéines à l'aide d'une sialyltransférase intracellulaire. Aumiller *et al*. (2003) ont transfecté la lignée *Trichoplusia ni*-4h avec deux gènes codant des enzymes mammaliennes impliquées dans la biosynthèse de CMP-acide sialique : la lignée mutante résultante est capable de synthétiser du CMP-acide sialique et de sialyler efficacement les glycoprotéines lorsqu'elles sont cultivées en absence de sérum, de sialoglycoprotéines exogènes ou d'acide sialique libre. Néanmoins, une autre lignée de

cellules DpN1, issue des lépidoptères *Danaus plexippus*, est capable de synthétiser des glycannes de type complexe et sialylés, sans aucune manipulation génétique préalable (Palomares *et al*., 2003). En présence de sérum dans le milieu de culture, 26% des glycannes sont de type complexe, 12% d'entre eux sont galactosylés et 13% sont sialylés. Il apparaît ainsi que la glycosylation reste encore l'une des limites majeures du système d'expression cellules d'insectes/baculovirus.

Des vaccins à usage vétérinaire produits dans des cellules d'insectes sont déjà sur le marché, notamment le vaccin contre la fièvre aphteuse, développé par la société Intervet et commercialisé aux Etats-Unis, ou contre la grippe aviaire (Swayne *et al*., 2000). En ce qui concerne la thérapie humaine, des vaccins recombinants anti-cancer (Samanci *et al*., 1998), contre le virus de l'immunodéficience humaine (Keefer *et al*., 1994) ou contre l'agent du paludisme (Shi *et al*., 2000) sont en cours d'évaluation clinique et pourraient prochainement arriver sur le marché. La société américaine Protein Sciences Corporation a développé un vaccin contre le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) produit par des cellules d'insectes, dont les essais cliniques se déroulent actuellement.
De façon plus anecdotique, des insectes entiers, des larves ont également été utilisés pour la production d'IL-2, d'IFN-α ou de vaccin anti-grippal (Dodet *et al*., 1990; Pham *et al*., 1999; Cha *et al*., 1999).

3.2.5.2 Les cellules de mammifères

Pour ce qui est de la glycosylation, les cellules CHO sont capables de reproduire des séquences oligosaccharidiques de structures quasi-similaires à celles retrouvées chez l'homme. Ceci sera traité en détails dans le paragraphe III du chapitre II.

Au regard des avantages et des inconvénients de chaque système décrit précédemment, il apparaît clairement que le choix du système d'expression doit tenir compte de divers critères, économiques, qualitatifs voire éthiques. La qualité des protéines recombinantes produites est un impondérable et oriente le choix du système de production.
Si la glycosylation est indispensable, la protéine sera préférentiellement exprimée dans des cellules de mammifères, en particulier les cellules CHO et les cellules NSO. En revanche, si la protéine naturelle n'est pas glycosylée, l'on pourra choisir un système de production

bactérien, tel *E. coli*. Dans le cas où la glycosylation est souhaitable mais non essentielle à l'activité biologique de la protéine, les arguments économiques trancheront.

II. La culture en masse des cellules animales

1. Le milieu de culture

1.1. La composition du milieu de culture

1.1.1 Les milieux de base

Les milieux de base utilisés en culture cellulaire contiennent le plus souvent des éléments minéraux, des acides aminés et organiques, des vitamines, un tampon, un indicateur de pH et une source carbonée. Plusieurs milieux de base commerciaux, élaborés il y a plus de trente ans, sont désormais disponibles (RPMI, MEM, DMEM, IMDM, Ham's F12, etc…). Ils sont généralement complémentés par l'ajout de divers composants tels des lipides, des protéines, des acides aminés, des modulateurs de croissance ou de production, des cytokines, des antibiotiques, des nucléotides, des surfactants, etc…

1.1.2 Le glucose

Le glucose constitue la principale source d'énergie et de carbone apportée aux cellules. Sa concentration physiologique intracellulaire chez l'homme est de 5 mM. Dans les milieux de culture, il est présent à des concentrations comprises entre 5 et 25 mM. Afin de limiter la production de lactate, ce sucre métabolisé rapidement peut être associé ou substitué par d'autres glucides, métabolisés plus lentements, comme le maltose (Duval *et al*., 1982), le galactose (Wagner, 1990) ou le fructose (Dardenne, 1995; Imamura *et al*., 1982).

1.1.3 La glutamine

Acide aminé essentiel, la glutamine est la deuxième principale source d'énergie et de carbone des cellules. Elle est importante pour la croissance cellulaire, et intervient également en tant que précurseur, dans la biosynthèse des nucléotides puriques et pyrimidiques, des acides nucléiques et des acides aminés (Engström et Zetterberg, 1984). Sa concentration dans les milieux de culture est généralement dix fois supérieure à celle des autres acides aminés

(0,5 à 5 mM). Il est important que le milieu de culture contienne de la glutamine, car les cellules animales (hybridomes et myélomes) sont dépourvues de glutamine synthétase ou possèdent une enzyme de activité faible (cellules CHO et BHK). Par conséquent, elles sont incapables de synthétiser la glutamine à partir d'ions ammonium et de glutamate (Neermann et Wagner, 1996).

1.1.4 Les acides aminés

Les acides aminés sont les principaux pourvoyeurs d'azote, et sont impliqués dans la biosynthèse des protéines et des nucléotides chez les mammifères. Treize acides aminés sont dits essentiels pour les cellules animales, il s'agit de l'arginine, la cystéine, la glutamine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane, la tyrosine et la valine (Eagle, 1959). Cinq autres acides aminés sont également apportés par le milieu : l'arginine, la cystéine, le glutamate, l'histidine et la tyrosine. Les concentrations en acides aminés sont variables en fonction du milieu de culture considéré.

1.1.5 Les lipides

Les lipides sont des éléments constitutifs des membranes cellulaires. Le cholestérol et les acides gras sont les composants lipidiques principaux des milieux de culture. Dans le cas de milieux sans sérum, il est indispensable de les ajouter pour assurer la croissance cellulaire (Barnes et Sato, 1980). Certains acides gras essentiels, comme l'acide linoléïque, ont un effet stimulateur sur la croissance cellulaire (Castro *et al*., 1996).

1.1.6 Les vitamines et les cofacteurs

Tous les milieux de culture ne contiennent pas la totalité des vitamines nécessaires à la croissance cellulaire. Les vitamines sont des molécules organiques requises en faible quantité, qui ne peuvent pas être synthétisées par les cellules et qui doivent, en conséquence, entrer dans la composition du milieu de culture. Ce sont surtout des vitamines hydrosolubles qui sont apportées par le milieu : l'acide nicotinique (niacine) et le nicotinamide (vitamine PP), la thiamine (vitamine B_1), la riboflavine (vitamine B_2), l'acide pantothénique,

la pyridoxine (vitamine B_6), la biotine (vitamine H), la cobalamine (vitamine B_{12}), l'acide folique et l'acide ascorbique (vitamine C). Ces vitamines interviennent en tant que coenzymes ou dans la composition de certains coenzymes. La vitamine C est également une substance anti-oxydante. Certains auteurs ont montré que la concentration de certaines vitamines présentes dans les milieux couramment employés pouvait être insuffisante et conduire à la limitation de la croissance cellulaire (Kurano *et al*., 1990b). De plus, la concentration initiale d'une vitamine dans un milieu de culture est susceptible de modifier la vitesse de croissance cellulaire ainsi que la productivité (Hiller *et al*., 1994).

1.1.7 Les nucléotides

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

1.1.8 Les éléments minéraux

Les ions inorganiques interviennent dans le maintien du pH et l'osmolarité du milieu, le transfert de molécules à travers les membranes et comme cofacteurs enzymatiques. Ces ions sont notamment le calcium, le magnésium, le phosphate, le potassium et le sodium. Les ions métalliques sont apportés à l'état de traces par le milieu de culture, car ils semblent essentiels à la croissance cellulaire, ils participent au site actif de certaines enzymes et interviennent dans les réactions de la chaîne respiratoire (fer).

1.2 Le sérum de veau foetal

Malgré un coût relativement élevé, le sérum est encore actuellement largement utilisé pour la formulation des milieux de culture. L'ajout de sérum de veau fœtal permet d'augmenter la croissance cellulaire et protège notamment les cellules contre les forces de cisaillement. La composition du sérum est complexe et variable d'un lot à l'autre. Il contient de fortes concentrations en protéines ce qui peut compliquer la purification de la protéine recombinante d'intérêt. Il comporte également des enzymes hydrolytiques. L'inconvénient majeur de l'utilisation du sérum est la présence potentielle d'agents infectieux pathogènes (virus, prions, mycoplasmes…). Ainsi se sont développés, ces dernières années, des milieux de culture sans sérum, voire dépourvus de protéines d'origine animale. La composition chimique de tels milieux est alors parfaitement définie et contrôlée. Le sérum est en général substitué par des molécules comme l'insuline, la transferrine, l'albumine et des lipides. Les hydrolysats végétaux se révèlent également être une alternative particulièrement intéressante (Farges, 2005; Mols et *al*., 2003).

2. La culture de cellules de mammifères en bioréacteurs

2.1 Les paramètres opératoires contrôlés

2.1.1 La température

La température du milieu de culture doit être régulée de façon précise. La température optimale de croissance des cellules animales est de 37°C, mais la croissance n'est pas perturbée outre mesure pour des températures comprises entre 36,5°C et 38°C (Ducommun *et al*., 2002). En deçà, la croissance est ralentie (Kurano *et al*., 1990a). A des températures trop élevées, les cellules génèrent des protéines de choc thermique (*heat shock proteins*) dont le rôle est d'adapter la cellule à cette élévation de température (Jenkins et Hovey, 1993).

2.1.2 Le pH

Les cellules animales tolèrent de faibles variations de pH et doivent par conséquent être cultivées dans un milieu de culture dont le pH est compris entre 6,8 et 7,8, la valeur de pH optimale pour la croissance étant voisine de 7,2. Le milieu de culture est généralement

tamponné par du bicarbonate de sodium. Au cours de cultures en bioréacteurs, les cellules peuvent produire de l'acide lactique en quantité importante. Le milieu de culture est alors maintenu à un pH proche de la neutralité par ajout de soude. La régulation du pH est essentielle car un pH inférieur à 7 peut provoquer un décès cellulaire important sous forme de lyse (Goergen *et al*., 1993).

2.1.3 L'oxygène dissous

L'oxygène est primordial pour les cellules animales puisqu'elles consomment entre 0,05 et 0,5 mmol O_2/h/10^9 cellules (Richter *et al*., 1972). En bioréacteur, la surface de contact entre l'air et le ciel est trop faible pour assurer, à l'interface air-liquide, les échanges diffusionnels suffisants. C'est pourquoi l'oxygène est apporté dans le milieu de culture, par exemple par un système de diffuseur fritté. Ceci permet de maintenir la pression partielle en oxygène (pO_2) à une valeur de consigne proche de 50% de la saturation en air. Si la pO_2 est trop faible, la respiration cellulaire est compromise. Si la pO_2 est trop élevée, les cellules, en état de stress oxydant, produisent des espèces oxygénées hyper-réactives et toxiques (anions superoxydes, radicaux peroxydes).

2.2 Les modes de culture et les technologies des bioréacteurs

Le mode discontinu (*batch*) est un système, dans lequel les cellules sont ensemencées à une certaine densité cellulaire, et aucun milieu n'est ajouté, ni soutiré. Ainsi, l'épuisement d'un ou plusieurs nutriments et/ou l'accumulation de composés toxiques vont provoquer l'arrêt de la croissance. La durée de la culture est de l'ordre d'une semaine, en fonction de la lignée cellulaire considérée et du milieu de culture employé. En fin de croissance, le réacteur peut être vidé à 90%, et les cellules restantes réensemencées dans du milieu neuf, permettant de redémarrer une nouvelle culture. Dans ce cas, on parle d'un mode de culture « recharge-récolte ». Deux technologies de réacteurs sont disponibles pour réaliser les cultures en mode discontinu : les réacteurs parfaitement agités et les réacteurs de type gazo-siphon, dans lesquels l'agitation est effectuée au moyen d'un flux montant de bulles d'air. Les volumes des cuves utilisées industriellement aujourd'hui, en mode discontinu, varient de 1 000 à 20 000 litres (Kretzmer, 2002).

En mode semi-continu (*fed-batch*), le milieu de culture est ajouté en continu ou par paliers. Aucun soutirage n'est réalisé, si bien que le volume du milieu de culture dans le bioréacteur va augmenter. En comparaison avec le mode discontinu, le mode semi-continu permet de prolonger la phase de croissance par l'apport continu d'éléments nutritifs, ce qui engendre généralement une productivité accrue. Compte tenu de cet intérêt économique indiscutable, le mode semi-continu est habituellement utilisé pour les productions à l'échelle industrielle et s'est énormément développé ces dernières années. Les capacités volumiques des cuves peuvent alors atteindre 15 000 litres (Werner et Noé, 1993).

Le mode continu consiste à ajouter en continu du milieu de culture neuf et soutirer en continu le milieu usagé. Il n'y a donc aucune variation de volume. Ce système permet de maintenir les cellules à une viabilité élevée durant une longue période; une culture peut ainsi durer plusieurs mois. Ce mode de culture demeure néanmoins peu utilisé à l'échelle industrielle.

Les réacteurs peuvent être munis d'un dispositif de rétention des cellules, permettant de soutirer du milieu de culture sans cellules. On parle alors de réacteurs perfusés. Le mode de culture perfusé permet d'obtenir de hautes densités cellulaires et d'utiliser des taux de dilution supérieurs à la vitesse maximale spécifique de croissance (Mercille *et al.*, 2000). Les composés labiles peuvent également être éliminés rapidement du milieu de culture. Les cultures en mode perfusé demandent plus de mise au point lorsqu'il s'agit de passer à grande échelle, compte tenu de la relative complexité de la technologie à mettre en oeuvre. De nombreuses études sont menées à l'échelle du laboratoire, mais peu d'exemples de procédés industriels utilisant cette technologie sont décrits dans la littérature (Kretzmer, 2002). Les réacteurs perfusés peuvent être classés en deux catégories : les réacteurs dans lesquels les cellules sont circulantes et ceux dans lesquels les cellules sont immobilisées. Dans ce dernier cas, les cellules peuvent être immobilisées entre deux membranes planes (Goergen *et al.*, 1994) ou dans un faisceau de fibres creuses (Choi *et al.*, 1995). Lorsque les cellules sont en suspension, plusieurs dispositifs de rétention cellulaire peuvent être utilisés. Elles peuvent être séparées du milieu de culture par micro- ou ultrafiltration (Brotherton et Chau, 1996), par centrifugation continue (Johnson *et al.*, 1996), à l'aide d'un filtre rotatif encore appelé « *spin-filter* » (Deo *et al.*, 1996), par sédimentation gravitationnelle (Wen *et al.*, 2000) ou acoustique (Shirgaonkar *et al.*, 2004 ; Gorenflo *et al*. 2003 ; Merten, 2000).

III. La glycosylation des protéines dans les cellules animales

La structure primaire de la chaîne polypeptidique ne dépend que de la séquence nucléotidique de l'ADN et est donc parfaitement prévisible, car le code génétique est universel. Cependant, la plupart des protéines subissent des modifications co- ou post-traductionnelles, qui dépendent de la protéine et de l'équipement enzymatique de la cellule hôte, et sont donc plus difficilement prévisibles.

La glycosylation est un terme générique désignant les différentes réactions d'addition covalente de structures glucidiques, appelés glycannes, sur une protéine (glycoprotéine) ou sur un lipide (glycolipide). Il s'agit d'un processus intracellulaire éminemment complexe. La plupart des protéines sont en effet glycosylées et les glycoprotéines sont présentes dans tous les organismes : bactéries, plantes et animaux. D'après Hanish (2001), plus de la moitié des protéines répertoriées seraient des glycoprotéines.

1. Macrohétérogénéité et microhétérogénéité

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

2. N-Glycosylation et O-Glycosylation

Suivant la nature de la liaison O- ou N-glycosidique, on peut distinguer deux groupes de glycoprotéines : les O-glycosylprotéines et les N- glycosylprotéines.

2.1 La O-glycosylation

Dans le cas de la O-glycosylation, la structure oligosaccharidique est liée de façon covalente sur un groupement hydroxyl des acides aminés sérine, thréonine, tyrosine, hydroxylysine ou hydroxyproline (figure I.2).

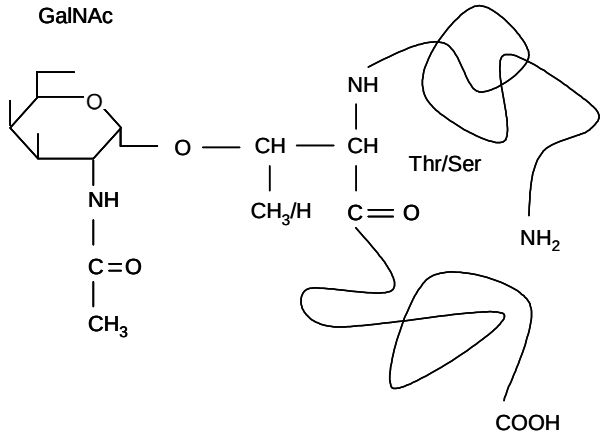


Figure I.2 : Exemple de liaison O-glycosidique GalNacα1Ser/Thr.

Le processus de O-glycosylation se déroule dans l'appareil de Golgi et consiste en une série d'ajouts de groupements monosaccharidiques sur une chaîne polypeptidique en voie de synthèse (Lodish *et al*., 2004). A ce jour, aucune séquence consensus de fixation des O-glycannes sur les protéines n'a pu être caractérisée. Néanmoins, la glycosylation des groupements hydroxyl de l'acide aminé est influencée par la conformation locale de la chaîne polypeptidique. Autour du site de glycosylation, les résidus prolines sont en général observés en position -3, -1, +3. L'alanine est abondante entre -4 et +2, et la glycine fréquemment retrouvée en position -6 (O'Connell *et al*., 1991). Plusieurs types de O-glycannes ont été décrits dans la littérature (Spiro, 2002) et les motifs les plus fréquents sont présentés dans le tableau I.2.

Tableau I.2 : Diversité des structures O-glycanniques retrouvées dans différents organismes, animaux ou végétaux.

Résidus impliqués dans la liaison O-glycosidique		**Hôte caractéristique**	**Glycoprotéines caractéristiques**	**Références**
Acide aminé de la protéine	**Glucide de la stucture glycannique**			
Sérine/thréonine	GalNAc	Cellules animales	Mucilagineuses	Sadler, 1984
Sérine/thréonine	GlcNAc	Eucaryotes	Nucléaires et cytosoliques	Chou *et al*., 1992
Sérine/thréonine	Mannose	Levures	Pas de protéine caractéristique	Herscovics et Orlean, 1993
Sérine/thréonine	Fucose	Cellules mammaliennes	EGF Facteurs de coagulation	Shao *et al*., 2002 Bjoern *et al*. ,1991
Sérine	Xylose	Cellules animales	Glycosaminoglycannes	Yaganashita *et al*., 1992
Hydroxylysine	Galactose	Vertébrés	Collagène	Colley et Baezinger, 1987
Hydroxyproline	Arabinose/Galactose	Plantes	Extensines	Qi *et al*., 1997 Faye *et al*., 2005

2.2 La N-glycosylation

La liaison covalente du glycanne à la protéine s'établit entre le carbone anomérique d'un résidu N-acétylglucosamine et l'azote de la fonction amide d'un résidu asparagine, appartenant à une séquence consensus de type Asn-X-Ser/Thr (figure I.3).

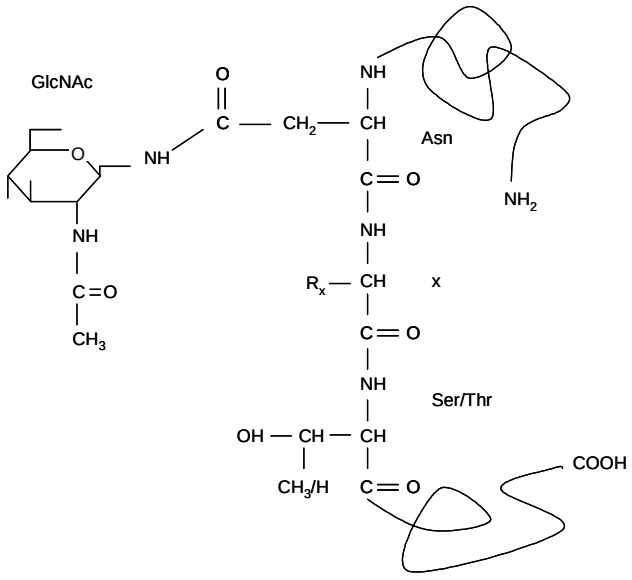


Figure I.3 : Liaison N-glycannique de type GlcNAcβ1Asn.

Les N-glycannes sont caractérisés par un noyau pentasaccharidique, de type $Man_3GlcNAc_2$, encore appelé *core* (figure I.4), sur lequel se fixent différentes séquences oligosaccharidiques baptisées antennes, du fait de leur morphologie, de leur flexibilité et de leur rôle de signaux de reconnaissance. Ces antennes possèdent à leurs extrémités les sucres dits périphériques.

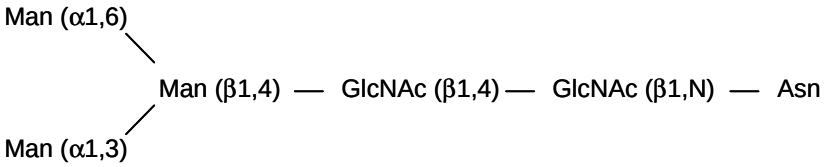


Figure I.4 : Structure du noyau (*core*) des N-glycosylprotéines.

Classiquement, trois types de structures N-glycanniques sont décrites chez les mammifères : le type oligomannosidique, le type complexe et le type hybride (Kornfeld et Kornfeld, 1985) (figure I.5).

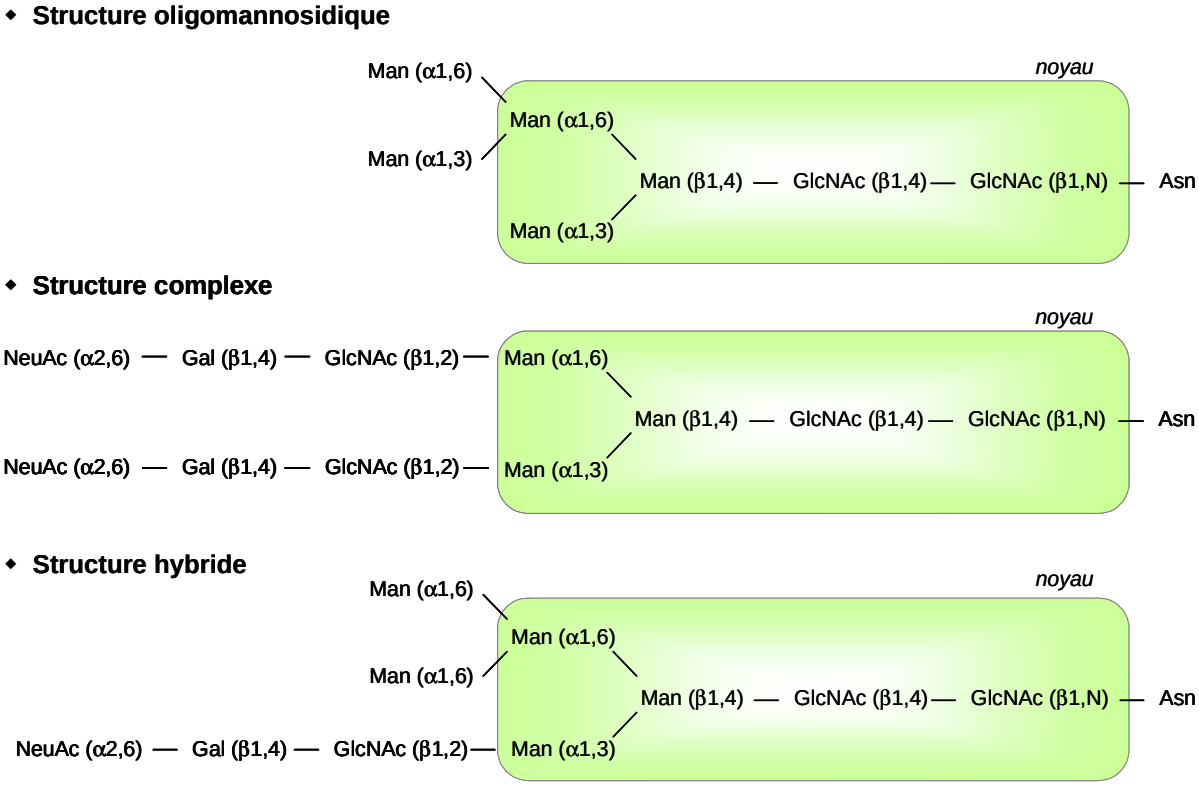


Figure I.5 : Les trois principaux types de N-glycannes (selon Kornfeld et Kornfeld, 1985).

3. Biosynthèse des N-glycosylprotéines dans les cellules de mammifères

La N-glycosylation constitue une modification post-traductionnelle majeure puisque la masse des glycannes peut représenter 5 à 85 % de la masse totale des glycoprotéines (Meynal-Salles et Combes, 1996). La différence fondamentale entre la synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines d'une part, et la synthèse des glycannes d'autre part, est que la première repose sur la reproduction fidèle d'un modèle, tandis que la seconde dépend du bon fonctionnement de la spécificité de toute une série d'enzymes. Ainsi, la glycosylation dépend de l'ordonnancement des réactions enzymatiques et de leur contrôle. Toutes ces réactions sont catalysées par des glycosyltransférases et des glycosidases. La N-glycosylation est un processus cellulaire relativement complexe, puisqu'il faut près de quarante réactions enzymatiques successives pour aboutir à la synthèse d'un glycanne. De plus, de nombreux précurseurs sont nécessaires à l'élaboration des diverses structures glycanniques.

3.1 Le cycle des dolichols

3.1.1 Les acteurs du cycle des dolichols

3.1.1.1 Les glycosyltransférases

Les réactions de la glycosylation sont catalysées par des enzymes particulières, les glycosyltransférases. La réaction consiste en un transfert d'un monosaccharide sur un accepteur et cette réaction se déroule généralement de la façon suivante :

X-sucre + accepteur-OH (ou –NH) → accepteur-O (ou –N)-sucre + X

Les groupements monosaccharidiques sont apportés par des substrats donneurs, les nucléotides-sucres. Ces molécules hydrophiles sont synthétisées dans le cytoplasme alors que la plupart des réactions de glycosylation se font dans la lumière du reticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi. Le passage des nucléotides-sucres au travers des membranes intracellulaires se fait grâce à des transporteurs spécifiques qui constituent un point de contrôle dans la régulation des réactions de glycosylation. Chaque glycosyltransférase est spécifique d'un accepteur, d'une liaison et d'un donneur (Burda *et al.*, 1999). Par conséquent, il existe un grand nombre de glycosyltransférases. Chez les eucaryotes supérieurs, plus de cents gènes codant des glycosyltransférases différentes ont été clonés à ce jour, et ces

enzymes possèdent toutes des similarités de topologies. Chaque enzyme a une localisation cellulaire précise et les différentes réactions de glycosylation sont compartimentées, ce qui implique que la biosynthèse d'un glycoconjugué nécessite la translocation de ce dernier dans ces différents compartiments.

3.1.1.2 Les nucléotides et nucléotides-sucres

a. Les nucléotides

Les nucléotides interviennent à de nombreux niveaux dans le métabolisme cellulaire. Toutes les cellules les synthétisent *de novo* ou à partir d'intermédiaires de dégradation (voies de récupération). Les nucléotides triphosphates, en particulier l'adénosine-5'-triphosphate (ATP), constituent des pourvoyeurs d'énergie universels. Directement ou par leurs dérivés, ils exercent un pouvoir régulateur sur les voies métaboliques qui les synthétisent ou les consomment. Les nucléotides sont aussi utilisés pour la synthèse des acides nucléiques.

- Les nucléotides pyrimidiques : l'UTP et le CTP

L'uridine-5'-triphosphate (UTP) intervient dans le processus de la glycosylation, en tant que précurseur de la biosynthèse des nucléotides-sucres, l'UDP-Glc et l'UDP-GlcNAc et l'UDP-GalNAc. L'UTP peut être généré par deux voies de biosynthèse distinctes : une voie de synthèse dite *de novo*, dans laquelle l'UTP est synthétisé à partir de carbamoyl-P (réactions 1 à 8), et une voie de synthèse dite de récupération, dans laquelle l'UTP est synthétisé à partir du nucléoside pyrimidique préformé, l'uracile (réactions 13 à 17) (figure I.6). Cette dernière voie, est d'un point de vue énergétique, bien plus économique que la synthèse *de novo*. L'UTP synthétisé *de novo* est préférentiellement utilisé pour la synthèse des UDP-sucres (UDP-Glc et UDP-GlcNAc) et des CDP-phospholipides, alors que l'UTP de la voie de récupération serait plutôt utilisé pour la synthèse d'ARN (Anderson et Parkinson, 1997). La carbamoyl phosphate synthétase (réaction 1) est activée par l'ATP, et le 5-phosphoribosyl-α-pyrophosphate (PRPP) est un activateur de deux enzymes, la carbamoyl phosphate synthétase (réaction 1) et l'orotate phosphoribosyltransférase (réaction 5). La régulation de la synthèse *de novo* des nucléotides pyrimidiques est plus active pendant la phase de croissance cellulaire, la régulation semble ensuite moins active en comparaison avec la régulation de la voie de récupération (Anderson et Parkinson, 1997).

Le cytidine-5'-triphosphate (CTP) est également impliqué dans le processus de glycosylation. Le CTP est donneur de groupement phosphate dans la réaction de phosphorylation du farnésyl pyrophosphate, aboutissant à la formation du dolichol-P, lipide d'attachement des structures oligosaccharidiques dans le RE. Cette réaction enzymatique est catalysée par une dolichol kinase. Le CTP est essentiellement synthétisé par une réaction d'amination de l'UTP (réaction 9), où l'azote amidique est apporté par la glutamine (Zalkin, 1985) et cette réaction est catalysée par la CTP synthase (figure I.6). Cette étape constitue une étape limitante dans la voie de biosynthèse des nucléotides cytidyliques et représente un point de contrôle important dans la synthèse des nucléotides pyrimidiques (Zalkin, 1985). Le CTP peut également être synthétisé à partir de la cytidine par une voie de récupération (réactions 10 à 12).

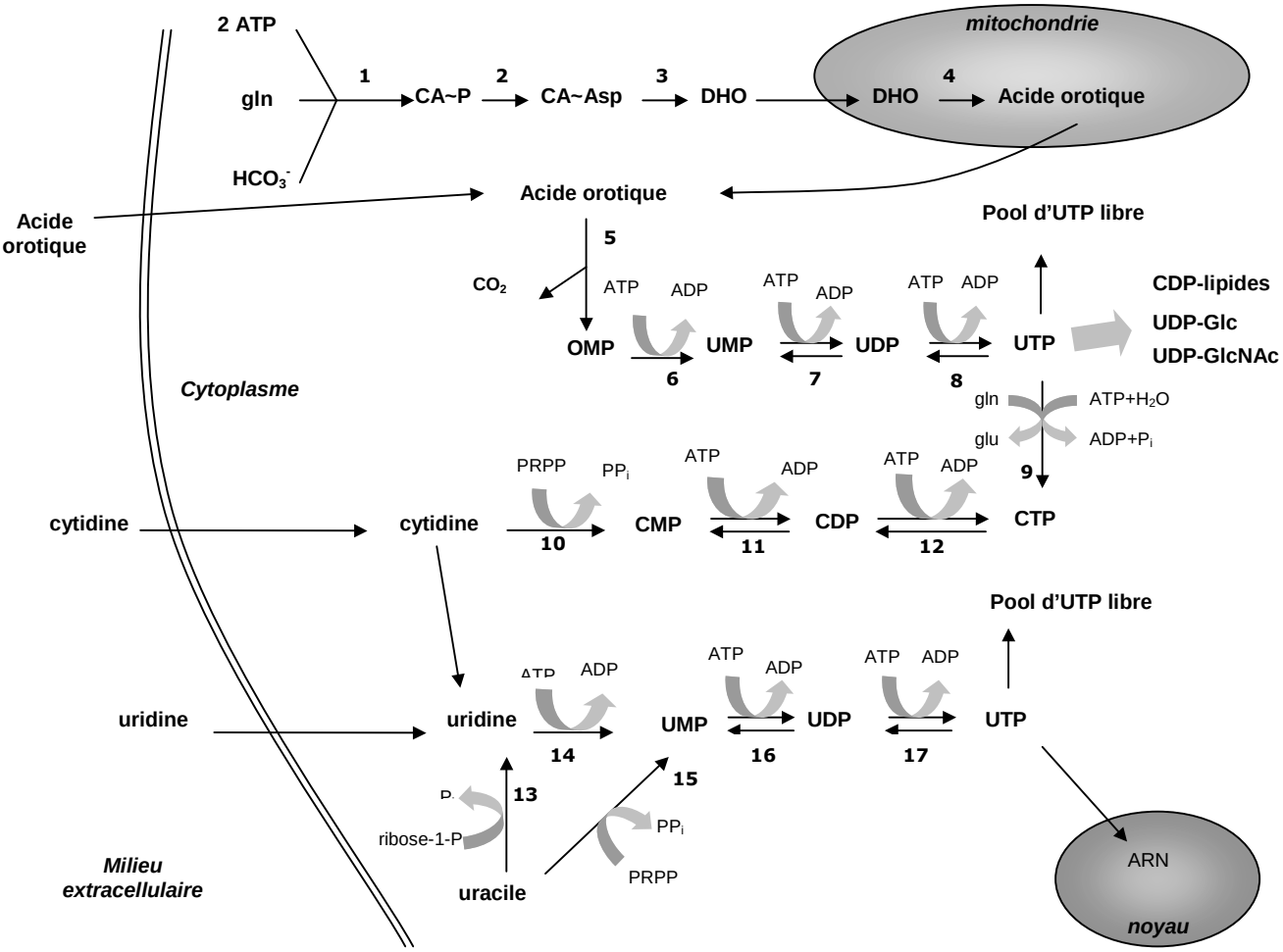


Figure I.6 : Voies de biosynthèse des nucléotides pyrimidiques.
1 : carbamoyl phosphate synthétase, 2 : aspartate transcarboxylase, 3 : dihydroorotase, 4 : dihydroorotate deshydrogénase, 5 : orotate phosphoribosyl transférase, 6 : OMP décarboxylase, 7 : nucléoside monophosphate kinase, 8 : nucléoside diphosphate kinase, 9 : CTP synthase, 10 : cytidine phophoribosyl transférase, 11 : nucléoside monophosphate kinase, 12 : nucléoside diphosphate kinase, 13 : nucléoside phosphorylase, 14 : nucléoside kinase, 15 : uracile phophoribosyl transférase, 16 : nucléoside monophosphate kinase, 17 : nucléoside diphosphate kinase.
CA~P : carbamoyl-phosphate, CA-Asp : carbamoyl-aspartate, DHO : dihydroorotate, OMP: orotidine-5'-monophosphate, ATP : adénosine-5'-triphosphate, ADP : adénosine-5'-diphosphate, CMP : cytidine-5'-monophospahte, CDP : cytidine-5'-diphosphate, CTP : cytidine-5'-triphosphate, UMP : uridine-5'-monophosphate, UDP : uridine-5'-diphosphate, UTP : uridine-5'-triphosphate, PRPP : 5-phosphoribosylpyrophosphate, gln : glutamine.

- Les nucléotides puriques : l'ATP et le GTP

L'adénosine-5'-triphosphate (ATP) joue un rôle essentiel dans les réactions du métabolisme énergétique et constitue également un substrat pour les réactions de phosphorylation des protéines (Quéméneur *et al*., 1994; Braakman *et al*., 1992). L'ATP est synthétisé de façon prépondérante dans les mitochondries (Coates *et al*., 1980). Les voies de biosynthèse des nucléotides puriques sont présentées sur la figure I.7. Un métabolite essentiel du cycle des pentoses phosphates est le ribose-5-phosphate (réaction 1). Utilisant ce précurseur, la pyrophosphokinase catalyse le transfert d'un groupe PP_i de l'ATP directement sur le ribose-5-phosphate. Le produit, le PRPP, est aussi un précurseur des pyrimidines, de l'histidine et du tryptophane. Cette étape de biosynthèse est alors suivie par dix réactions enzymatiques, aboutissant à la formation d'inosine-5'-monophosphate (IMP). L'IMP est ensuite le précurseur de l'adénosine-5'-monophosphate (AMP) (réactions 3 et 4) et de la guanosine-5'-monophosphate (GMP) (réactions 7 et 8). La synthèse *de novo* de l'AMP nécessite de la guanosine-5'-triphosphate (GTP) et de l'ATP, alors que la synthèse *de novo* du GTP nécessite du NAD^+ et des molécules d'ATP. Par les voies de récupération, l'AMP est synthétisé à partir d'adénine (réactions 11 à 13) et le GMP à partir de guanine (réactions 14 à 16). La quantité de nucléotides produits inhibe la pyrophosphokinase (réaction 1), régulant ainsi la vitesse de formation de l'IMP. Les enzymes de conversion de l'IMP en adénylosuccinate (réaction 3) et xanthosine-5'-monophosphate (XMP) (réaction 7) sont inhibées respectivement par l'AMP et le GMP. Enfin, l'augmentation de la concentration intracellulaire en ATP accèlère la synthèse de GMP, alors que la synthèse d'AMP augmente avec la concentration en GTP.

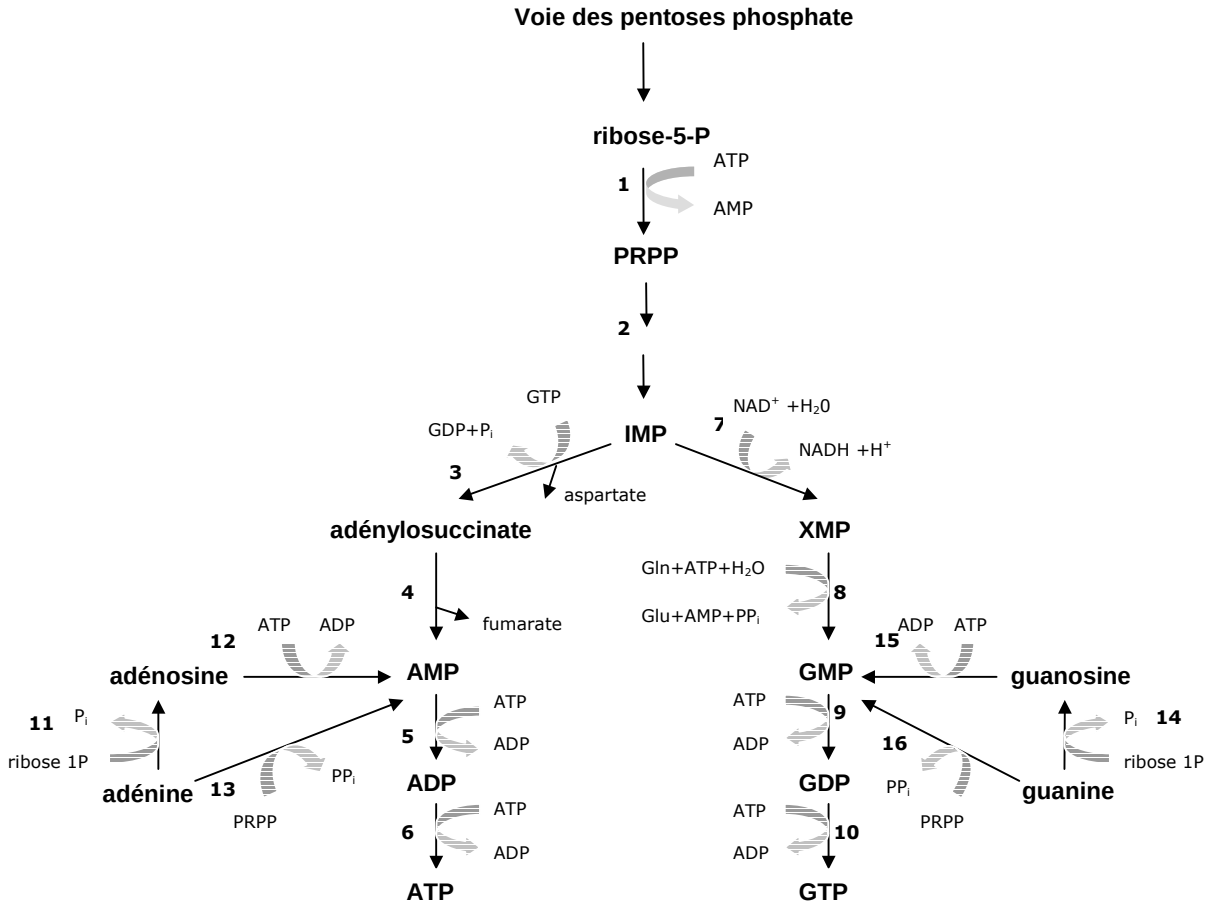


Figure I.7 : Voies de biosynthèse des nucléotides puriques.
1 : ribose phosphate pyrophosphokinase, 2 : successions de 10 réactions enzymatiques non représentées, 3 : adénylosuccinate synthétase, 4 : adénylosuccinate lyase, 5 : nucléoside monophosphate kinase, 6 : nucléoside diphosphate kinase, 7 : IMP deshydrogénase, 8 : GMP synthase, 9 : nucléoside monophosphate kinase, 10 : nucléoside diphosphate kinase, 11 : nucléoside phosphorylase ,12 : nucléoside kinase ,13 : adénosylphophoribosyl transférase, 14 : nucléoside phosphorylase, 15 : nucléoside kinase, 16 : guanine phophoribosyl transférase.
PRPP : 5-phosphoribosyl-pryrophospate, IMP : inosune-5'-monophosphate, XMP : xanthosine-5'-monophosphate, AMP : adénosine-5'monophosphate, ADP : adénosine-5'-diphosphate, ATP : adénosine-5'-triphosphate, GMP : guanosine-5'-monophosphate, GDP : guanosine-5'-diphosphate, GTP : guanosine-5'-triphosphate.

b. Les nucléotides-sucres

Les réactions de glycosylation s'effectuent par l'action séquentielle de glycosyltransférases spécifiques. Ces enzymes catalysent le transfert d'un monosaccharide apporté par un nucléotide-sucre (sous forme activée le plus souvent) sur un accepteur. Le galactose, le glucose, le mannose, la N-acétylglucosamine, le fucose et l'acide

N-acétylneuraminique (NeuAc) sont activés respectivement sous la forme d'UDP-Gal, d'UDP-Glc, de GDP-Man, d'UDP-GlcNAc, de GDP-Fucose et de CMP-Neu5Ac. A l'exception de l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac) lié à un nucléotide monophosphate (Kean, 1991), tous les autres monosaccharides sont liés à un nucléotide diphosphate (Tableau I.3).

Tableau I.3 : Forme activée des principaux monosaccharides utilisés dans le processus de glycosylation.

Monosaccharide	Forme activée
Glc	UDP-Glc
Gal	UDP-Gal
GlcNAc	UDP-GlcNAc
GalNAc	UDP-GalNAc
Man	GDP-Man
Fuc	GDP-Fuc
Neu5Ac	CMP-NeuAc
Neu5Gc	CMP-NeuGc

Exception faite du CMP-NeuAc (et du CMP-NeuGc), synthétisé dans le noyau puis transporté dans le cytosol (Münster *et al*., 1998), tous les nucléotides-sucres sont synthétisés dans le cytosol (Coates *et al*., 1980), alors que les réactions de glycosylation ont lieu dans les compartiments réticulaires et golgiens (Hirschberg et Snider, 1987). L'utilisation des donneurs dans la lumière de ces compartiments est permise par l'existence de deux systèmes distincts de transports (Hirschberg *et al*., 1998) :

- Dans le reticulum endoplasmique, les intermédiaires dol-P-Man et dol-P-Glc sont formés du côté cytosolique à partir de GDP-Man et d'UDP-Glc. Ces derniers sont transloqués du cytoplasme vers la lumière.
- Dans l'appareil de Golgi, les nucléotides-sucres sont pris en charge par des transporteurs spécifiques. Il existe aussi des transporteurs d'UDP-GlcNAc et d'UDP-Glc vers le reticulum endoplasmique, mais aucun transportant le GDP-Man.

- L'UDP-Glucose et l'UDP-Galactose

L'UDP-Glucose (UDP-Glc) est un donneur de groupement glucose dans les réactions de la N-glycosylation. Les voies de biosynthèse et d'utilisation de l'UDP-Glc sont représentées sur la figure I.8. La formation de l'UDP-Glc est catalysée par l'UDP-Glc pyrophosphorylase, qui utilise comme substrats l'UTP et le glucose-1-phosphate (Glc-1-P) (réaction 3). L'ATP intervient de façon indirecte pour régénérer l'UTP à partir d'UDP (réaction 5). L'UDP-Glc synthétisé est utilisé pour la synthèse du glycogène, qui se poursuit par transfert d'un résidu glucose sur une chaîne de glycogène préexistante (réaction 4). Cette réaction, catalysée par la glycogène synthase, constitue une étape de contrôle de la synthèse du glycogène.

Outre son utilisation dans la synthèse du glycogène, l'UDP-Glc intervient également dans la synthèse des acides guloniques et glucuroniques, ainsi que dans la synthèse de l'acide ascorbique (Handcock et Viola, 2002). Enfin, l'UDP-Glc peut être converti en UDP-Galactose (UDP-Gal) grâce à une UDP-Glc-4-épimérase (figure I.9, réaction 3). Il peut également être synthétisé à partir de galactose-1-phosphate (Gal-1-P) et d'UDP-Glc lors d'une réaction catalysée par une phosphoglucomutase (réaction 2). Quant à l'UDP-Galactose (UDP-Gal), il intervient dans les processus de N-glycosylation, O-glycosylation et O-mannosylation, mais également dans les voies de biosynthèse des galactolipides et des gangliosides (figure I.9).

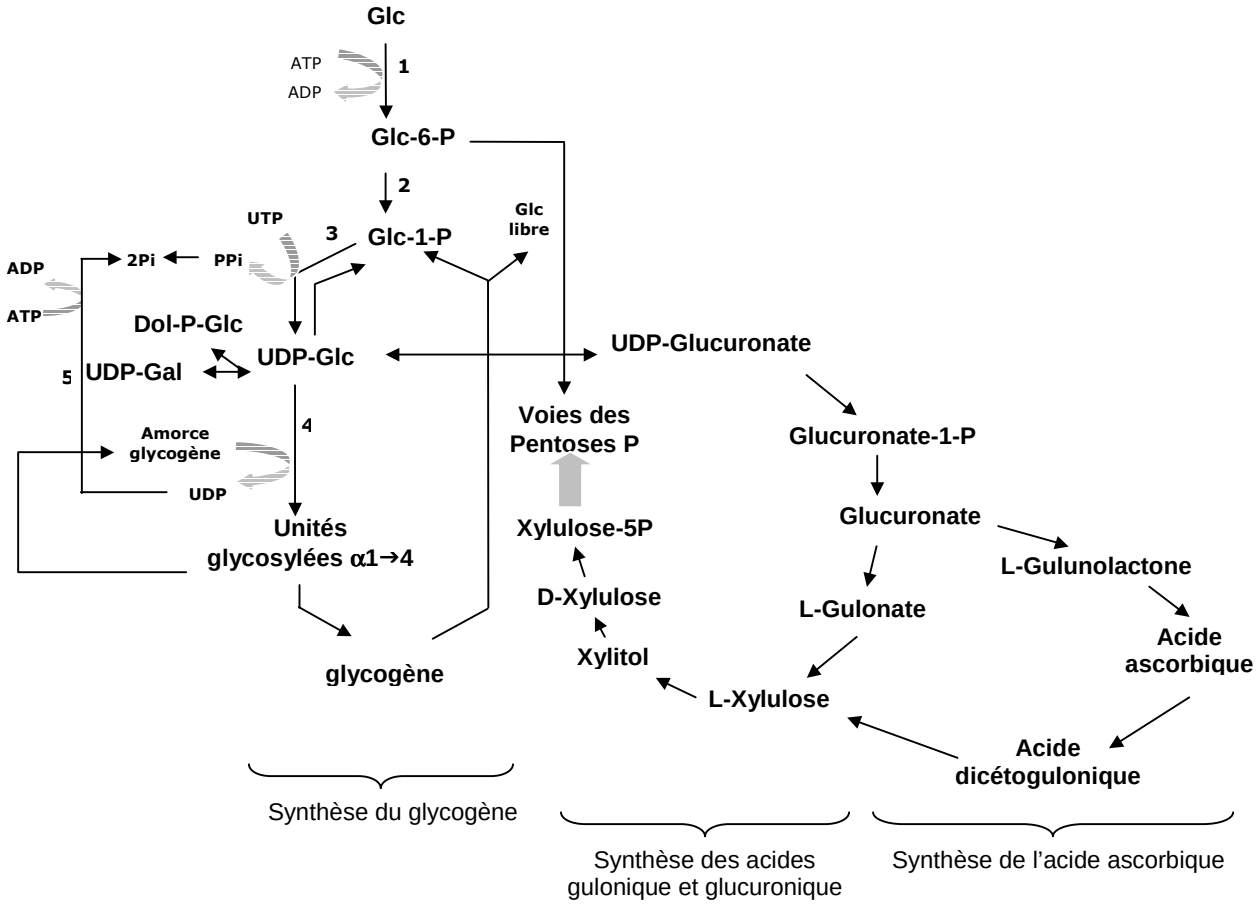


Figure I.8 : Voies de biosynthèse et d'utilisation de l'UDP-Glucose.
1 : glucokinase, 2 : phosphoglucomutase, 3 : UDP-Glc-pyrophosphorylase, 4 : glycogène synthase, 5 : nucléoside diphosphokinase. Glc : glucose, Glc-6-P : glucose-6-phosphate, Glc-1-P : glucose-1-phosphate, UDP-Glc : UDP-glucose, UDP-Gal : UDP-galactose.

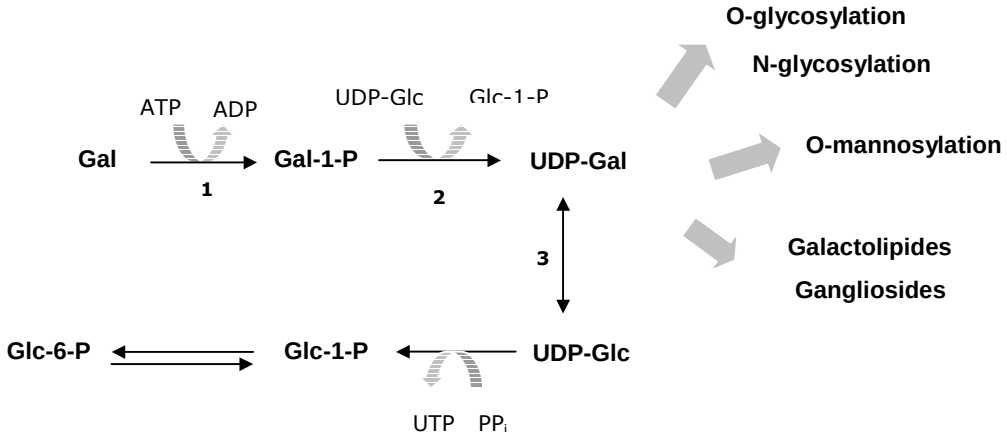


Figure I.9 : Voies de synthèse et d'utilisation de l'UDP-Galactose.
1 : galactokinase, 2 : galactose-1-P- uridyltransférase, 3 : UDP-Glc-4-épimérase. Gal-1-P : galactose-1-phosphate, UDP-Gal : UDP-galactose, UDP-Glc :UDP-glucose, Glc-6-P : glucose-6-phosphate, Glc-1-P : glucose-1-phosphate.

- L'UDP-GlcNAc et l'UDP-GalNAc

L'UDP-N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) intervient comme donneur de groupement GlcNAc dans les deux premières réactions de la N-glycosylation. Une des premières étapes de la voie de synthèse de l'UDP-GlcNAc consiste en une réaction d'amination du fructose-6-phosphate (Fru-6-P) en glucosamine-6-phosphate (GlcN-6-P), qui utilise la glutamine comme donneuse de groupement amine (figure I.10). Cette réaction est catalysée par la glucosamine-6-phosphate synthase (GPS) (réaction 3). Une deuxième enzyme a été mise en évidence, la glucosamine-6-P isomérase (GPI), qui catalyse la réaction d'amination réversible du Fru-6-P en GlcN-6-P (Cayli *et al*., 1998); dans ce cas, le groupement amine est apporté par les ions ammonium et non la glutamine (réaction 4). Ces deux enzymes sont considérées comme essentielles à la régulation de la synthèse du pool d'UDP-GlcNAc. La synthèse d'UDP-GlcNAc est régulée de la façon suivante : dans les cellules, la GlcN-6-P est produite à partir de Fru-6-P et de glutamine, cette réaction est catalysée par la GPS. La GPI joue un rôle de régulateur, qui empêche l'accumulation de GlcN-6-P. Bien que la GPI catalyse la réaction dans les deux sens, elle fonctionne préférentiellement dans le sens de la dégradation de la GlcN-6-P en Fru-6-P et ions ammonium. Mais lorsque la concentration en ions ammonium augmente, la réaction catalysée par la GPI est significativement orientée vers la formation de GlcN-6-P (Valley *et al*. 1999). Ainsi, les deux enzymes synthétisent la GlcN-6-P, conduisant à l'augmentation du pool d'UDP-GlcNAc+UDP-GalNAc. L'UDP-GlcNAc synthétisé peut être converti par une épimérase en UDP-N-acétylgalactosamine (UDP-GalNAc) (figure I.10, réaction 22).

Outre sa mobilisation pour les réactions de N-glycosylation, l'UDP-GlcNAc est également utilisé dans les voies de biosynthèse des acides sialiques CMP-NeuAc et CMP-NeuGc (Schauer, 2001) (réactions 6 à 16). Quant à l'UDP-GalNAc, il est un substrat des réactions de O-mannosylation des protéines, qui consistent en la fixation d'un résidu mannose lié en α1,2 à un résidu Ser/Thr de la protéine (Endo, 2004). Par ailleurs, l'UDP-GalNAc intervient dans les réactions de O-glycosylation.

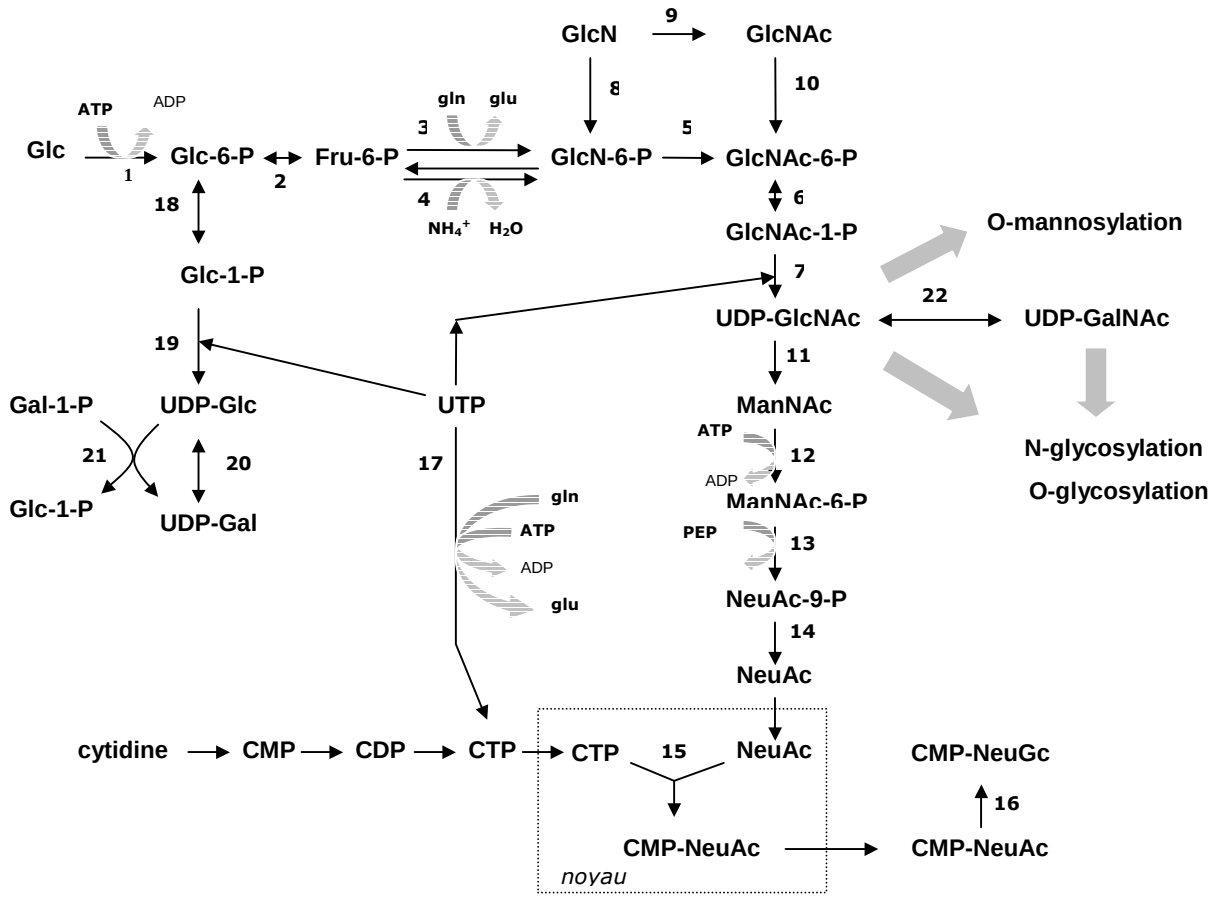


Figure I.10 : Voies de biosynthèse et d'utilisation de l'UDP-GlcNAc, l'UDP-GalNAc et le CMP-NeuAc.
1 : glucokinase, 2 : phosphoglucose isomérase, 3 : GlcN-6-P synthase, 4 : GlcN-6-P isomérase, 5 : GlcN6P N-acétyltransférase, 6 : GlcNAc-6-P mutase, 7 : UDP-GlcNAc pyrophosphorylase, 8 : hexokinase, 9 : GlcN N-acétyltransférase, 10 : GlcNAc kinase, 11 : UDP-GlcNAc-2-épimérase, 12 :ManNAc kinase, 13 : NeuAc-9-P synthase, 14 : NeuAc phosphatase, 15 : CMP-NeuAc synthétase, 16 : CMP-NeuAc-4-hydroxylase, 17 : CTP synthétase, 18 : phosphoglucomutase, 19 : UDP-Glc pyrophosphorylase, 20 : UDP-Gal-4-épimérase, 21 :Gal-1-P uridyltransférase, 22 : UDP-GalNAc épimérase.

- Le GDP-Mannose et le GDP-Fucose

Le GDP-Mannose (GDP-Man) est un donneur de groupements mannose pour les réactions de la N-glycosylation. Il peut être synthétisé à partir du glucose (figure I.11, réaction 1 à 3) ou à partir du mannose (réaction 7). Il est converti en dol-P-Mannose (dol-P-Man) grâce à une dol-P-Man synthase. Le dol-P-Man joue un rôle majeur dans diverses voies de biosynthèse : les ancres glycosyl-phosphatidylinositol (GPI), qui sont le résultat de l'association d'une protéine, d'un oligosaccharide et d'un lipide, le phosphatidylinositol

(Ferguson, 1999), la O-mannosylation, (Endo, 2004) et la C-mannosylation, qui consiste en la fixation d'une structure glycannique, par l'intermédiaire d'un résidu mannose, sur le carbone d'un résidu Trp de la protéine (Doucey *et al*., 1998). Enfin, le GDP-Man est un précurseur de la synthèse du GDP-Fucose (GDP-Fuc) (Becker et Lowe, 2003) (réactions 8 à 10). Le GDP-Fuc peut également être synthétisé *de novo* à partir de fucose, mais la GDP-Fuc pyrophosphorylase (réaction 12) ne contribue qu'à environ 10% de la synthèse du pool de GDP-Fuc (Yurchenco et Atkinson, 1977).

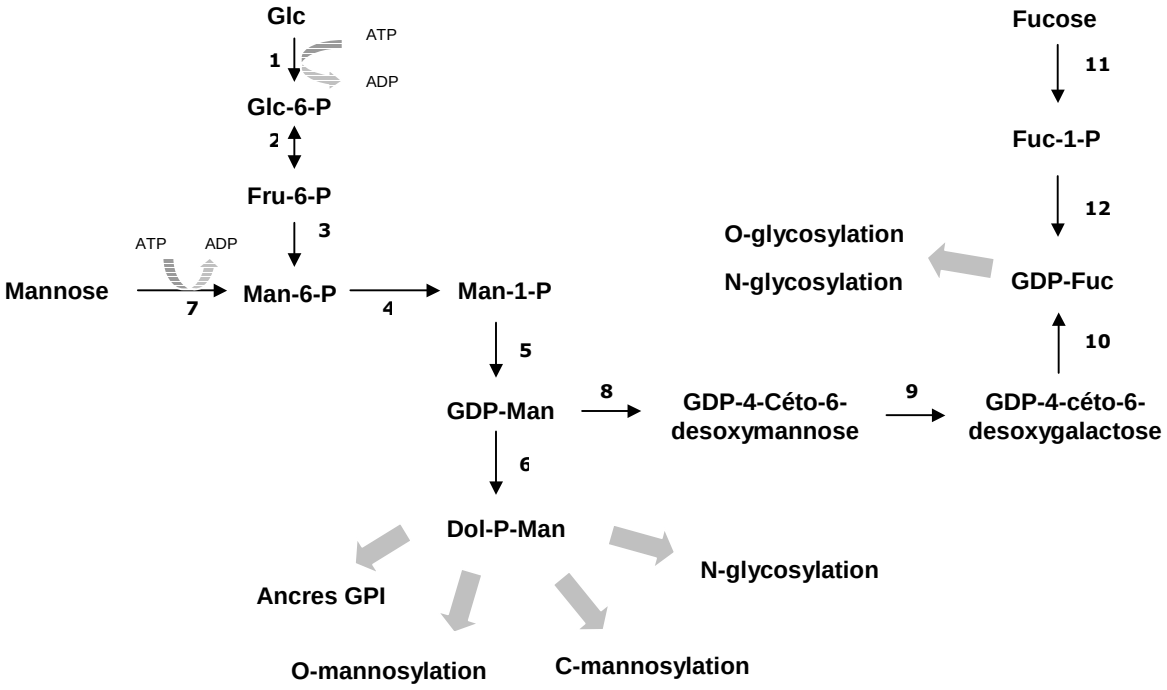


Figure I.11 : Voies de biosynthèse et d'utilisation du GDP-Mannose et du GDP-Fucose.
1 : glucokinase, 2 : phosphoglucose isomérase, 3 : phosphomannose isomérase, 4 : phosphomannomutase, 6 : dol-P-Man synthase, 7 : mannose kinase, 8 : GDP-mannose deshydratase, 9 : GDP-desoxymannose épimérase, 10 : GDP-desoxygalactose épimérase, 11 : fucose kinase, 12 : GDP-Fucose pyrophosphorylase.

3.1.2 Biosynthèse du précurseur oligosaccharidique dans le reticulum endoplasmique

Le processus de N-glycosylation se déroule dans deux compartiments cellulaires différents : d'une part, dans le reticulum endoplasmique rugueux où s'effectue le pré-

assemblage, sur un intermédiaire lipidique, le dolichol-P (dol-P), d'un complexe oligosaccharidique unique qui sera ensuite transféré en bloc sur un résidu Asn de la protéine naissante (évènement co-traductionnel); d'autre part, dans l'appareil de Golgi où le glycanne subira les modifications de maturation. La synthèse d'une N-glycosylprotéine requiert l'élaboration préalable d'un glycanne constitué de quatorze monosaccharides sur un lipide de type polyisoprénique intégré dans la membrane du RER, le dol-P. L'assemblage de l'oligosaccharide s'effectue de manière séquentielle par l'intermédiaire d'un cycle métabolique bien particulier appelé le cycle des dolichols (Kornfeld et Kornfeld, 1985) (figure I.12).

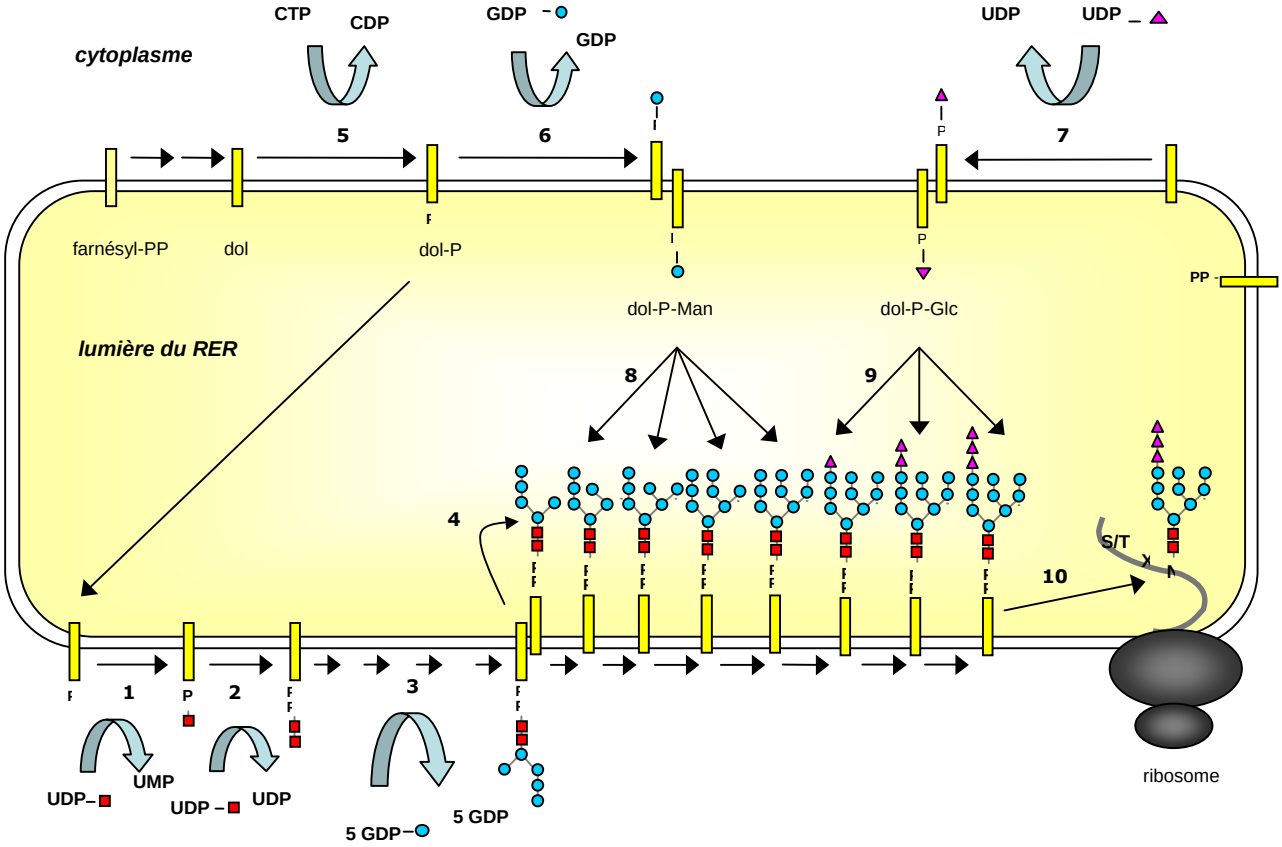


Figure I.12 : Cycle des dolichols dans le reticulum endoplasmique rugueux (d'après Kornfeld et Kornfeld, 1985). 1: GlcNAc-P-transférase; 2: GlcNAc-transférase; 3 : mannosyltransférases, 4 : flippase, 5 : dolichol kinase, 6 : dol-P-Man synthase, 7: dol-P-Glc synthase, 8 : mannosyltransférases, 9 : glucosyltransférases, 10 : oligosaccharyltransférase, UDP-GlcNAc (■), mannose (●), glucose (▲), dolichol ( ).

3.1.2.1 Face cytosolique

Les premières étapes de la synthèse du précurseur oligosaccharidique débutent dans le cytoplasme (figure I.12). Elles correspondent au transfert successif de deux résidus GlcNAc à partir d'UDP-GlcNAc sur le dol-P. La biosynthèse se poursuit par l'addition de cinq résidus mannose apportés par le GDP-Man, sur l'accepteur lipidique, pour donner le Man_5-$GlcNAc_2$-PP-Dol. Un mécanisme de flip-flop, catalysé par une flippase, permet la translocation du Man_5-$GlcNAc_2$-PP-Dol du cytoplasmique vers la lumière du RER (Helenius *et al*., 2002).

3.1.2.2 Face luminale

L'élongation se poursuit dans la face luminale du RER (figure I.12). Elle est rendue possible grâce au Man-P-Dol généré par la Man-P-Dol synthase, qui effectue la synthèse, du côté cytosolique, et catalyse le transport du Man-P-Dol à travers la membrane. Quatre résidus mannose sont apportés de cette façon sur l'intermédiaire lipidique. Un mécanisme similaire permet le transfert de trois résidus glucose à partir de Glc-P-Dol, terminant ainsi la synthèse du précurseur glycannique, dont la structure finale est $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol.

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

Le tétradécasaccharide peut alors être transféré sur une protéine en voie de synthèse; cette réaction est catalysée par un enzyme spécifique, l'oligosaccharyltransférase (OST). Cette étape s'effectue par l'intermédiaire de l'oligosaccharyltransférase, catalysant la formation d'une liaison β 1-N glycosidique entre le résidu GlcNAc en position terminale réductrice du $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol et le résidu Asn (Pless and Lennarz, 1977).

a. L'oligosaccharyltransférase : un complexe multimérique

L'OST est présente sous forme d'un complexe multi-protéique, ancré dans la membrane du RER. Ce complexe est constitué de huit sous-unités : la protéine OST48 (homologue de WBP1 chez la levure), les ribophorines I (OST 1) et II (SWP1), et la protéine

de 40 kDa DAD1 (OST 2). Récemment, Kelleher *et al*. (2003) ont également caractérisé les protéines STT3-A et SST3-B (STT3), la sous-unité N33, la protéine IAP (*implantation-associated protein*) (OST3 et OST6), ainsi que la sous-unité OST4 (OST4).

La sous-unité OST48 semble être responsable de la reconnaissance du précurseur glycannique et catalyse son transfert sur la protéine naissante (Silberstein *et al*., 1992 ; Breuer et Bause, 1995). La sous-unité DAD1 est à la fois impliquée dans le mécanisme de mort cellulaire programmée (apoptose) et le processus de N-glycosylation (Kelleher and Gilmore, 1997). Le site de fixation du précurseur lipidique serait porté par la ribophorine I (Kelleher *et al*., 1992). Quant à la sous-unité STT3, elle serait également impliquée dans le mécanisme de transfert des glycannes (Kelleher *et al*., 2003).

b. Spécificité de reconnaissance vis-à-vis du peptide accepteur

Le tripeptide accepteur, appelé séquon, est constitué d'Asn-X-Thr/Ser où X est un acide aminé quelconque à l'exception de la proline. Tous les séquons ne sont pas glycosylés, leur présence est une condition nécessaire mais pas suffisante. Petrescu (2004) estime que 50 à 60% des séquons sont occupés par une structure glycannique. En effet, la présence d'un résidu Thr en position +2 de la séquence consensus représente un bien meilleur substrat de l'OST que lorsque ce résidu est une sérine (Gavel et von Heijne, 1990). Le groupement β-CH_3 de la thréonine constitue un site de liaison à l'OST. De plus, il semble que la configuration R de l'atome de carbone du groupement β-CH_3 soit essentielle pour l'interaction avec le site actif de l'enzyme (Breuer *et al*., 2001). Enfin, l'accessibilité variable de la séquence consensus au site catalytique ou la compétition entre les processus de glycosylation et de mise en conformation des protéines vont également influencer la réaction de transfert des structures oligosaccharidiques (Holst *et al*., 1996).

c. Spécificité de reconnaissance vis-à-vis du donneur lipidique

La nature du donneur lipide-sucre représente un élément important traduisant l'efficacité de transfert de l'OST. En effet, des études effectuées sur différentes lignées cellulaires ont montré que les résidus mannose liés en α1,6 sur l'oligosaccharide-lipide ne sont pas indispensables pour assurer le transfert de l'oligosaccharide sur la protéine naissante (Spiro *et al*., 1979; Gersham et Robbins, 1981). Ainsi, des cellules CHO mutantes ne

possédant pas de dol-P-Man synthase, la lignée mutante B3F7, sont tout à fait capables de transférer une structure de type $Glc_3Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol sur les protéines (Stoll, 1986). Néanmoins, il semble que l'OST transfère préférentiellement le précurseur sous sa forme $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol (Karaoglu *et al*., 2001). De plus, la présence des trois résidus glucose paraît avoir une importance capitale pour le transfert, puisque seuls 10% des précurseurs oligosaccharidiques non glucosylés sont transférés sur les protéines (Karaoglou *et al*., 2001; Spiro *et al*., 1979).

3.1.2.4 Régulation du cycle des dolichols

Tous les résidus Asn ne sont pas glycosylés, cet acide aminé devant être situé dans une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr. Toutefois, la présence de cette seule séquence consensus ne suffit pas. A cela s'ajoute vraisemblablement le repliement correct de la protéine, qui autorise l'accessibilité des enzymes de la glycosylation. Un autre point déterminant est l'équipement enzymatique propre de la cellule et surtout l'expression coordonnée des glycosyltransférases. Cette expression contrôlée résulte de la localisation subcellulaire précise de ces enzymes, et dépend aussi de la vitesse à laquelle la glycoprotéine traverse les divers ateliers de la glycosylation, que sont le RER et les saccules de l'appareil de Golgi.

a. Régulation par le taux de précurseurs

Une des réactions clés dans la biosynthèse du précurseur glycannique mature est l'inititiation du cycle des dolichols, qui débute par le transfert de GlcNAc-1-P sur le dol-P. Cette réaction est catalysée par une enzyme particulière, l'UDP-GlcNAc : dol-P N-acétylglucosamine 1-phosphate transférase (G1PT). Plusieurs études ont montré que la synthèse d'oligosaccharides liés à un lipide, dépendait fortement du taux de dol-P. En effet, la disponibilité en dol-P pour les enzymes du cycle des dolichols, telles la dol-P-Man synthase, la Glc-P-dol synthase et la G1PT, dépend non seulement de sa synthèse, mais également de sa régénération par action d'une pyrophosphatase sur le dol-P-P lors de la dernière étape du cycle des dolichols. A l'état stationnaire, la majorité du pool de dol-P disponible pour la synthèse d'oligosaccharides est sous forme de $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol. En effet, Gao et Lehrman (2002) ont estimé que la concentration en dol-P libre était vingt fois supérieure à celle de $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol lorsque la synthèse protéique est inhibée. Ainsi, ces

auteurs suggèrent qu'en absence de synthèse protéique, l'initiation du cycle par la G1PT est inhibée par le manque de dol-P disponible.

b. Régulation par les enzymes

Une enzyme clé du cycle des dolichols est la G1PT, impliquée dans la première réaction de la voie de synthèse du précurseur glycannique. Cette réaction peut être régulée par des effecteurs hormonaux, des facteurs génétiques et la localisation des enzymes et des substrats. La G1PT est également activée de façon allostérique par le dol-P-Man et est inhibée par le GlcNAc-PP-dol et le $GlcNAc_2$-PP-dol. Deux autres enzymes du cycle sont également sujettes à la régulation, la dol-P-Man synthase et la dol-P-Glc synthase. Elles sont chacune activées par le produit de l'autre. De plus, le GlcNAc-PP-dol active la dol-P-Man synthase (Kean *et al*., 1999).

c. Régulation par le taux d'accepteur protéique

Des travaux ont essayé de mettre en évidence un ajustement du fonctionnement du cycle des dolichols par rapport à la synthèse protéique. Elbein *et al*. (1990) suggèrent une rétroinhibition directe de la G1PT par le donneur oligosaccharidique non transféré. Pour Hubbard et Robbins (1980), un non transfert du précurseur oligosacharidique empêche la régénération du dol-P, ce qui aboutit à l'arrêt de l'initiation du cycle des dolichols.

d. Régulation par le transfert sur l'eau

Il est maintenant bien établi que le processus de N-glycosylation s'accompagne de la libération d'oligosaccharides solubles ($OSGn_1$ et $OSGn_2$) de type oligomannosidique dans la lumière du RE (Cacan et Verbert, 1999). Des études *in vitro* ont permis d'établir que cette libération d'oligosaccharides solubles était fortement diminuée en présence d'un excès d'accepteur protéique exogène, suggérant ainsi que l'OST était capable à la fois de catalyser le transfert du précurseur oligosaccharidique sur une chaîne polypeptidique et sur une molécule d'eau (Spiro et Spiro, 1991) (figure I.13). En effet, la libération des $OSGn_2$ augmente proportionnellement à la diminution du taux d'accepteur protéique observée en présence d'inhibiteur de synthèse protéique comme la cycloheximide ou par l'utilisation de

cellules perméabilisées (Villers *et al*., 1994; Kmiécik *et al*., 1995). La fonction de cette double activité n'est pas déterminée à l'heure actuelle, mais on peut supposer que la formation d'oligosaccharides libres est susceptible de jouer un rôle dans la régulation du cycle des dolichols, en permettant un ajustement du transfert des précurseurs oligosaccharidiques sur les protéines en fonction des besoins cellulaires, en particulier si les précurseurs oligosaccharidiques sont présents en excès.

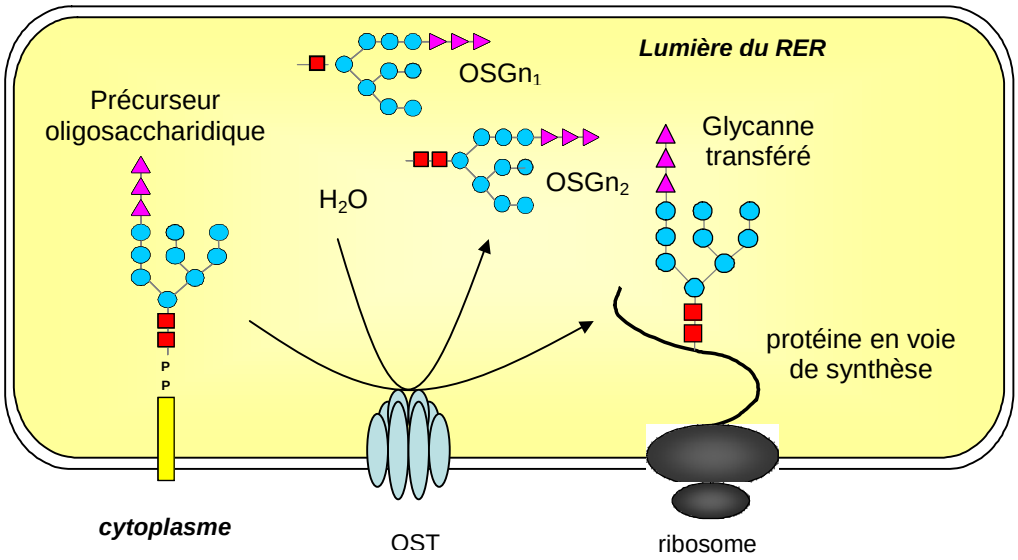


Figure I.13: Double activité de l'oligosaccharyltransférase : transfert du précurseur oligosaccharidique sur une protéine en voie de synthèse et transfert sur une molécule d'eau.

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

3.2.1 La maturation réticulaire

La maturation des N-glycosylprotéines s'effectue en partie dans le RER par l'élimination de trois résidus glucose et un résidu mannose (Trombetta, 2003) (figure I.14). Des marquages métaboliques ont montré que le premier résidu glucose était éliminé très rapidement (moins de deux minutes), contrairement à l'élimination des deux autres résidus glucose qui se fait plus lentement (Hubbard et Robbins, 1979). Le dernier résidu glucose transféré sur le précurseur glycannique est très rapidement retiré par l'α-glucosidase I (Daniel *et al*., 1994). La glucosidase II peut alors retirer les deux derniers résidus glucose liés en α1,3 (Roth *et al*. 2003). Enfin, c'est la mannosidase I du RER qui élimine un résidu mannose lié en α1,2 (Moremen *et al*., 1994). Son action donne naissance au glycanne de structure

$Man_8GlcNAc_2$. Les glycoprotéines déglucosylées et partiellement démannosylées peuvent alors s'engager dans l'appareil de Golgi ou s'effectue la deuxième partie du processus de maturation des glycannes.

3.2.1 La maturation golgienne

Les différentes étapes de la maturation golgienne sont présentées sur la figure I.14. Le processus de maturation des glycannes débute dans le compartiment cis-Golgi où les derniers résidus mannose liés en α1,2 sont éliminés par l'action de la mannosidase I golgienne pour donner le $Man_5GlcNAc_2$ (Cabral *et al*., 2001). Les glycoprotéines destinées à être de type de complexe ou hybride s'engagent dans le median-Golgi où la N-acétylglucosaminyltransférase I branche un résidu GlcNAc en β1,2 sur le résidu mannose α1,3 du noyau. La mannosidase II golgienne qui reconnaît spécifiquement cette structure, retire les résidus mannose de la branche α1,6 : son action déterminera la présence de glycannes de type complexe; dans l'alternative, ils demeureront de type hybride (Cabral *et al*., 2001). Le glycanne est finalement remanié par diverses glycosyltransférases : ce sont les N-acétylglucosaminyl-, galactosyl-, fucosyl-, et sialyltransférases dont l'action permet d'expliquer la diversité des structures glycanniques rencontrées sur les N-glycosylprotéines (Stanley *et al*., 1996; Kornfeld et Kornfeld, 1985).

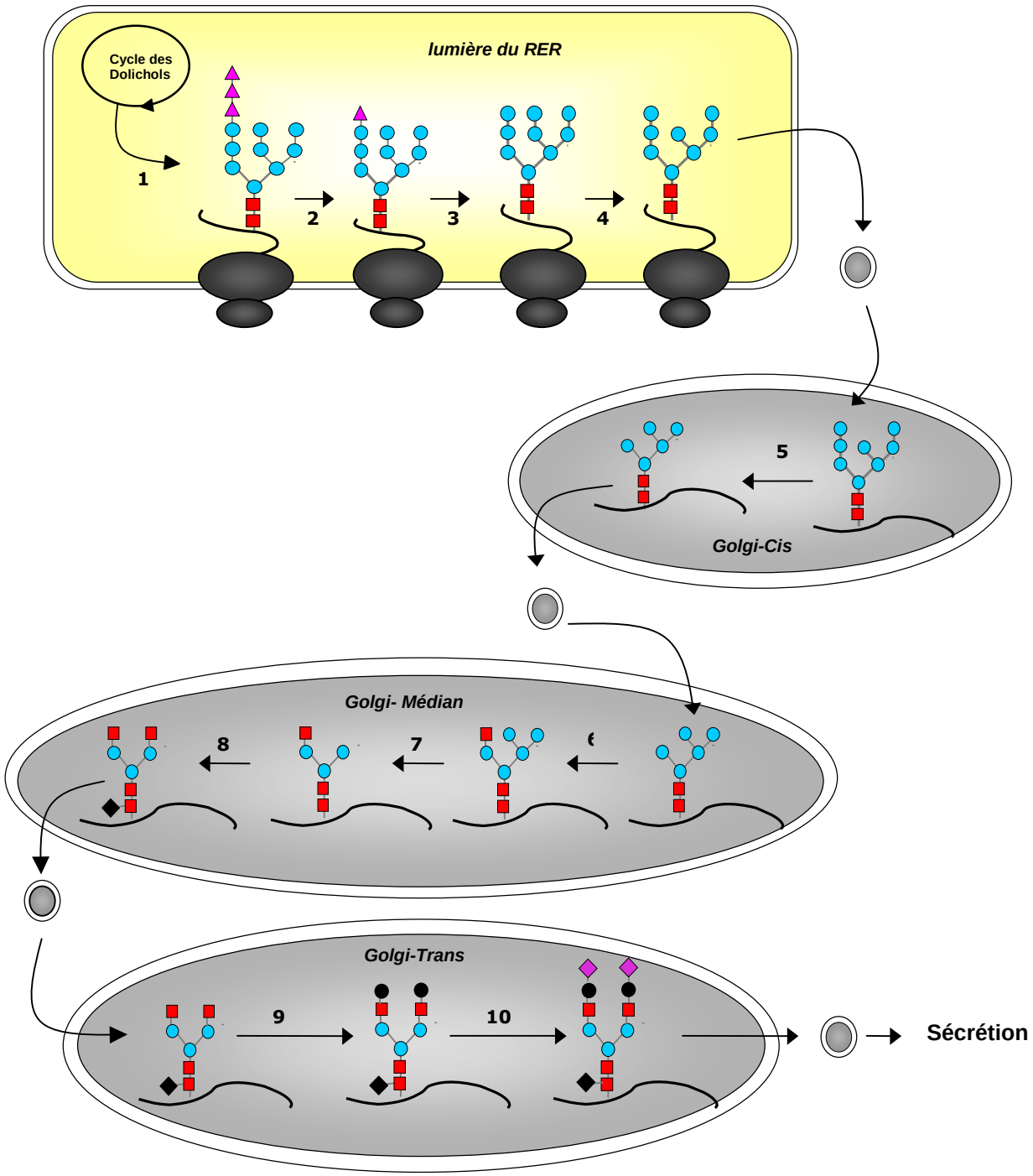


Figure I.14 : Processus de maturation des N-glycannes dans le RER et l'appareil de Golgi (d'après Kornfeld et Kornfeld, 1985).
1 : α-glucosidase I, 2: glucosidase II, 3: α1,2 mannosidase, 4: mannosidase I golgienne, 5: GlcNAc-transférase, 6: mannosidase II golgienne, 7: GlcNAc-transférase II, 8 : fucosyltransférase, 9 : galactosyltransférase, 10 : sialyltransférase, GlcNAc (■), mannose (○), galactose (●), acide sialique (◆), fucose (◆).

3.3 Le contrôle qualité des N-glycosylprotéines

L'idée qu'il existe dans les cellules un contrôle qualité des protéines est un concept assez récent. L'étape de contrôle qualité de la synthèse protéique, effectuée par des protéines « chaperonnes », est déterminante. En effet, de nombreuses maladies sont dues à l'accumulation de protéines mal conformées.

3.3.1 La mise en conformation dans le RE

La synthèse et la maturation des protéines s'effectuent dans la lumière du reticulum endoplasmique (RE). Le RE constitue un environnement cellulaire protégé pour les protéines: les conditions oxydantes et la forte concentration en ions Ca^{2+} facilitent la mise en conformation et l'oligomérisation des protéines synthétisées dans ce compartiment (Zapun *et al*., 1999). Outre ces conditions spécifiques, cet organite est pourvu de nombreuses protéines chaperonnes et d'enzymes, dont le rôle est d'assurer le repliement des protéines néosynthétisées (Ma et Hendershot, 2004). Plusieurs familles de protéines sont impliquées dans le processus de mise en conformation des protéines et des glycoprotéines. Ceci comprend des enzymes catalysant la formation des ponts disulfures, comme la Protéine Disulfure-Isomérase (PDI), des protéines chaperonnes comme les *glucose-regulated proteins* (GRP78 aussi appelée BiP, GRP94, GRP170) et des molécules chaperonnes *lectin-like* comme la calnexine (CNX) et la calréticuline (CRT).

3.3.2 Rôle des glycannes dans le contrôle qualité

Dans les cellules animales, la synthèse de protéines fonctionnelles requiert, à la fois l'intervention de la machinerie de transcription, de traduction, ainsi que celle de mise en conformation. Afin de surveiller la fidélité de ces mécanismes et d'empêcher la dispersion de protéines mal conformées non fonctionnelles, les cellules ont dévelopé un système de contrôle qualité qui vérifie l'intégrité des protéines nouvellement synthétisées. Les glycannes jouent un rôle essentiel dans le contrôle qualité (Lehrman, 2001). En effet, le système de contrôle qualité utilise les structures glycanniques portés par les protéines afin de les diriger vers le système de mise en conformation ou de dégradation. Lorsqu'elles sont correctement repliées, les protéines seront orientées vers la sécrétion

3.3.3 Mécanismes mis en œuvre lors du contrôle qualité

De nombreuses études ont démontré l'existence d'un contrôle post-traductionnel, appelé « contrôle qualité », dont l'efficacité permet de vérifier la qualité des protéines nouvellement synthétisées (Ellgaard et Helenius, 2001, 2003; Chevet *et al*., 2001).

Le contrôle qualité est assuré notamment par deux enzymes solubles, l'UDP-Glc: glycoprotéine glycosyltransférase (UGGT) et la glucosidase II (Hammond et Helenius, 1995) (figure I.15). L'UGGT reconnaît certains motifs hydrophobes sur les protéines mal conformées, et ajoute alors un résidu glucose sur la structure oligomannosidique de la protéine (Sousa *et al*., 1992). Ceci constitue un signal permettant l'interaction avec les protéines chaperonnes CNX et CRT (Schrag *et al*., 2003). Ce complexe est reconnu par une autre protéine impliquée dans le repliement, ERp57, une protéine *PDI-like* (Frickel *et al*., 2002). L'association des lectines à leur substrat facilite le repliement des chaînes peptidiques. Ce changement de conformation induit la dissociation des complexes lectines-glycoprotéines et donne ainsi la possibilité à la glucosidase II de retirer le dernier résidu glucose. Deux voies peuvent alors être empruntées par la protéine en fonction de son état conformationnel:

- si elle ne possède pas sa conformation finale, l'UGGT reglucosyle la protéine qui peut alors s'engager dans un nouveau cycle « déglucosylation-reglucosylation » jusqu'à l'obtention de sa forme native.
- si elle est correctement conformée, elle devient inaccessible à l'UGGT et peut s'engager vers sa destinée finale. Les glycoprotéines correctement repliées sont transportées du RER vers l'appareil de Golgi *via* deux systèmes de transports : les vésicules *coat protein complex* de type II (COP II) (Allan et Balch, 1999) et une protéine membranaire de type lectine ERGIC-53, appartenant au *ER-Golgi intermediate compartment* (ERGIC) (Nufer *et al*., 2003; Hauri *et al*., 2000).

Enfin, si la protéine ne réussit pas à acquérir une conformation correcte, elle est dirigée vers une voie de dégradation appelée *ER-associated degradation* (ERAD). Elle subit un processus de rétro-translocation de la lumière du RE vers le cytoplasme afin d'être dégradée par la machinerie cytosolique du protéasome 26S (Hampton, 2002; Bonifacino et Weissman, 1998; Hiller *et al*., 1996).

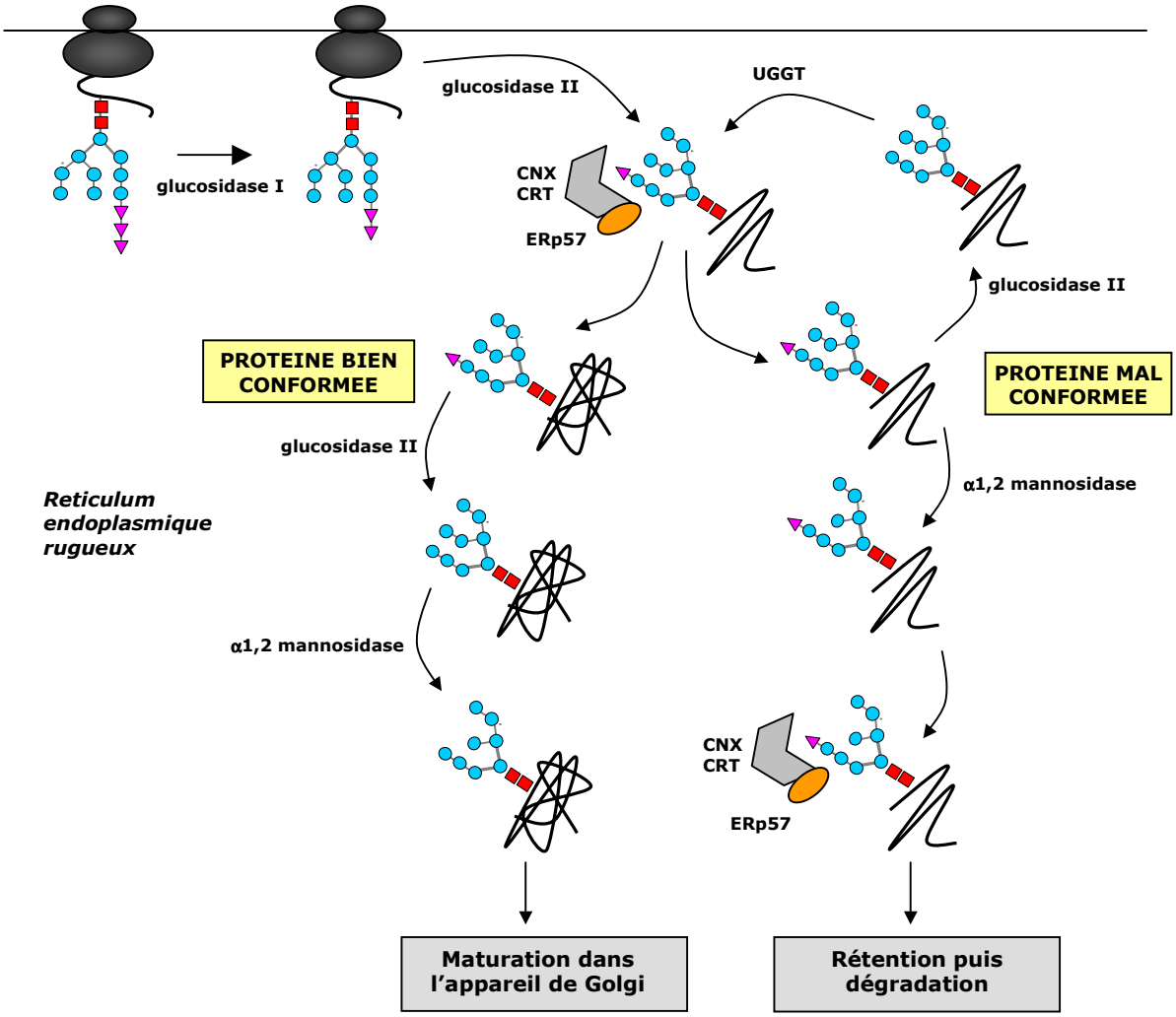


Figure I.15 : Les premières étapes du contrôle qualité des glycoprotéines dans le reticulum endoplasmique rugueux. CNX : calnexine, CRT : calréticuline, UGGT : UDP-Glucose glycoprotéine glycosyltransférase.

Le mécanisme de contrôle qualité, dont la compréhension est récente, assure que seules les glycoprotéines correctement conformées, et par conséquent biologiquement actives, sont dirigées vers leur site d'action. On estime qu'environ un tiers des protéines nouvellement synthétisées subit le processus de dégradation (Schubert *et al*., 2000).

3.4 L'UPR dans les cellules de mammifères

3.4.1 Les voies de signalisation et de transduction du signal

En dépit de l'existence du contrôle qualité, il peut se produire un déséquilibre entre le taux de synthèse protéique et les capacités de mise en conformation des cellules, engendrant l'apparition de protéines mal conformées qui vont s'accumuler dans le RE. Ces conditions de « stress du RE» sont susceptibles de conduire au déclenchement d'une réponse cellulaire spécifique nommée *Unfolded Protein Response* (UPR) (Schröder et Kaufman, 2005; Rutkowski et Kaufman, 2004). Ce système permet, *via* des voies de transduction du signal, une communication entre le RE et le noyau cellulaire, nécessaire afin de moduler l'expression protéique en cas de stress. Bien caractérisés chez les levures, les mécanismes précis de l'UPR sont moins clairement établis dans les cellules de mammifères, de par la diversité des voies de signalisation mises en jeu.

L'UPR va principalement déclencher trois mécanismes : (i) l'activation de la transcription des gènes codant les protéines impliquées dans le repliement permettant d'augmenter les capacités de conformation des cellules, (ii) l'inhibition de la synthèse protéique de façon à réduire la quantité de protéines présentes dans le RE, (iii) l'apoptose, activée si les deux premiers mécanismes n'ont pas réussi à contrer l'accumulation de protéines incorrectement repliées (Harding *et al*., 2002; Ron, 2002). L'interaction prolongée des protéines du repliement avec la machinerie des protéines chaperonnes active trois protéines transmembranaires résidentes du RE : le facteur de transcription ATF6 (*activating transcription factor* 6), les protéines IRE1 (*inositol requiring kinase* 1) et les protéines PERK (*protein-like endoplasmic reticulum kinase*) (Schröder et Kaufman, 2005). Le calcium relargué par le RE peut également activer l'apoptose. Les voies de transduction majeures impliquées dans le processus d'UPR sont les suivantes (figure I.16):

- Activation des protéines IRE1α et IRE1β : lorsque le taux de protéines mal conformées augmente, on observe une dimérisation des protéines transmembranaires IRE1α et IRE1β. Cette dimérisation leur confère alors une activité endoribonucléasique et kinasique. Il est postulé que, tout comme chez la levure, la région cytoplasmique de ces deux protéines clive l'ARNm précurseur du facteur de transcription XBP1 (*X-box binding protein* 1) (Calfon *et al*., 2002). Cet épissage induit un changement du cadre de lecture dans la partie C-terminale

de la protéine, qui se lie ensuite à des séquences ERSE (*Endoplasmic Reticulum Stress Element*) de promoteurs cibles des gènes de l'UPR et induit leur expression.

- Activation des facteurs de transcription ATF6α et ATF6β : suite à un stress du RE, les deux formes transmembranaires, résidentes du RE, du facteur de transcription ATF6 sont clivées par une sérine protéase et une métalloprotéase pour générer deux domaines cytoplasmiques de 50 et 60 kDa respectivement, capables de migrer vers le noyau cellulaire. En présence des facteurs de transcription CBF (CCAAT-*binding factor*), NF-Y (*nuclear factor* Y) et XBP1, les formes activées solubles ATF6α et ATFβ vont se lier aux séquences ERSE d'une région promotrice des gènes de l'UPR et induire leur transcription (Yoshida *et al*., 2001).

- Inhibition de la traduction : l'accumulation de protéines mal conformées peut conduire à une inhibition transitoire de la traduction. En effet, le stress du RE va induire la dimérisation de la protéine PERK, qui activée, va phosphoryler la sous-unité α du facteur initiateur de la traduction eIF2 (Clemens, 2001). La phosphorylation du facteur eIF2 empêche alors la formation du complexe de pré-initiation de la traduction et l'interaction de l'ARNm avec la sous-unité 40S du ribosome.

- Déclenchement de l'apoptose : les protéines IRE1α et IRE1β, activées suite à une accumulation de protéines mal conformées, activent à leur tour la voie des protéines JNK (*Jun N-terminal protein kinases*) en recrutant une protéine adaptatrice TRAF2 (Urano *et al*., 2000). En se fixant sur les protéines IRE1, TRAF2 se libère de la procaspase 12, et conduit ainsi à la séquestration et l'activation de la caspase 12 (Yoneda *et al*., 2001). Ceci provoque alors la mort cellulaire par apoptose. L'activation des protéines IRE1, ATF6 et PERK peut également conduire à l'activation transcriptionnelle de *chop*, gène codant un facteur de transcription fortement impliqué dans l'apoptose (Marciniak *et al*., 2004).

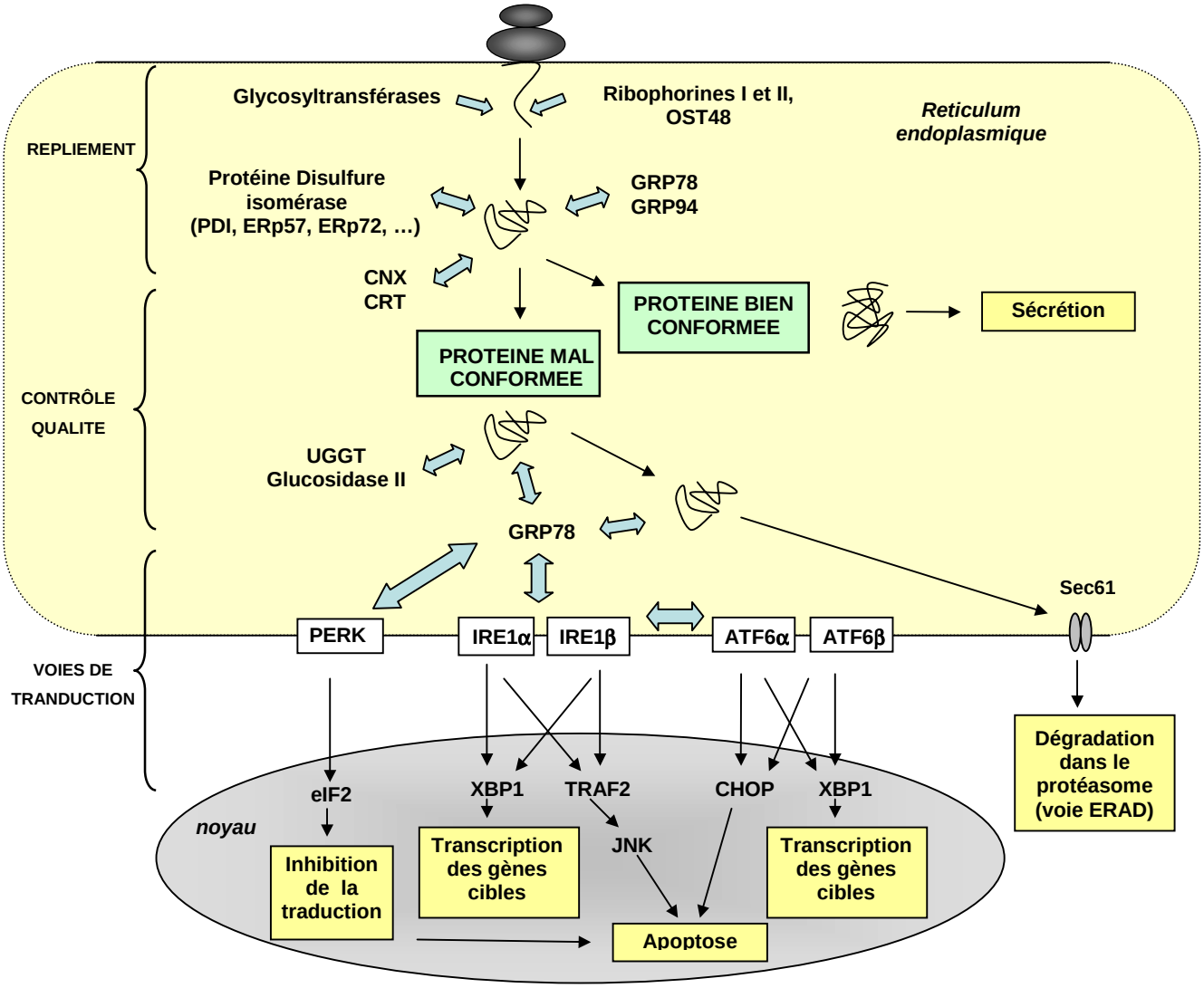


Figure I.16 : Les différentes voies de signalisation impliquées dans la mise en conformation, le contrôle qualité, le mécanisme d'UPR et la dégradation des protéines.

3.4.2 L'UPR et la glycosylation

Chez la levure, des travaux ont montré que la transcription des gènes impliqués dans le processus de glycosylation est induite lors de l'activation de l'UPR et que certains mutants de levure déficients dans les gènes de N-glycosylation présentaient une activation constitutive de l'UPR.

Dans les cellules de mammifères, ce lien entre UPR et glycosylation est plus difficile à établir du fait de la complexité de cette réponse. Les travaux de Doerrler et Lehrmann (1999) ont montré que l'activation de l'UPR était reliée à une augmentation de la quantité de

précurseur oligosaccharidique $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-dol. Foulquier *et al*. (2002) ont mis en évidence le lien existant entre la structure glycannique, le contrôle qualité et l'UPR dans les cellules animales. En effet, dans une lignée de cellules CHO mutante pour la glycosylation, l'UPR est activée constitutivement. De plus, de par cette mutation, la glycoprotéine recombinante produite, mal conformée, est soustraite au contrôle qualité. Dans ces conditions, le niveau de l'UPR est augmenté et la sécrétion de la glycoprotéine amoindrie.

Le mécanisme par lequel l'UPR est activée n'est pas clairement établi. Cette activation ne résulterait pas de l'accumulation de protéines mal conformées dans le RE, mais plutôt d'une accumulation de $Man_{(2-5)}GlcNAc_2$-PP-dol. Il semble que la glycogène phosphorylase soit rapidement activée. Lorsqu'elle est phosphorylée, cette enzyme active les réactions de la glycogénolyse, et ceci permet d'augmenter les concentrations en Glc-1-P et en Glc-6-P. Ces métabolites permettent alors la synthèse de GDP-Man, dol-P-Man et dol-P-Glc, précurseurs directement impliqués dans la synthèse des précurseurs oligosaccharidiques. Il semble que l'UPR contrôle trois aspects du métabolisme des oligosaccharides liés au dolichol : leur synthèse, leur allongement et leur transfert sur la protéine en voie de synthèse. Le rôle de l'UPR serait ainsi de préserver la qualité des donneurs oligosaccharidiques, assurant ainsi un contrôle qualité efficace des protéines.

IV. Maîtrise de la glycosylation des protéines recombinantes au cours du procédé de culture

1. Fonctions biologiques des glycannes pour les protéines

L'influence de la glycosylation sur les propriétés des protéines a fait l'objet de nombreuses études, mais ce n'est qu'au cours des années 1970 qu'a été reconnue ce que J. Montreuil (1993) dénomme « l'intelligence biologique des sucres ». Il est cependant impossible de prédire la fonction des glycannes sur une protéine donnée, car aucune règle ne peut être établie d'après les divers exemples retrouvés dans la littérature (Varki, 1993). Néanmoins, il est clairement établi que les défauts de la glycosylation sont responsables, *in vivo*, de maladies sévères regroupées sous le terme de *Congenital Disorders of Glycosylation* (CDG) (Marquardt et Denecke, 2003; Grünewald *et al*., 2002).

Les glycannes jouent en effet un rôle majeur dans les mécanismes suivants :

- maintien de la structure protéique dans une conformation biologiquement active;
- augmentation de la solubilité;
- protection de la chaîne polypeptidique vis-à-vis de la protéolyse;
- modulation de la demi-vie circulatoire;
- diminution de l'immunogénicité par le masquage d'épitopes;
- interactions dans les phénomènes cellulaires de reconnaissance et de communication;
- signaux pour les trafics inter- et intracellulaires des protéines et leur destinée.

2. Facteurs susceptibles d'influencer la glycosylation des protéines recombinantes au cours du procédé

Etant donnée l'importance de la glycosylation sur les propriétés biologiques et physico-chimiques des protéines, il est essentiel de produire des glycoprotéines recombinantes se rapprochant le plus possible des glycoprotéines humaines. Les industries pharmaceutiques et biotechnologiques ont montré un intérêt croissant pour la maîtrise de la glycosylation ces dernières années, puisque la plupart des protéines d'intérêt thérapeutique sont des glycoprotéines (tableau I.4).

Tableau I.4 : Exemples de glycoprotéines d'intérêt thérapeutique et du type de glycosylation qui leur est associée (Verbert, 1993).

Glycoprotéine	Type de glycosylation
Activateur tissulaire du plasminogène (t-PA)	N-
Erythropoïétine (EPO)	N- et O-
Interleukine-2	O-
Interférons-β	N-
Interférons-γ	N-
α1-antitrypsine	N-
Antigène CD-4 soluble	N-
Glucocérébrosidase	N-
Gonadotrophine chorionique humaine	N- et O-
Facteurs VII, VIII, IX et XIII	N- et O-
Hormone folliculostimulante	N- et O-
Facteurs stimulant les colonies granulocytaires (G-CSF)	O-
Facteurs stimulant les colonies granulocytaires et macrophagiques (GM-CSF)	N- et O-

Parmi les paramètres susceptibles d'influencer la glycosylation, on peut citer les modifications de l'environnement extracellulaire, telles les limitations nutritionnelles (glucose, glutamine…) ou l'accumulation de métabolites toxiques (ions ammonium). Les paramètres opératoires, le mode de culture et le mode d'écoulement peuvent également jouer un rôle important. Enfin, l'influence des paramètres intracellulaires, telle la disponibilité en précurseurs nucléotidiques ou lipidiques, ne doit pas être négligée.

2.1 Influence de l'environnement extracellulaire sur la glycosylation

D'un point de vue industriel, il est important de produire une glycoprotéine recombinante de qualité constante au cours d'un procédé, et ceci est d'autant plus vrai pour les protéines destinées à la thérapeutique humaine. C'est pourquoi, il est important de déterminer les facteurs potentiels pouvant influencer la glycosylation et de comprendre quels mécanismes régissent ce processus. L'environnement extracellulaire évolue au cours d'un procédé de culture de cellules animales; ainsi, de nombreux facteurs et paramètres sont susceptibles d'affecter la glycosylation des protéines (Goochee *et al*., 1991; Goochee et Monica, 1990).

2.1.1 Le sérum

De par sa composition extrêmement diversifiée, les effets bénéfiques du sérum sur la croissance cellulaire sont reconnus depuis longtemps. En revanche, il semble que la présence de sérum dans le milieu de culture puisse également influencer la glycosylation, mais de façon très variable en fonction de la cellule hôte considérée et de la protéine recombinante produite par cet hôte. Megaw et Johnson (1979) et Gawlitzek *et al*. (1995a) affirment que des cultures effectuées en milieu avec sérum sont susceptibles d'influencer les réactions de glycosylation. En effet, la présence de sérum semblait diminuer la sialylation des glycannes associés à un anticorps monoclonal produit par des hybridomes (Patel *et al*., 1992), réduire le niveau de sialylation, de galactosylation et de fucosylation de l'IL-2 et modifier le ratio glycannes bi-antennés/tri-antennés (Gawlitzek *et al*., 1995a). Pour Teige *et al*. (1994), la culture en milieu sans sérum réduit le niveau global de la glycosylation des glycoprotéines. En effet, une forte proportion d'antithrombine III non glycosylée a été produite par des cellules BHK en milieu sans sérum. Le suivi de la glycosylation de l'EPO au cours de

cultures discontinues de cellules CHO en présence de sérum a permis de mettre en évidence une désialylation progressive de la protéine (Le Floch, 2003). La sialylation s'est avérée être diminuée et la microhétérogénéité glycannique en présence de sérum accrue (Lamotte, 1997; Castro *et al*., 1995). A l'inverse, la macrohétérogénéité de l'IFN-γ produit par des cellules CHO est identique, qu'elles aient été cultivées en présence ou en absence de sérum (Lamotte, 1997). Enfin, d'autres auteurs n'ont pas observé d'effet de la présence de sérum dans le milieu de culture sur la glycosylation d'un anticorps monoclonal (Moellering *et al*., 1990).

2.1.2 Les glucides

Le glucose constitue la source de carbone essentielle au métabolisme cellulaire et de nombreux travaux ont étudié l'influence d'une limitation en glucose sur la glycosylation. La limitation en glucose peut induire une diminution de l'efficacité de la glycosylation. Au cours d'une culture discontinue de cellules CHO limitées en glucose, le profil de glycosylation de l'IFN-γ recombinant n'est pas constant. Dans ces conditions, plusieurs auteurs ont observé une diminution de la proportion de molécules d'IFN-γ glycosylées sur deux sites au profit d'une augmentation des molécules d'IFN-γ non glycosylées (Goldman *et al*., 1998; Xie *et al*., 1997; Hayter *et al*., 1991, 1992; Curling *et al*., 1990).

Différentes lignées cellulaires limitées en glucose ont semblé synthétisé des glycannes tronqués, de type $Man_5GlcNAc_2$ (Chapman et Calhoun, 1981; Gersham et Robbins, 1981; Rearick *et al*., 1981). Des cultures réalisées en limitation en glucose peuvent également interdire la présence de structures glycanniques sur les protéines (Stark et Heath, 1979). Le mécanisme responsable de la synthèse de glycannes tronqués n'est pas élucidé. Une hypothèse proposée par certains auteurs consiste à dire que l'OST transfère ces structures glycanniques tronquées avec une efficacité moindre que les structures de type $Man_9GlcNAc_2$, provoquant ainsi une sous glycosylation. Bien que l'OST puisse transférer des glycannes tronqués sur les protéines (Stoll, 1986), il semble qu'elle ait plus d'affinité pour le précurseur oligosaccharide $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ (Karaoglou *et al*., 2001). Pour d'autres auteurs, une limitation prolongée en glucose affecterait la biosynthèse des pools de nucléotides-sucres (Nyberg *et al*., 1999).

Des sucres, autres que le glucose, ont également été ajoutés à des cultures cellulaires afin de déterminer leur influence sur la glycosylation. La supplémentation en galactose (20 mM) d'une culture de cellules CHO productrices d'interleukine-4/13 (IL-4/13) n'a pas eu

d'effet sur le taux d'expression de cinq enzymes de la glycosylation, à savoir la sialidase, une α2,3 sialyltransférase, le transporteur de CMP-acide sialique, la β1,4 galactosyltransférase, et l'UDP-galactosyltransférase (Clark *et al*., 2005). L'ajout de mannose (1 mM) à des cultures de fibroblastes n'a pas eu d'impact sur la structure des précurseurs oligosaccharidiques (Kömer *et al*., 1998).

2.1.3 La glutamine

La glutamine est métabolisée afin de fournir l'énergie nécessaire à la maintenance cellulaire. Elle intervient également dans les voies de biosynthèse des nucléotides puriques et pyrimidiques (Engström et Zetterberg, 1984). Dans des conditions de limitation en glutamine, Nyberg *et al*. (1999) ont observé une faible diminution du pourcentage de glycoformes 2N de l'IFN-γ produit par des cellules CHO (de 70% à 62%) ainsi qu'une diminution de 40% du pool d'UDP-GNAc. Ces auteurs suggèrent qu'une diminution de la formation des sucres aminés, en particulier la glucosamine, engendre une diminution de la synthèse d'UDP-GNAc. Barnabé et Butler (2000) ont étudié l'effet de différentes concentrations en glucose et glutamine sur les nucléotides intracellulaires d'hybridomes et ont observé qu'une faible concentration en glutamine (0,5 mM) était responsable d'une diminution des pools en ATP, CTP, GTP, UTP, UDP-GNAc et NAD.

2.1.4 Les ions ammonium

Les ions ammonium dérivent du métabolisme de dégradation de la glutamine et de sa décomposition chimique dans le milieu de culture (Ozturk *et al*., 1990). Il est clairement établi que les ions ammonium, présents en concentrations élevées, réduisent la croissance cellulaire (Schneider *et al*., 1996; Ozturk *et al*., 1992) mais ils peuvent également influencer, de diverses manières, le processus de glycosylation.

Une augmentation en ions ammonium, induite par une supplémentation en NH_4Cl de l'ordre de 15 mM, affectait la microhétérogénéité de la glycosylation de l'interleukine-2 (IL-2) produite par des cellules BHK, en augmentant l'antennarité et en diminuant la sialylation des N-glycannes (Gawlitzek *et al*., 1998, 1995a). Une diminution, voire une inhibition totale, de la sialylation des glycoprotéines synthétisées en présence de concentrations élevées en ions ammonium a également été observée par d'autres auteurs (Zhangi *et al*., 1998; Andersen et

Goochee, 1995; Maiorella, 1992; Thorens et Vassalli, 1986). La N-glycosylation du lactogène-I placentaire murin exprimé dans des cellules CHO est inhibée lorsque les concentrations en NH_4Cl sont augmentées (Borys *et al*., 1994). De plus, dans ces conditions, la fucosylation des glycannes a été augmentée. Yang et Butler (2000) ont étudié l'effet des ions ammonium sur la glycosylation de l'EPO produite dans des cellules CHO : en présence d'une concentration en NH_4Cl de 10 mM, la sialylation ainsi que la proportion de O-glycannes fixés sur l'EPO se trouvaient réduites. Peu d'explications sont disponibles quant à l'effet toxique des ions ammonium sur la glycosylation. Une théorie est basée sur l'hypothèse que les ions ammonium modifient le pH intracellulaire (Andersen et Goochee, 1995; Glacken, 1988). Cependant, des études contradictoires tendent à montrer que l'influence des ions ammonium sur la glycosylation ne peut être due qu'à la seule modification du pH intracellulaire (Martinelle et Häggström, 1993; Ozturk *et al*., 1992; McQueen et Bailey, 1990). Une autre hypothèse, proposée par Ryll *et al*. (1994), consiste à relier l'augmentation de la concentration en ions ammonium à une augmentation des pools intracellulaires de nucléotides-sucres, et en particulier les pools d'UDP-GlcNAc et d'UDP-GalNAc.

2.1.5 Les lipides

Castro *et al*. (1995) ont étudié l'influence potentielle de la supplémentation par divers mélanges lipidiques sur la glycosylation de l'IFN-γ produit par des cellules CHO. Une culture discontinue réalisée en présence de mélange lipidique a permis de prévenir l'apparition d'IFN-γ non glycosylé. De même, l'adjonction de divers suppléments lipidiques, composés de cholestérol, de phospholides, d'acides gras et de protéines, a permis de réduire la chute de la proportion de glycoformes 2N de l'IFN-γ produit par des cellules CHO (Jenkins *et al*., 1994). Les auteurs suggèrent, d'une part, que la substitution de la fraction V de l'albumine par les suppléments lipidiques permet d'éliminer des molécules toxiques inhibitrices de la glycosylation et résultant de l'oxydation des acides gras, formées lors du traitement par la chaleur de l'albumine. D'autre part, la composition des suppléments lipidiques étant plus riche, leur utilisation fournirait une plus large variété de lipides pour les cellules.

2.1.6 Les acides aminés

L'influence des concentrations en acides aminés sur la glycosylation, en particulier la macrohétérogénéité, n'a pas fait l'objet de nombreuses études. Hayter *et al*. (1991) et Lamotte (1997) ont suggéré que certains acides aminés pouvaient potentiellement être limitants pour la croissance cellulaire. Chen et Harcum (2005) ont testé l'influence de la supplémentation en acides aminés sur la glycosylation du t-PA produit par des cellules CHO. Parmi les acides aminés étudiés, il s'avère que la thréonine, la proline et la glycine, chacun ajouté à une concentration de 20 mM, favorisent la croissance cellulaire et la production de t-PA. Ces trois acides aminés ont également une influence sur la glycosylation en augmentant le contenu en α2,3-acide sialique, en β(1,4)-GalNAc et en α2,6-acide sialique des glycannes associés au t-PA. L'addition des ces trois acides aminés stimulerait les réactions du cycle de Krebs, qui favoriserait à son tour le métabolisme énergétique cellulaire. De plus, les auteurs suggèrent que l'ajout de ces acides aminés, en diminuant la production d'ions ammonium, minimiserait ainsi les effets négatifs engendrés par ces derniers.

2.1.7 Les vitamines

Très peu de travaux relatent cependant l'influence potentielle des vitamines sur le processus de N-glycosylation. Les vitamines sont des molécules importantes, car ce sont des précurseurs impliqués dans les voies de biosynthèse des acides aminés. Hiller *et al*. (1994) et Kurano *et al*. (1990) ont étudié l'influence des vitamines sur la croissance des cellules CHO. Un déficit en vitamine A induit une diminution de la concentration en GDP-Man, accompagnée par une diminution de la concentration en dol-P-Man, du taux de dol-PP-oligosaccharides ainsi que des glycoprotéines (Rimoldi *et al*., 1990). Une limitation en vitamine A serait à l'origine d'une réduction de la synthèse de GDP-Man.

L'acide ascorbique (vitamine C) joue un rôle prépondérant dans les mécanismes oxydatifs de repliement des protéines et favorise la formation des ponts disulfure *in vitro* (Banhegyi *et al*., 2003). Quelques études ont montré que l'acide ascorbique pouvait influencer la glycosylation non enzymatique mais les résultats sont contradictoires : pour Stolba *et al*. (1987), l'acide ascorbique (1 mM) inhibe la glycosylation de l'albumine et du collagène alors que l'acide déhydroascorbique (1 mM) semble l'augmenter. Au contraire, pour Khatami *et al*. (1988), des concentrations en acide ascorbique et en acide déhydroascorbique plus élevées (5

mM) inhibent la glycosylation de l'albumine dans les deux cas. Les auteurs expliquent l'inhibition provoquée par l'acide ascorbique par une compétition entre cette vitamine et le glucose pour les réactions de glycosylation.

2.2 Les paramètres opératoires

2.2.1 Le pH

Des conditions de pH non optimales, c'est-à-dire des valeurs de pH extracellulaires inférieures à 6,9 ou supérieures à 8,2, peuvent modifier le profil de glycosylation du lactogène-I placentaire murin (Borys *et al*., 1993) et de l'IgG (Rothman *et al*., 1989). Une hypothèse proposée pour expliquer ces observations réside dans le fait qu'une modification du pH extracellulaire altère le pH intracellulaire (Cherlet, 1995), qui, à son tour, est susceptible d'influencer l'activité des glycosyltransférases intracellulaires (Borys *et al*., 1993).

2.2.2 La pO_2 et la pCO_2

Une diminution de la quantité d'O_2 dissous dans le milieu peut influencer de façon négative la glycosylation des protéines. Une baisse du degré de sialylation de la FSH humaine (*follicule stimulating-hormone*) a été observée, au cours d'une culture de cellules CHO, lorsque la pO_2 est diminuée (Chotigeat *et al*., 1994). La galactosylation des structures N-glycanniques d'un anticorps monoclonal produit par des hybridomes a également été amoindrie dans des conditions où la pO_2 atteignait des valeurs inférieures à 10% de la saturation en air (Kunkel *et al*., 1998). En revanche, pour d'autres auteurs, les glycannes associés au t-PA ne se trouvaient pas affectés dans des conditions d'hypoxie sévère (Lin *et al*., 1993).

Des résultats contradictoires ont été obtenus quant à l'impact de la concentration en CO_2 dissous sur la glycosylation. En effet, une pression partielle en CO_2 élevée (250 mmHg) semble n'avoir eu que peu d'influence sur la glycosylation du t-PA produit par des cellules CHO, à l'exception d'une légère augmentation de la proportion d'acides sialiques NeuGc (Kimura et Miller, 1997). En revanche, ces auteurs observent une diminution du taux d'acide polysialique, polymère associé à de nombreux glycannes des protéines neurales d'adhésion cellulaire.

2.2.3 La température

La diminution de la température, de 37°C à 33°C, est généralement utilisée pour augmenter la viabilité et en conséquence la productivité (Fox *et al*., 2004; Yoon *et al*., 2003; Kaufmann *et al*., 1999; Weidemann *et al*., 1994). On peut penser qu'une modification de la température du milieu de culture est suceptible d'influencer les enzymes intracellulaires impliquées dans la glycosylation, mais les travaux de Yoon *et al*. (2002) ont montré que la macrohétérogénéité de la glycosylation et la sialylation de l'EPO n'étaient pas affectées lorsque les cellules CHO étaient cultivées à 33°C.

2.3 Les modes de culture

Le mode de culture utilisé pour la production de la protéine d'intérêt est susceptible d'influencer le processus de glycosylation, de par les modifications de la composition du milieu de culture qu'il engendre.

L'hétérogénéité d'occupation des sites de glycosylation, mais également l'hétérogénéité de structure de glycannes, peuvent être modifiées durant des cultures discontinues de cellules animales. Par exemple, la proportion d'IFN-γ glycosylé sur deux sites diminue au profit d'une augmentation de la proportion d'IFN-γ non glycosylé au cours d'une culture discontinue de cellules CHO (Goldman *et al*., 1998; Lamotte, 1997; Xie *et al*., 1997; Hayter *et al*., 1990). Ces auteurs attribuent ces modifications à l'évolution de la composition des milieux de culture au cours du procédé.

La diminution de la proportion de molécules d'IFN-γ doublement glycosylées n'a pas été empêchée mais ralentie au cours d'une culture de cellules CHO en mode semi-continu (Castro et al., 1995). Au contraire, la macrohétérogénéité de la glycosylation du t-PA produit par des cellules CHO augmente en mode semi-continu (Andersen *et al*., 2000). Par ailleurs, l'ajout de milieu de culture en mode semi-continu, de façon « dynamique » et pilotée en ligne, a permis de maintenir un profil de glycosylation de l'IFN-γ constant au cours de la culture (Wong *et al*., 2004). Dans ce cas, la concentration en glutamine est mesurée en ligne, et ceci permet de réaliser l'alimentation en milieu de culture dès que la concentration dans le milieu est inférieure à la valeur de consigne (environ toutes les 1,5 heures). En maintenant une

concentration en glutamine faible (0,3 mM) mais constante durant tout le procédé, la macrohétérogénéité et la microhétérogénéité de la protéine n'ont pas varié au cours de la culture, suggérant que l'alimentation en continu permet d'éviter des limitations nutritionnelles, susceptibles d'influencer la glycosylation.

Hayter *et al*. (1992, 1993) ont montré que le profil de glycosylation de l'IFN-γ était constant au cours d'une culture continue réalisée dans des conditions de limitation en glucose. Il semble que seule l'utilisation de taux de dilution très faibles engendre un phénomène de sous glycosylation de l'IFN-γ (Hayter *et al*., 1993). Les structures glycanniques associées à l'IFN-γ, produit par des cellules CHO, présentent un niveau de sialylation amoindrie en mode perfusé en comparaison avec une culture discontinue (Lamotte, 1997).

2.4 Influence des paramètres intracellulaires sur la glycosylation

2.4.1 Influence de la cellule hôte

De nombreux systèmes de production de glycoprotéines recombinantes sont aujourd'hui disponibles. Outre les contraintes économiques, le choix du système d'expression sera également dicté par la qualité de la protéine que l'on souhaite produire, et en particulier par l'importance de la glycosylation pour les propriétés biologiques de la protéine considérée. Si la présence des structures glycanniques est essentielle pour la protéine, le système de production le plus adapté est les cellules animales, et plus particulièrement les cellules CHO. Néanmoins, chaque lignée cellulaire possède un équipement enzymatique qui lui est propre, conditionnant les réactions de la glycosylation.

En dépit de la production de structures glycanniques très proches de celles retrouvées chez l'homme, elles ne sont pas strictement identiques sur les protéines recombinantes produites dans les cellules de mammifères. Contrairement aux cellules murines et humaines, les cellules CHO ne possèdent pas d'α2,6 sialyltransférase, mais uniquement une α2,3 sialyltransférase (Lee *et al*., 1989). De plus, des acides sialiques de type glycolique (NeuGc) ont également été mis en évidence sur les protéines exprimées dans cet hôte. Or, ces structures se révèlent être immunogènes pour l'homme (Noguchi *et al*., 1995). Enfin, les cellules murines expriment une α1,3 galactosyltransférase, susceptible de rendre immunogènes les glycannes portant des résidus Gal liés en α1,3 (Jenkins et Curling, 1994).

La maîtrise des techniques du génie génétique a permis de modifier efficacement la machinerie intracellulaire des cellules CHO (Fussenegger *et al*., 1999; Grabenhorst *et al*., 1999). Deux stratégies ont été adoptées : faire exprimer à des cellules CHO des glycosyltransférases qu'elles n'exprimaient pas auparavant, telles l'α2,6 sialyltransférase (Monaco *et al*., 1996) ou l' α1,3 fucosyltransférase (Potvin *et al*., 1990), ou au contraire, réduire l'activité de certaines enzymes exprimées dans les cellules CHO mais non chez l'homme, telle la CMP-NeuAc hydroxylase (Chenu *et al*., 2003). D'autres auteurs ont utilisé une stratégie d'ARN anti-sens afin de réduire le taux de sialidase relarguée par des cellules CHO dans le milieu de culture et empêcher ainsi la désialylation des protéines recombinantes. Dans cette lignée CHO mutante, l'activité sialidasique a été réduite de 40% par rapport aux cellules sauvages. Le contenu en acide sialique de la protéine modèle, une DNase, a également été augmenté de 20 à 37% (Ferrari *et al*., 1998).

2.4.2 Disponibilité en dolichol-phosphate intracellulaire

Le rôle majeur du dol-P dans le processus de N-glycosylation a été développé dans le paragraphe traitant de la régulation du cycle des dolichols. Les résultats quant à l'effet de la supplémentation en dol-P sur la glycosylation sont contradictoires et semblent dépendre de l'hôte considéré. Pour certains auteurs, l'ajout de dol-P exogène à des concentrations inférieures ou égales à 20 µg/mL induit une augmentation de la synthèse de précurseurs oligosaccharidiques de 200%, dans des cellules animales autres que des CHO (Kousvelari *et al*., 1983; Carson *et al*., 1981). En revanche, Yuk et Wang (2002) ont supplémenté des cultures discontinues de cellules CHO productrices d'IFN-γ par du dol-P (100 µg/mL). Cette supplémentation n'a eu aucun impact sur la synthèse des précurseurs oligosaccharidiques et n'a pas empêché le phénomène de sous-glycosylation. D'autres études semblent indiquer que le dol-P intracellulaire ne serait pas limitant pour la glycosylation. En effet, la synthèse des glycoprotéines reste constante dans des cellules murines, alors que la concentration en dol-P intracellulaire varie d'un facteur 2 (Adair et Cafmeyer, 1987). Lorsque des microsomes de foie de porc sont incubés avec du dol-P, le taux de dol-PP-oligosaccharides double alors que la synthèse protéique demeure inchangée (Spiro et Spiro, 1986).

2.4.3 Disponibilité en nucléotides et nucléotides-sucres intracellulaires

La majorité des travaux relatifs à l'étude des nucléotides-sucres intracellulaires se sont focalisés sur l'UDP-GlcNAc et l'UDP-GalNAc. Peu d'informations sont disponibles dans la littérature quant au suivi des pools de GDP-Man ou d'UDP-Glc.

Au cours d'une culture discontinue, la synthèse en UDP-GNAc (UDPGlcNAc+UDP-GalNAc) augmente proportionnellement avec la concentration en ions ammonium (Ryll *et al*., 1994). La concentration en UDP-GNAc commence à augmenter lorsque la croissance cellulair ralentit (Ryll *et al*., 1994). De plus, une glycolyse efficace semble être un pré-requis nécessaire pour la formation de ces sucres activés car ces auteurs n'ont pas observé une augmentation rapide du pool d'UDP-GNAc dans des cellules cultivées dans un milieu limité en glucose. L'augmentation du pool d'UDP-GlcNAc affecte particulièrement l'antennarité mais pas la sialylation terminale des N-glycannes (Grammatikos *et al*., 1998; Gawlitzek *et al*., 1998). De fortes concentrations en UDP-GNAc semblent altérer le transport de CMP-NeuAc dans le compartiment *trans* Golgi, provoquant une diminution de la sialylation (Pels Rijcken *et al*., 1995). Chapman et Calhoun (1981) ont également montré une diminution des concentrations en GDP-Man et en ATP dans des cellules CHO cultivées dans des conditions de limitation en glucose.

2.4.4 Compétition entre la glycosylation et la mise en conformation des protéines

Les processus de glycosylation et de mise en conformation des protéines sont intimement liés car ils se déroulent dans le même compartiment et de façon simultanée. L'influence des glycannes sur la conformation native des protéines n'est plus à démontrer et ces dernières années, de nombreuses études se sont penchées sur le rôle des glycannes sur la mise en conformation des protéines (Parodi, 2000). Des mutations sur des sites spécifiques de N-glycosylation peuvent altérer totalement la mise en conformation de la protéine (Branza-Nichita *et al*., 2000). De plus, l'acquisition de structures glycanniques augmente la solubilité des protéines et va ainsi favoriser les interactions protéine-protéine au cours de la mise en conformation. Certains auteurs ont également montré que l'utilisation d'agents chimiques

réducteurs, empêchant la formation des ponts disulfure, augmente l'occupation des sites de glycosylation (Holst *et al*., 1996; Allen *et al*., 1995)

Ainsi, une glycoprotéine pleinement active nécessite une synthèse coordonnée des parties protéique et glycannique, tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif. Pour la partie glycannique, cela requiert non seulement l'expression des glycosyltransférases et leur localisation intracellulaire correcte, mais aussi une synthèse adéquate des nucléotides et nucléotides-sucres ainsi que leur transport jusqu'aux sites de glycosylation. De plus, la structure finale ne dépendra pas uniquement de cet équipement enzymatique fonctionnel, mais aussi du chemin cytologique suivi par la glycoprotéine, ainsi que des signaux plus subtils portés par la protéine elle-même. Le déroulement simultané du processus de glycosylation, de la mise en conformation et du contrôle qualité constitue autant de paramètres susceptibles d'interférer les uns avec les autres.

3. L'interféron-γ

3.1 La structure protéique

La séquence de l'ADNc codant l'IFN-γ humain a une taille de 1,2 kb (Gray *et al*., 1982). La protéine compte 166 acides aminés. Un peptide signal de 23 acides aminés est clivé dans le reticulum endoplasmique, générant ainsi une protéine comportant 143 résidus (Devos *et al*., 1982). Son extrémité N-terminale est bloquée par un résidu glutamine sous forme de pyroglutamate (Rinderknecht *et al*., 1984). L'extrémité C-terminale peut être partiellement clivée de plusieurs acides aminés avant sécrétion (Curling *et al*., 1990). La masse moléculaire de la protéine découlant de la structure primaire est théoriquement voisine de 17,1 kDa (Gray *et al*., 1982). La structure tridimensionnelle de l'IFN-γ a été établie par Ealick *et al*. (1991) et l'IFN-γ est constitué de deux monomères identiques. Chaque monomère est constitué de six hélices α reliées par plusieurs boucles. Il n'apparaît pas de feuillet β. La forme monomérique est active (Sareneva *et al*., 1994).

3.2 Les structures N-glycanniques associées à l'IFN-γ

3.2.1 La macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ

L'IFN-γ humain possède deux sites potentiels de N-glycosylation, les résidus asparagines 25 (Asn 25) et 97 (Asn 97). En revanche, cette protéine ne possède pas de site de O-glycosylation.

L'analyse par électrophorèse sur gel de l'IFN-γ humain dénaturé, produit par des fibroblastes et des cellules CHO, a permis de mettre en évidence trois glycoformes distinctes, résultant de la variation d'occupation des sites de glycosylation. On distingue ainsi des molécules d'IFN-γ glycosylées sur deux sites (glycoforme 2N), sur un site (glycoforme 1N) et sur aucun site (glycoforme 0N). Dans le cas de la glycoforme 1N, c'est l'Asn 25 qui est glycosylée dans 95% des cas. Il été montré que le séquon Asn-X-Ser/Thr de l'Asn 25 est 40 fois plus susceptible d'être glycosylé que le séquon de l'Asn 97 (Bause, 1984). De plus, une analyse des sites d'occupation de glycosylation a révélé que les séquences cibles potentielles de glycosylation situées du côté N-terminal de la protéine sont glycosylées préférentiellement par rapport à celles situées du côté C-terminal (Gavel et von Heijne, 1990). Enfin, une analyse structurale par rayons X et RMN d'un IFN-γ produit chez *E. coli* a montré que l'Asn 25 était située au milieu d'une structure en *random coil* alors que l'Asn 97 se situait au sein d'une hélice α, générant davantage de contraintes d'accessibilité à l'OST (source de macrohétérogénéité) et aux différentes glycosyltransférases (source de microhétérogénéité) (Grzesiek *et al*., 1992; Ealick *et al*., 1991).

3.2.2 La microhétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ

L'analyse par spectrométrie de masse et RMN révèle que les structures glycanniques associées à l'IFN-γ, produit par des cellules CHO, sont majoritairement de type bi-antennées. Des structures tri-antennées ont également été mises en évidence, mais ne représentent que 20% des glycannes totaux (James *et al*., 1995). Les glycannes fixés sur le site Asn 25 sont fucosylés en α1,6, alors que ceux présents sur l'Asn 97 ne le sont que rarement. Le degré de sialylation est également variable : les structures bi- et tri-antennées sont sialylées de façon très variable, mais l'acide sialique est du NeuAc, lié en α2,3 sur le résidu galactose. De façon générale, les glycannes associés à l'Asn 25 présentent moins de variabilité que ceux associés

à l'Asn 97. Des structures de type oligomannosidique peuvent être présentes à raison de 30% lorsque l'IFN-γ est monoglycosylé (James *et al*., 1995).

3.2.3 Importance de la glycosylation pour l'IFN-γ

L'IFN-γ non glycosylé est biologiquement actif (Litman *et al*., 1985). Mais la présence des glycannes sur la protéine peut améliorer certaines propriétés biologiques. En effet, l'ocupation du site Asn 25 par une structure glycannique favorise sa dimérisation, sa sécrétion (Sareneva *et al*., 1994) et sa résistance aux protéases (Sareneva *et al*., 1995). De plus, la demi-vie circulatoire de l'IFN-γ non glycosylé se trouve amoindrie en comparaison avec l'IFN-γ doublement glycosylé (Sareneva *et al*., 1993). L'antigénicité est également modifiée par la présence des structures oligosaccharidiques (Meager et Leist, 1986). En ce qui concerne son activité anti-virale, les résultats sont contradictoires. Pour certains auteurs, l'absence de glycannes ne modifie pas l'activité anti-virale (Kelker *et al*., 1993) alors que pour d'autres l'activité anti-virale de l'IFN-γ glycosylé sur deux sites est plus importante que celle de la protéine non glycosylée (Sareneva *et al*., 1994).

3.3 Fonctions biologiques de l'IFN-γ

L'IFN-γ appartient à la famille des cytokines. Chez l'homme, l'IFN-γ peut être produit par deux types de cellules : les lymphocytes T et les cellules tueuses naturelles (Farrar et Schreiber, 1993). La synthèse d'IFN-γ peut être induite par divers effecteurs : des cytokines, des antigènes, les esters de phorbol, les lectines, et l'IFN-γ lui-même (Charley et la Bonnardière, 1993).

L'action de l'IFN-γ sur une cellule nécessite la présence d'un récepteur membranaire spécifique. Les mécanismes moléculaires d'action de cette cytokine sont complexes, car ils font appel à de nombreuses cascades de signaux de transduction (Kalvakolanu, 2003). L'IFN-γ, sous forme homodimérique, se fixe à son récepteur (figure I.17). Ce dernier se compose d'une chaîne α, qui permet la fixation de l'IFN-γ, et d'une chaîne β, qui permet la transduction du signal (Bach *et al*., 1997). Les deux chaînes du récepteur sont associées à deux kinases, JAK1 et JAK2 respectivement. Lors de la fixation de l'IFN-γ, il y a rapprochement des deux chaînes du récepteur, entraînant la phosphorylation réciproque de

JAK1 et JAK2, ainsi que la phosphorylation de STAT1. Cette dernière s'homodimérise, formant ainsi le complexe GAF, et traverse la paroi nucléaire pour aller se fixer sur les sites GAS (*IFN-γ activation sequence*) au niveau des promoteurs des gènes inductibles par l'IFN-γ (Bach *et al*., 1997), permettant le déclenchement de plusieurs réponses :

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

L'IFN-γ est actuellement commercialisé sous le nom d'Actimmune par la société Genentech et d'Imukin par la société Boehringer Ingelheim. Dans les deux cas, il est produit chez *E. coli* et est, par conséquent, non glycosylé. Bien que faisant l'objet de nombreuses études pharmacologiques et cliniques, en particulier dans le cadre de la mise au point et du développement de thérapies anti-cancéreuses, les applications thérapeutiques de l'IFN-γ recombinant sont à l'heure actuelle limitées à deux maladies, l'ostéoporose et la maladie granulomateuse chronique (Vilcek et Feldmann, 2004).

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

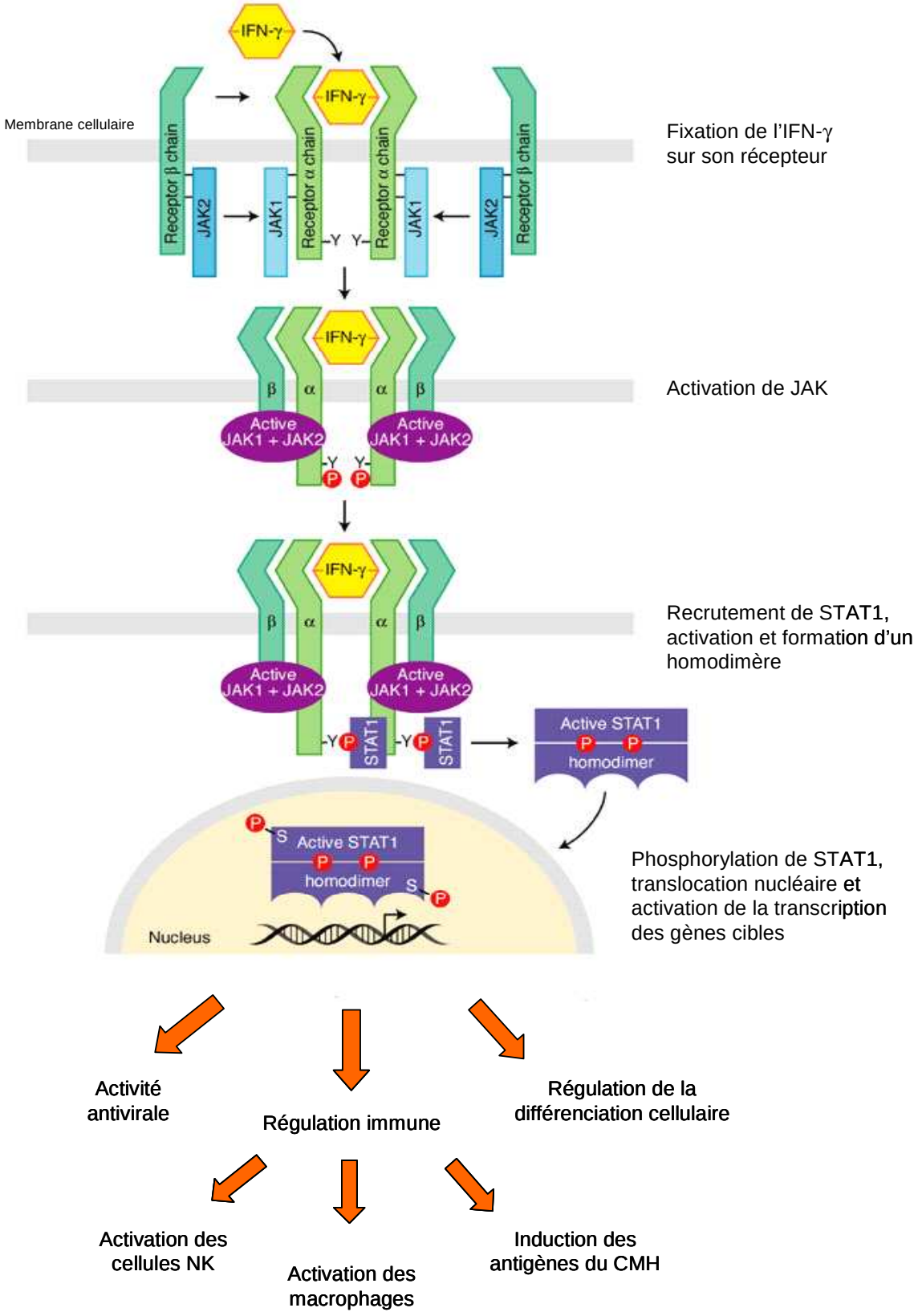


Figure I.17 : Voies de signalisation de l'IFN-γ.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

1. Culture cellulaire

1.1 Lignées cellulaires

La lignée cellulaire CHO 320 a été créée en 1985 par la *Wellcome Foundation Laboratories* (Beckenham, Grande-Bretagne). Elle résulte de la co-transfection de la lignée CHO Dux-B11 dhfr$^-$ des ADNc codant respectivement l'IFN-γ humain et la dihydrofolate réductase. L'ADNc codant l'IFN-γ a été inséré dans un vecteur plasmidique dérivé du plasmide pSV2-dhfr contenant le promoteur SV40. Les clones ont ensuite été sélectionnés pour leur résistance au méthotrexate suivant la méthode de Page et Sydenham (1991). La lignée CHO 320 a été adaptée à la culture en suspension et en milieu sans sérum (Hayter *et al*., 1991). La lignée CHO C5 est un clone issu de la lignée CHO 320 transfectée avec l'ADNc codant l'α2,6-sialyltransférase de rat. La méthode de transfection utilisée est basée sur l'amplification in vitro de l'ADNc (Monaco *et al*., 1994). La méthode de transfection et de sélection a fait l'objet d'une publication (Monaco *et al*., 1996). Le clone CHO C5 a été adapté à la culture en suspension et en milieu sans sérum (Lamotte, 1997). Enfin, la lignée CHO Pro-5, auxotrophe pour la proline, a été donnée par le Dr S.S. Krag (Université John Hopkins, Baltimore, Etats-Unis).

1.2 Conservation des lignées

1.2.1 Congélation des cellules

Les lignées cellulaires sont conservées dans l'azote liquide (-196°C). Préalablement à la congélation, 1.10^7 à 2.10^7 cellules sont mises en suspension dans 1 mL de milieu contenant 10% de DMSO (Sigma). Pour les lignées cultivées dans un milieu avec sérum, le milieu de congélation contient également 20% de sérum de veau fœtal (SVF). En revanche, lorsque les cellules sont cultivées sans sérum, la congélation est réalisée dans un milieu totalement dépourvu de sérum. La suspension cellulaire est répartie en tubes cryogéniques de matière plastique (Nunc). La congélation est ensuite réalisée à l'aide de l'appareil Nicool LM 10. Le barème de congélation est le suivant : 25 minutes en position 3 (-11,5°C), 10 minutes en

position 10 (-61°C) suivi d'une immersion des tubes cryogéniques pendant une minute dans l'azote liquide.

1.2.2 Décongélation des cellules

La décongélation est réalisée en plaçant le tube cryogénique dans un bain-marie thermostaté à 37°C. Après décongélation, le contenu du tube est repris dans 10 mL de milieu de culture. L'ensemble est centrifugé durant 5 minutes à 800 tr/min. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est remis en suspension dans 5 mL de milieu de culture pour être placé en flacon de Roux (T25).

1.3 Numération cellulaire

Les cellules sont dénombrées par observation microscopique à l'aide d'un hématocytomètre ou cellule de Thoma. Les densités cellulaires présentées dans notre étude résultent de la moyenne obtenue après comptages de six grilles. L'incertitude sur la valeur de la densité cellulaire est comprise entre 10 et 20% (Nielsen *et al.*, 1991). La viabilité cellulaire est déterminée par coloration à l'aide d'une solution de bleu trypan (réf. T8154, Sigma). A 900 µL de suspension cellulaire sont ajoutés 100 µL de bleu trypan. Ce colorant pénètre dans les cellules dont l'intégrité membranaire est endommagée et les colore ainsi en bleu. Les cellules bleues sont donc considérées comme mortes, alors que les cellules blanches sont considérées comme vivantes.

La numération cellulaire a également été réalisée à l'aide d'un système de comptage automatique Cellscreen (Innovatis). Son principe de fonctionnement est basé sur l'acquisition d'image : les cellules cultivées en micro-plaques 96 puits sont photographiées à l'aide d'une caméra CDD, puis les images sont traitées par un logiciel d'analyse d'images permettant de déterminer le nombre de cellules totales.

1.4 Propagation des cellules

1.4.1 Cellules adhérentes

Les lignées CHO 320 et Pro-5 peuvent être propagées adhérentes en flacons de Roux. Les flacons de Roux (Greiner) sont ensemencés à raison de 2.10^4 cellules/cm^2 puis placés dans un incubateur régulé à 37°C et sous une atmosphère contrôlée contenant 5% de CO_2 (réf. IGO150 Cell Life, Jouan). Les flacons de Roux sont munis de bouchons aérés permettant les échanges gazeux. Lorsque la confluence est atteinte, au bout de 48 à 60 heures, le surnageant est éliminé et le tapis cellulaire est lavé par 5 mL de PBS. Les cellules sont ensuite détachées du support sous l'action d'environ 1 à 3 mL de trypsine (trypsine 0,05 g/L, EDTA 0,02 g/L, NaCl 0,85 g/L - GibcoBRL) et incubées durant 3 minutes à 37°C. L'action de l'enzyme est stoppée par ajout de 10 mL de milieu de culture neuf. La suspension est alors centrifugée dans une tube conique (800 tr/min, 5 minutes) et le culot cellulaire, repris dans du milieu frais, peut être propagé en flacons de Roux.

1.4.2 Cellules en suspension

Les cellules adaptées à la culture en suspension ont été propagées en fiole d'Erlenmeyer de polycarbonate de 125, 250 ou 500 mL (Corning). La densité d'ensemencement est comprise entre 2.10^5 et 3.10^5 cellules/mL. Le ciel de la fiole est rempli durant 2 minutes d'un mélange gazeux constitué de 5% de CO_2 et 95% d'air. La fiole est ensuite bouchée et déposée sur une table d'agitation (IKA) placée dans une étuve régulée à 37°C. La vitesse d'agitation est fixée à 70 tr/min. Le volume utile de la culture est égal au cinquième de la contenance maximale de la fiole. Après 48 heures de culture, la suspension cellulaire est centrifugée dans un tube conique puis le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu de culture frais pour l'ensemencement de nouvelles fioles.

Des flacons agités cylindriques de type « *spinner* » (Techne) ont également été utilisés pour les cinétiques de culture en suspension ou pour l'amplification des cellules nécessaire à l'ensemencement des cultures en bioréacteurs. Ces flacons, de 250 mL de volume utile, sont en verre borosilicaté et pourvus d'une tige aimantée centrale, dont l'extrémité supérieure est fixée au bouchon. Ils sont placés sur une table d'agitation magnétique (Techne MCS 1045) dont la vitesse est fixée à 80 tr/min. La table est elle-même située dans un incubateur, régulé à

37°C, sous une atmosphère de 5% de CO_2 (Jouan EG 1101R). Les bouchons latéraux des flacons sont légèrement dévissés de façon à permettre les échanges gazeux.

1.4.3 Cultures en bioréacteur parfaitement agité

1.4.3.1 Cultures en mode discontinu

Des bioréacteurs de 2 L et de 4 L (Incelltech SGI) ont été utilisés pour réaliser les cultures en modes discontinu et semi-continu. La culture de cellules animales en bioréacteur permet de contrôler plusieurs paramètres opératoires au cours du procédé. Ces paramètres sont la température, le pH, l'oxygénation et l'agitation.

La température est maintenue constante dans le bioréacteur grâce à un système de chauffage à air chaud soufflé dans une enveloppe présente autour de la cuve. La valeur de consigne est fixée à 37°C.

Le pH est contrôlé par un système de régulation de type PID (Proportionnelle-Intégrale-Dérivée) couplé à une sonde stérilisable de mesure du pH (Ingold). Celle-ci est étalonnée avant stérilisation à l'aide de solutions tampons commerciales de pH 4 et 7. Le système de régulation PID commande l'arrivée d'acide, en l'occurrence le CO_2 entraînant la dissociation de H_2CO_3 en H^+ et HCO_3^- si le pH est supérieur à la valeur de consigne. En revanche, si le pH est inférieur à la valeur de consigne, la régulation actionne la pompe d'injection de soude 0,2 N vers le réacteur. La valeur de consigne est fixée à 7,2.

L'oxygénation est également contrôlée par un système de type PID couplé à une sonde stérilisable (Ingold), étalonnée avant stérilisation. Les valeurs de 0% et 100% de saturation de l'air sont obtenues en plaçant la sonde dans un flux d'azote puis d'air. Pendant la culture, l'aération est assurée par le ciel du réacteur et par un diffuseur de gaz, encore appelé « *sparger* », situé au fond de la cuve. L'injection d'oxygène est soumise à l'ouverture d'une électrovanne pilotée par le système de régulation PID. La valeur de consigne de la pO_2 est fixée à 50% de la saturation en air.

L'agitation est assurée par des pales inclinées et la vitesse d'agitation est fixée à 50 tr/min. Tous ces paramètres sont contrôlés en ligne à l'aide du système Biocontroller (ADI 1030, Applikon) et du logiciel BioXpert (Applikon).

Avant la mise en œuvre de la culture, la stérilisation du réacteur contenant du PBS est réalisée par autoclavage (25 minutes, 121°C, 1 bar). Le PBS est soutiré stérilement avant l'ensemencement. L'inoculum, constitué de cellules dans le milieu frais, est introduit

stérilement dans le réacteur par surpression à l'aide d'air contenant 5% de CO_2. En début de culture, l'ajout de CO_2 est privilégié, puis seule intervient la régulation de pH par ajout de soude, le métabolisme cellulaire acidifiant le milieu de culture. Les prélèvements effectués pour les numérations cellulaires, les dosages et les analyses sont réalisés dans le bioréacteur environ toutes les douze heures.

1.4.3.2 Cultures en mode semi-continu

Ce système consiste à alimenter le bioréacteur avec du milieu frais sans rien soutirer par ailleurs. On choisit de commencer l'alimentation en milieu frais lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance, au bout d'environ 60 heures de culture. Le débit d'alimentation est fixé à 48 mL/h de façon à ce que le taux de dilution D (D=Q/V) soit égal à la vitesse spécifique de croissance, à savoir 0,02 h^{-1} au moment où débute la culture en mode semi-continu. L'alimentation est ensuite réalisée à débit constant tout au long du procédé (48 mL/h), ce qui implique une variation du taux de dilution au cours de la culture due à l'augmentation du volume de milieu de culture. L'apport de milieu neuf est réalisé à l'aide d'une pompe péristaltique (Watson-Marlow). Le milieu de culture ajouté est du milieu RPMI, supplémenté par 10% de sérum; les concentrations initiales en glucose et glutamine sont respectivement de 20 et 4 mM.

1.5 Milieux de culture

Différents milieux de culture ont été utilisés au cours de notre étude. Les cellules CHO 320 ont été cultivées dans le milieu RPMI 1640 (Sigma) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (réf. 04-001-AE, ATGC). Le sérum utilisé durant notre étude provient d'un même lot et l'inactivation des virus dans ce lot de sérum a été effectuée par irradiation aux rayons gamma. Le fournisseur étant dans l'impossibilité de nous indiquer la composition du lot de sérum que nous avons utilisé, celle d'un lot de sérum de veau fœtal irradié, fourni par Hyclone, est présentée dans le tableau II.1. Bien que la composition du sérum varie d'un lot à l'autre, ce tableau permet d'avoir une idée de l'ordre de grandeur des concentrations des composants présents dans le sérum de veau foetal.

Les cellules ont également été cultivées dans deux milieux de culture sans sérum, le milieu RPMI et le milieu PF-BDM. La formulation du milieu RPMI 1640 sans sérum dérive

du milieu Roswell Park Memorial Institute auquel sont ajoutés des éléments nutritifs de faible poids moléculaire, conformément aux recommandations de Hamilton et Ham (1977). Les concentrations des éléments nutritifs ajoutés au RPMI ont été optimisées pour la croissance de la lignée CHO 320 (Castro *et al*., 1992). Les éléments nutritifs ajoutés sont les suivants : albumine bovine sérique (Euromedex), insuline bovine (réf. I1882, Sigma), transferrine humaine (réf. T1147, Sigma), pyruvate de sodium (réf. P5280, Sigma), alanine (réf. A3534, Sigma), putrescine (réf. P5780, Sigma), $FeSO_4$ (réf. F8533, Sigma), $ZnSO_4$ (réf. Z0251, Sigma), Na_2SeO_3 (réf. S5261, Sigma), $CuSO_4$ (réf. C8027, Sigma). La composition finale du milieu RPMI sans sérum est présentée dans le tableau II.1.

Quant au milieu PF-BDM, il s'agit d'un milieu sans sérum, sans protéines, dont la composition a été optimisée pour la croissance d'hybridomes (Schneider, 1989). Le milieu de base BDM (*Basal Defined Medium*) est composé d'un mélange d'IMDM (Invitrogen), de Ham's F-12 (Invitrogen) et de NCTC-135 (Invitrogen) dans un ratio 5/5/1 (vol/vol/vol). Ce milieu est ensuite supplémenté par 0,1% (m/vol) d'acide pluronique F-68 (réf. P-1300, Sigma), 0,04 pM de sélénite de sodium (réf. S5261, Sigma) et 500 µM de citrate de fer (réf. 3388, Sigma). Ce milieu est appelé PF-BDM (*Protein-Free BDM*). La composition finale du milieu PF-BDM est présentée dans le tableau II.1.

Pour toutes les cultures réalisées en mode discontinu et semi-continu en flacons agités ou en bioréacteurs, les milieux de culture sont supplémentés par du glucose (Sigma) et de la glutamine (GibcoBRL), de façon à atteindre des concentrations finales respectives de 20 mM et 4 mM.

Tableau II.1 : Composition finale des milieux de culture RPMI, PF-BDM et du sérum de veau fœtal (SVF).

	Milieu de base (mg/L)		SVF (mg/L)
	PF-BDM	**RPMI**	
SELS INORGANIQUES			
$Ca.Cl_2$	90,1		13,4 meq/L
$Ca.Cl_2.2H_2O$	24		
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$		100	
$Cu.SO_4.5H_2O$	0,001		
$Fe(NO_3)_3.9H_2O$	0,009		
$FeSO_4.7H_2O$	0,379		15,3
KCl	288	400	
KNO_3	0,035		10,4 meq/l
$MgCl_2$	26		
$MgCl_2.6H_2O$			
$MgSO_4$		48,8	28,7
$MgSO_4.7H_2O$	62,6		
NaCl	6118	6000	
$NaHCO_3$	200		
Na_2HPO_4	64,6	800	
$NaH_2PO_4.2H_2O$	71,2		134 meq/l
$NaSeO_3.5H_2O$	0,008		
$ZnSO_4$	0,392		
AUTRES COMPOSES			
Acétate de sodium.$3H_2O$	4,5		
Acide linoléique	0,038		
Acide thiotactique DL-68	0,095		
Cholestérol			380
Ethanol	3,6		
D-Glucose	2955	2000	700
D-Glucuronolactone	0,164		
Glucuronate de sodium.H_2O	0,164		
HEPES	2708		
HDL			180
LDL			70
Phospholipides			450
Putrescine	0,073		
Pyruvate de sodium	100		
Rouge de phénol	9,2	5,3	
Triglycérides			640
Tween 80	1,1		

	Milieu de base (mg/L)		SVF (mg/L)
	PF-BDM	**RPMI**	
COFACTEURS ET PRECURSEURS NUCLEOTIDIQUES			
Coenzyme A	0,227		
Diphophopyridine nucléotide	0,636		
Flavine Adénine Dinucléotide	0,091		
Triphosphopyridine nucléotide	0,091		
Cocarboxylase	0,091		
Glutathion, monosodium	0,909	1	
Désoxyadénosine	0,909		
Désoxyguanosine	0,909		
Désoxycytidine.HCl	0,909		
Désoxythymidine			
Hypoxanthine	2,17		
5-Méthylcytosine	0,009		
Thymidine	0,909		
Uridine triphosphate, sodium	0,091		
ACIDES AMINES			
L-Alanine	18,3		
Acide L-α-amino-n-butyrique	0,5		
L-Arginine	137	200	
L-Asparagine	18,9	50	
Acide L-Aspartique	20,6	20	
L-Cystéine	58,4		
L-Cystine		65,2	
D-Glucosamine.HCl	0,355		
Acide L-Glutamique	41,5	20	
L-Glutamine	344	300	
Glycine	18,3	10	
L-Histidine.HCl.H_2O	31,0	15	
Hydroxy-L-proline	0,373	20	
L-Isoleucine	51,2	50	
L-Leucine	55,5	50	
L-Lysine.HCl	86,4	40	
L-Méthionine	16,1	15	
L-Ornithine.HCl	0,855		
L-Phénylalanine	33,8	15	
L-Proline	34,6	20	
L-Sérine	24,8	30	
L-Taurine	0,382		
L-Thréonine	50,3	20	
L-Tryptophane	9,8	5	
L-Tyrosine	52,4	28,8	
L-Valine	50,3	20	

	Milieu de base (mg/L)		SVF (mg/L)
	PF-BDM	**RPMI**	
VITAMINES			
Acide ascorbique (Vitamine C)	4,5		inf 0,5
Phopho-α-Tocophérol, disodium salt	0,002		
β-carotène (Vitamine E)			0,11
D-Biotine (Vitamine H)	0,011	0,2	20.10^{-6}
Calciférole (Vitamine D2)	0,023		39.10^{-6}
Chlorure de choline	8,3	3	
Cobalamine (Vitamine B12)	1,5	0,005	317.10^{-6}
Acide folique	2,4	1	32
i-Inositol	11,5	35	
Menadione (Vitamine K)	0,002		
Nicotinamide	1,8		
Niacine	0,006		0,001
Niacinamide	0,023	1	
Pantothénate de calcium D	2,0	0,25	
Acide para-aminobenzoïque	0,011	1	
Pyridoxal.HCl	1,8		
Pyridoxine.HCl	0,034	1	0,037
Rétinol (Vitamine E)			inf 0,1
Riboflavine	0,201	0,2	0,131
Thiamine.HCl	2,0	1	0,052
Vitamine A	0,023		
SUPPLEMENTS PF-BDM			
Acide pluronique F-68	1000		
Sélénite de sodium	$6,9.10^{-9}$		
Citrate de fer	122,4		
Ethanolamine	3,05		
SUPPLEMENTS RPMI			
Alanine		8,9	
Albumine bovine		5000	2,5 gm%
$CuSO_4$		$2,49.\ 10^{-3}$	0,02
Insuline bovine		5	6,5 µU/mL
Putrescine		0,161	
Pyruvate de sodium		110	
$FeSO_4.7H_2O$		0,834	
$NaSeO_3.5H_2O$		$1,72.10^{-3}$	
Transferrine		5	
$ZnSO_4$		0,862	
AUTRES COMPOSES présents dans le SVF (Protéines, enzymes…)			
Acide urique			16
Bilirubine			20
Chlorure			99 meq/dl
Créatine			23
γ-Globulines			inf 0,1 %tp
Hémoglobine			30

	Milieu de base (mg/L)		SVF (mg/L)
	PF-BDM	**RPMI**	
IgG			0,1
Lactate deshydrogénase			392 UI/L
Phosphate inorganique			110
Phosphatase alcaline			206 UI/L
Progestérone			0,0013
PTH			56.10^{-6}
Selenium			0,013
Transaminase SGOT			64 UI/L
Transaminase SGPT			4 UI/L

2. Exploitation des résultats cinétiques

2.1 Mode discontinu

2.1.1 Vitesse spécifique de croissance cellulaire

On définit r_x et r_d comme étant les vitesses de production et de décès cellulaires, tandis que X_v est la concentration en cellules viables et X_m la concentration en cellules mortes. Les bilans s'écrivent de la façon suivante :

$$r_x - r_d = \frac{dX_v}{dt} \qquad \text{et} \qquad r_d = \frac{dX_m}{dt}$$

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

$$\mu_{réel} = \frac{r_x}{X_v} \qquad \text{et} \qquad k_d = \frac{r_d}{X_v} \qquad \text{avec} \qquad \mu_{app} = \mu_{réel} - k_d = \frac{1}{X_v} \times \frac{dX_v}{dt}$$

Expérimentalement, la vitesse spécifique de croissance est déterminée à partir des comptages des cellules viables (X_v) et des cellules mortes (X_m). Les valeurs des comptages expérimentaux des cellules viables sont lissées puis interpolées grâce un polynôme d'ordre 3 à 5 à l'aide du logiciel Excel.

2.1.2 Vitesses spécifiques de consommation des substrats et de formation des produits

On définit r_s et r_p comme étant les vitesses de consommation du substrat S et de formation du produit P par unité de volume à un temps t. Les vitesses spécifiques correspondantes sont données par :

$$q_s = \frac{r_s}{X_v} \qquad \text{avec} \qquad r_s = -\frac{dS}{dt}$$

$$q_p = \frac{r_p}{X_v} \qquad \text{avec} \qquad r_p = \frac{dP}{dt}$$

2.2 Mode semi-continu

2.2.1 Vitesse spécifique de croissance

Le bilan de matière, effectué sur les cellules vivantes, en mode semi-continu s'écrit de la manière suivante :

$$V \times (r_x - r_d) = V \times \frac{dX_v}{dt} + X_v \times \frac{dV}{dt} \qquad \text{avec} \qquad \frac{dV}{dt} = Q$$

Q étant le débit du milieu d'alimentation (mL/h)

$$r_x - r_d = \frac{dX_v}{dt} + X_v \times \frac{Q}{V}$$

$$\mu_{réel} - k_d = \mu_{app} = \frac{1}{X_v} \times \frac{dX_v}{dt} + \frac{Q}{V} \qquad \text{avec} \qquad \frac{Q}{V} = D$$

D étant le taux de dilution (h^{-1}).

2.2.2 Vitesses spécifiques de consommation des substrats et de formation des produits

Les vitesses spécifiques de consommation et de production sont données comme suit :

$$q_s = -[\frac{dS}{dt} - D \times (S_0 - S)] / X_v$$

$$q_p = +[\frac{dP}{dt} + D \times (P - P_0)] / X_v$$

S_0 et P_0 étant les concentrations respectives en substrat et en produit dans le milieu d'alimentation.

3. Dosages des métabolites et produits extracellulaires

3.1 Le glucose

Le dosage du glucose est réalisé sur micro-plaques 96 puits à l'aide d'un kit commercial (réf. 510-A, Sigma). Il est basé sur les réactions enzymatiques suivantes :

$$\text{Glucose} + H_2O_2 + O_2 \xrightarrow[\textit{glucose oxydase}]{} \text{acide gluconique} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{o-dianisidine} \xrightarrow[\textit{péroxydase}]{} \text{o-dianisidine oxydée}$$

L'intensité de la coloration brune, mesurée à 450 nm par spectrophotométrie (Multiskan MCC/340, Titertek), est proportionnelle à la concentration de glucose dans l'échantillon. L'erreur sur la mesure est inférieure à 10% (Cherlet, 1995).

3.2 Le lactate

Le dosage du lactate est réalisé sur micro-plaques de 96 puits à l'aide d'un kit enzymatique commercial (réf. 735-10, Sigma). Son principe est le suivant :

$$\text{Lactate} \xrightarrow[\textit{lactate oxydase}]{} \text{pyruvate} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 \xrightarrow[péroxydase]{} H_2O + ½\ O_2 + e^-$$

L'électron libéré réduit un substrat chromogène, qui produit une coloration rose dont l'intensité, mesurée à 540 nm par spectrophotométrie (Multiskan MCC/340, Titertek), est proportionnelle à la concentration en lactate de l'échantillon. L'erreur sur la mesure est comprise entre 10 et 20% (Cherlet, 1995).

3.3 La glutamine

Le dosage est basé sur le dosage de glutamate. Dans un premier temps, la glutamine est transformée en glutamate grâce à une asparaginase. Le glutamate est dosé par méthode enzymatique sur micro-plaque de 96 puits à l'aide d'un kit commercial (réf.139 092, Boehringer Mannheim). Les réactions du dosage du glutamate sont les suivantes :

$$\text{Glutamate} + NAD^+ + H^+ \xrightarrow[\textit{glutamate déshydrogénase}]{} \alpha\text{-cétoglutarate} + NADH + NH_4^+$$

$$INT + NADH + H^+ \xrightarrow[\textit{diaphorase}]{} NAD^+ + \text{formazan}$$

L'apparition de formazan est détectée à 492 nm par spectrophotométrie (Multiskan MCC/340, Titertek). La concentration en glutamine est déterminée par différence, en dosant, d'une part le glutamate seul, et d'autre part, le glutamate et la glutamine après desamination par l'asparaginase (réf. 102 903, Roche). L'erreur sur la mesure est de l'ordre de 20% (Cherlet, 1995).

3.4 Les ions ammonium

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

$$NH_4^+ + OH^- \rightleftharpoons NH_3 + H_2O$$

L'équilibre est déplacé vers la formation d'ammoniac par addition de 3 mL de soude 0,2 N à 3 mL de l'échantillon à analyser. Le pH final du mélange est d'environ 12.

L'ammoniac formé diffuse à travers la membrane perméable de l'électrode et entraîne une variation du potentiel selon la loi de Nernst : $E= E_0\text{-}S.\log [NH_3]$, où E_0 est le potentiel de référence (ordonnée à l'origine) et S est la pente de la courbe d'étalonnage. L'étalonnage est réalisé avec des solutions de NH_4Cl de molarité connue en traçant log $[NH_4Cl]$ en fonction du potentiel de l'électrode (mV). L'erreur sur la mesure est de l'ordre de 10% (Cherlet, 1995).

4. L'interféron-γ

4.1 Quantification de la production d'IFN-γ par test ELISA

La production d'IFN-γ est déterminée par la méthode ELISA, à l'aide d'un kit commercial (réf. DY285, R&D Systems). L'anticorps polyclonal de souris dirigé contre l'IFN-γ humain recombinant est dilué dans une solution de PBS et fixé durant une nuit à 4°C au fond d'une micro-plaque 96 puits (Nunc). Les puits sont ensuite rincés à l'aide d'un tampon de lavage (solution de PBS contenant 0,05% Tween 20 (vol/vol), pH 7,2-7,4). Les sites de fixation non occupés sont saturés durant 1 heure à l'aide d'un tampon de lavage (solution de PBS contenant 1% BSA (m/vol) (FractionV, Bayer) et 5% saccharose (m/vol) (Sigma)). Après trois rinçages, échantillons et standards (IFN-γ humain recombinant dont les concentrations sont comprises entre 15,625 pg/mL et 1 000 pg/mL) sont déposés dans ces puits pour une incubation de 2 heures. La microplaque est rincée trois fois avec le tampon de lavage avant de déposer l'anticorps de chèvre anti-IFN-γ conjugué à la biotine et l'ensemble est incubé pendant 2 heures. Après rinçages, la péroxydase de radis noir (HRP) conjuguée à la streptavidine, est ajoutée au complexe anticorps-antigène précédemment formé pour une durée de 20 minutes. Après lavages, le substrat (mélange d'une solution d'H_2O_2 et d'une solution de tétraméthylbenzidine, ratio 1/1, vol/vol) est ajouté pour une incubation de 20 minutes. La réaction est alors stoppée par ajout d'H_2SO_4 2 N et l'absorbance est mesurée à 450 nm sur le spectrophotomètre Multiskan MCC/340 (Titertek). Les échantillons à doser sont dilués au 1/500^e, 1/1000^e, 1/2000^e et 1/4000^e. L'erreur sur la mesure est de l'ordre de 10%.

4.2 Caractérisation de la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ par western-blot

L'hétérogénéité d'occupation des sites de glycosylation de l'IFN-γ humain recombinant est visualisée par western-blot chimiluminescent.

4.2.1 Electrophorèse des protéines

Les protéines présentes dans les surnageants de culture sont d'abord séparées en fonction de leur taille sur un gel d'électrophorèse d'après la méthode de Laemmli (1970). L'appareil utilisé pour la migration électrophorétique est le Mini-Protean II (Biorad). Ainsi, les protéines sont concentrées grâce un gel d'acrylamide de 5%, puis séparées sur un gel d'acrylamide à 11%. La composition du gel de concentration et du gel de séparation est présentée dans le tableau II.2.

Tableau II.2 : Composition des gels de concentration et de séparation utilisés pour la séparation des différentes glycoformes de l'IFN-γ.

	Gel de concentration (5%)	**Gel de séparation (11%)**
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (mL)	-	2,5
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (mL)	2,5	-
H_2O (mL)	5,6	3,6
Acrylamide-bisacrylamide 30% (mL)	1,7	3,7
SDS 10% (µL)	100	100
Persulfate d'ammonium 10% (µL)	100	100
Temed (µL)	10	10

Les surnageants issus des cultures discontinues de cellules CHO C5 et 320 cultivées dans le milieu RPMI sans sérum et avec sérum sont concentrés sur des membranes de filtration possédant un seuil de coupure de 10 kDa (Nanosep 10K, Pall).

L'albumine bovine sérique, contenue dans le sérum ajouté au milieu RPMI, est éliminée au moyen de systèmes de filtration possédant un seuil de coupure de 50 kDa (Microcon-YM 50K, Fisher Labosi). Le filtrat est ensuite récupéré et concentré sur des membranes de 10 kDa. Les surnageants de culture sont ensuite dilués au 1/3 dans la tampon

de charge (4,8 mL H_2O; 1,2 mL Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 2 mL SDS 10%; 1 mL glycérol; 0,5 mL bleu de bromophénol 0,5%) et déposés sur le gel à raison de 15 µL par puits. Afin de vérifier la séparation des protéines et d'estimer la taille de l'IFN-γ analysé, 5 µL du marqueur de taille commercial précoloré (réf. SM 0671, MBI Fermentas) ainsi que 200 ng d'IFN-γ humain standard non glycosylé (réf. 285-IF, R&D Systems) sont déposés en parallèle sur le même gel de polyacrylamide. La migration se déroule à une intensité constante (25 mA/gel - tension limite 180 V) durant environ 1 heure dans le tampon de migration (glycine 14,4 g/L, Tris-Base 3g/L et SDS 1g/L).

4.2.2 Transfert des protéines sur membrane de PVDF et immunomarquage

Les différentes glycoformes de l'IFN-γ humain recombinant séparées sont, dans un deuxième temps, transférées sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF), puis révélées spécifiquement par immunomarquage (Mols, 2003). La méthode de révélation choisie est la chimiluminescence, en raison de sa grande sensibilité, de l'ordre du nanogramme.

Le transfert est réalisé en milieu liquide sur l'appareillage Mini-Protean II (Biorad). Avant de réaliser le transfert, la membrane de PVDF (Hybond-P, réf. RPN 2020F, Amersham Biosciences) est incubée 15 minutes dans le méthanol, puis 5 minutes dans le tampon de transfert (3 g/L Tris-Base, 14,4 g/L glycine, 20% méthanol, vol/vol). Les éponges et les papiers filtre Whatman sont également imprégnés de tampon de transfert. Lorsque la migration du gel de polyacrylamide est terminée, le gel est incubé à son tour dans le tampon de transfert durant 5 minutes. Le gel et la membrane sont ensuite mis en sandwich entre les éponges et les papiers filtre. Le schéma du montage est présenté sur la figure II.1.

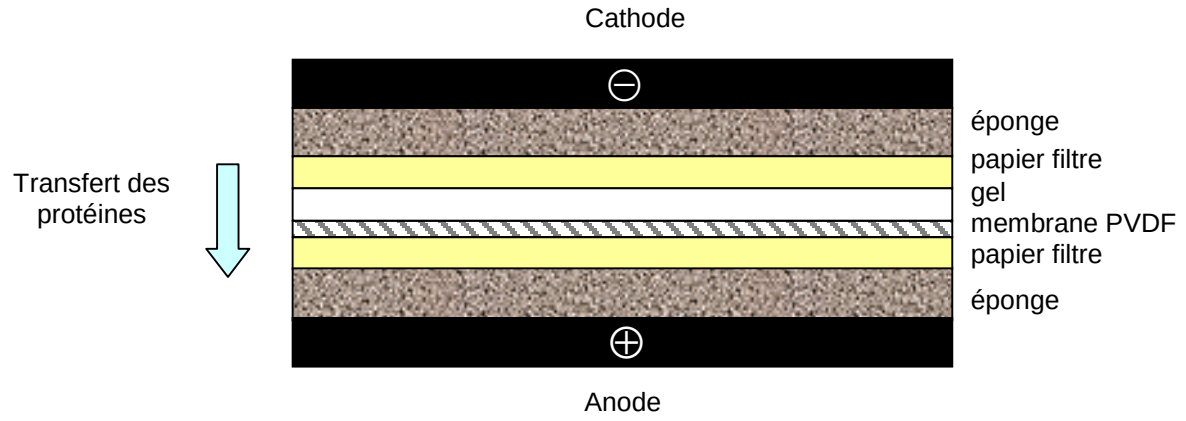


Figure II.1 : Montage utilisé lors du transfert des protéines sur membrane de PVDF.

Le transfert se déroule pendant 20 minutes à tension constante (80 V / intensité limite : 400 mA). L'efficacité du transfert est vérifiée grâce à l'utilisation d'un marqueur de taille précoloré transféré sur la membrane dans les mêmes conditions. La membrane est ensuite incubée successivement dans plusieurs bains sous agitation. Dans un premier temps, elle est saturée par une solution de lait écrémé (5%, m/vol) dans le PSBT (PBS contenant 0,05% Tween20) durant 1 heure 30 minutes à température ambiante. Après trois lavages dans le tampon PSBT, la membrane est incubée durant 1 heure avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-IFN-γ humain (réf. P-700, Endogen) dilué au 1/500^{e} dans le tampon de réaction (solution de PBST contenant 0,5% de lait écrémé (m/vol)). Après trois lavages dans le tampon PBST, la membrane est incubée durant 45 minutes avec l'anticorps de chèvre anti-lapin couplé à la HRP (réf. P0448, Dako), dilué au 1/1000^{e} dans le tampon de réaction. Trois lavages dans le tampon PBST, puis un lavage dans le tampon PBS sont nécessaires avant d'effectuer la révélation. La membrane est incubée 5 minutes avec le mélange de substrats chimiluminescents (Kit ECL Plus, réf. RPN 2132, Amersham Biosciences). La membrane est ensuite placée dans un film plastique transparent avant d'être exposée à un film photosensible, durant environ 1 minute (Hyperfilm ECL 18 × 24 cm, réf. RPN 2103K, Amersham Biosciences). Le film impressionné est plongé dans le liquide révélateur (réf. Kodak AL4, Merck), rincé à l'eau, plongé dans le liquide fixateur (réf. Kodak LX24, Merck) puis rincé à l'eau avant d'être séché. L'analyse densitométrique des films photosensibles est effectuée grâce à l'appareil Versadoc (Biorad) et le logiciel Quantity One (Biorad). Cette analyse est réalisée par la mesure de l'intensité du signal (mesure du nombre et de l'intensité des pixels supérieurs au bruit de fond préalablement déterminé).

4.3 Supplémentation en IFN-γ

L'IFN-γ humain recombinant, utilisé pour les expériences de supplémentation des cultures de cellules CHO, a deux origines. D'une part, il est issu d'un milieu de culture « riche en IFN-γ » et prélevé à la fin d'une culture discontinue de cellules CHO C5, productrices d'IFN-γ. La concentration en IFN-γ présente dans le milieu de culture épuisé et déterminée par test ELISA, est estimée à 450 ng/mL. D'autre part, l'IFN-γ commercial utilisé (réf. 285-IF, R&D Systems) a été produit chez *E. coli* et est en conséquence non glycosylé.
Les marquages au [2-^{3}H] mannose et à la ^{35}S méthionine ont été réalisés selon les protocoles définis dans le paragraphe II.5. Après incubation, l'extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques a été effectuée selon le protocole établi par Cacan et Verbert (1995), et décrit ci-dessous.

5. Caractérisation des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides

5.1 Marquages métaboliques radioactifs

5.1.1 Marquage au [2-^{3}H] mannose

L'utilisation de [2-^{3}H] mannose permet de marquer les intermédiaires lipidiques générés par le cycle des dolichols et incorporant des résidus de mannose (GDP-Man, dol-P-Man, dol-PP-oligosaccharides) ainsi que les glycoprotéines néosynthétisées.

4.10^{6} cellules vivantes sont prélevées du flacon de Roux ou du flacon agité et sont centrifugées 5 minutes à 800 tr/min. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est lavé avec 5 mL de milieu RMPI dépourvu de glucose (5 minutes, 800 tr/min). Après centrifugation, le culot cellulaire est remis en suspension dans le milieu de marquage. La composition du milieu de marquage est la suivante : 900 µL de milieu RPMI 1640 sans glucose (Sigma) et sans sérum, contenant 10 mM d'Hepes, 14 µM de mannose froid et 4 mM de glutamine. A ce mélange sont ajoutés 100 µCi (7 µM) de [2-^{3}H] mannose (réf. TRK364, Amersham Biosciences). L'incubation des cellules dans le milieu de marquage est effectuée durant 1 heure à 37°C dans un tube eppendorf ouvert.

Après incubation, les cellules sont centrifugées 5 minutes à 800 tr/min et le surnageant est éliminé. Le culot cellulaire est alors lavé par 1 mL d'une solution de PBS froid (5 minutes, 800 tr/min). Le surnageant est éliminé et au culot cellulaire sont successivement ajoutés

300 µL de mélange d'arrêt (IgG 10% (m/vol) préparées au laboratoire à partir du lait, 5 mM de $MgCl_2$ (Carlo-Erba), 0,1 M de cacodylate de sodium (Prolabo) pH 7,4) et 800 µL de méthanol (SDS). Les cellules sont remises en suspension dans ce mélange, puis transférées dans un tube à extraction dans lequel sont ajoutés 1,2 mL de chloroforme (Across). Les proportions finales des différents solvants (chloroforme, méthanol et phase aqueuse) sont ainsi de 3/2/1 (vol/vol/vol), le volume de la phase aqueuse étant estimé à 100 µL. L'ensemble est mélangé vigoureusement, puis centrifugé durant 5 minutes à 1 000 tr/min. Ainsi, la centrifugation conduit à l'obtention de trois phases distinctes (figure II.2) :

- la phase supérieure aqueuse (fraction OSRM), contenant les éléments les plus polaires comme les nucléotides-sucres (GDP-Man), les monosaccharides libres, les oligosaccharides libres ($OSGn_1$ et $OSGn_2$).
- l'interphase, contenant le matériel insoluble, et regroupant les protéines néosynthétisées et les dol-PP-oligosaccharides (fraction Chloroforme/Methanol/Water, CMW).
- la phase inférieure organique (fraction Chloroforme/Methanol, CM), contenant les précurseurs lipidiques de petite taille comme le dol-P-Man, le dol-P-Glc, le dol-PP-Glc et le dol-PP-$GlcNAc_2$.

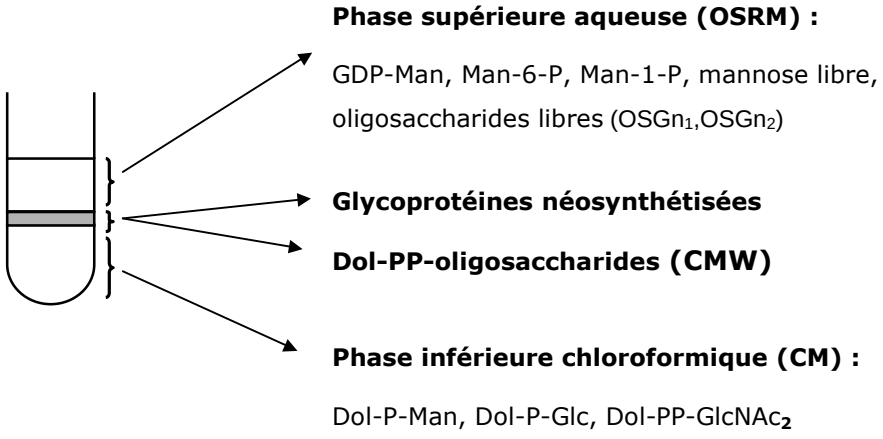


Figure II.2 : Composition en espèces oligosaccharidiques des différentes phases obtenues lors du protocole d'extraction séquentielle selon Cacan et Verbert (1995)

5.1.2 Protocole d'extraction séquentielle

L'extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques est effectuée selon le protocole mis au point par Cacan et Verbert (1995). Son principe est basé sur la différence de solubilité des produits générés par le cycle des dolichols. Les différentes étapes du protocole d'extraction sont présentées sur la figure II.3.

Après centrifugation, la phase inférieure (CM) est récupérée puis extraite deux fois par 1,5 mL de PIT (phase inférieure théorique, chloroforme/méthanol/$MgCl_2$ (4 mM), 85/14/1, vol/vol/vol). Les phases obtenues à l'issue des trois extractions (CM_1, CM_2 et CM_3) sont rassemblées dans un même tube pour les comptages de radioactivité et les analyses ultérieures.

La phase supérieure (OSRM) est également extraite deux fois par 3 mL de PST (phase supérieure théorique, chloroforme/méthanol/$MgCl_2$ 10 mM dans l'eau, 3/48/2, vol/vol/vol). Les phases obtenues à l'issue des trois extractions ($OSRM_1$, $OSRM_2$ et $OSRM_2$) sont également rassemblées dans un même tube en vue d'effectuer les comptages de radioactivité et les analyses ultérieures.

L'interphase restante, renfermant les glycoprotéines et les dol-PP-oligosaccharides (fraction CMW), est dans un premier temps lavée six fois par 3 mL de PST. Dans un deuxième temps, les dol-PP-oligosaccharides sont extraits trois fois par 1,5 mL du mélange chloroforme/méthanol/eau (10/10/3, vol/vol/vol). Les phases CMW_1, CMW_2 et CMW_3 sont rassemblées dans un même tube pour les comptages de radioactivité et les analyses ultérieures.

La radioactivité est mesurée à l'aide d'un liquide à scintillation Ultima Gold (Perkin Elmer) et d'un compteur à scintillation (LS6000TA, Beckman). L'erreur sur la mesure est d'environ 12% pour un marquage au [2-^{3}H] mannose.

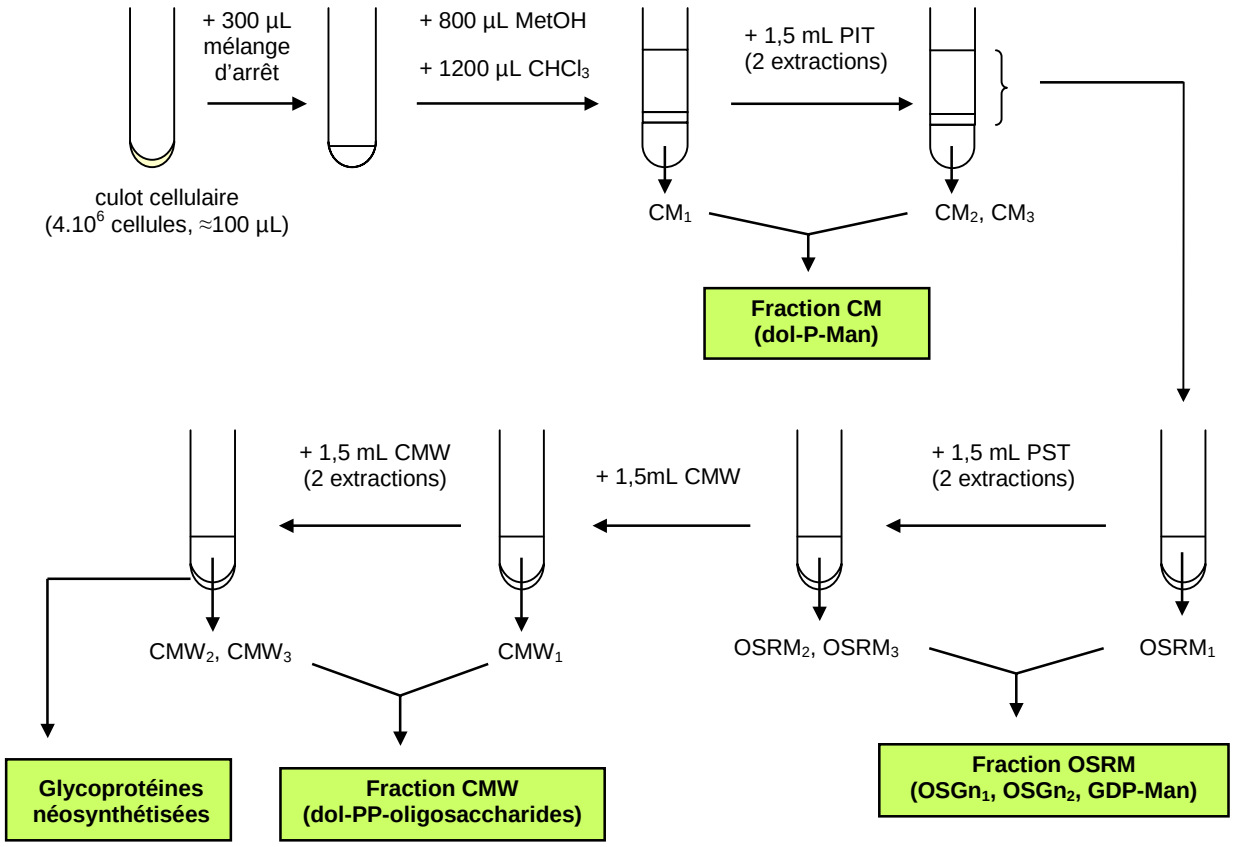


Figure II.3 : Protocole d'extraction séquentielle des différents intermédiaires lipidiques (d'après Cacan et Verbert, 1995).
PIT : phase inférieure théorique, PST : phase supérieure théorique, CMW : chloroforme/méthanol/eau (10/10/3).

5.1.2.1 Fraction CM

La radioactivité présente dans la fraction CM, contenant notamment le dol-P-Man, est directement mesurée sur un aliquot de 100 µL.

5.1.2.2 Fraction OSRM

La fraction contenant les oligosaccharides libres ($OSGn_1$, $OSGn_2$ et GDP-Man) est séchée sous un flux d'azote jusqu'à atteindre un volume de 1 mL environ. Les oligosaccharides libres sont ensuite purifiés sur colonne de Biogel P2 (diamètre de la colonne 1 cm x 50 cm - taille des billes : 45 à 90 µm - zone de fractionnement : 100 à 1800

kDa; Biorad). L'élution des glycannes est réalisée par l'acide acétique 5% (Prolabo) avec un débit de 12 mL/h. Cette étape permet l'élimination des précurseurs radiomarqués de petite taille (mannose libre, Man-6-P, Man-1-P) par tamisage moléculaire. Les fractions contenant les oligosaccharides libres (matériel exclu du gel) sont récupérées par comptage de la radioactivité (prise d'essai de 100 µL). Les fractions d'intérêt sont rassemblées dans un ballon et séchées à sec sur un évaporateur rotatif (Büchi), en présence de mannose froid (Sigma) (10 µL d'une solution de concentration 1 mM) afin d'éviter l'adsorption non spécifique sur le verre. Le ballon est lavé par 500 µL d'acétonitrile/H_2O (70/30, vol/vol), puis les 500 µL récupérés sont transférés dans un tube en verre et séchés à sec sous un flux d'azote. Les oligosaccharides libres sont repris dans 50 µL d'acétonitrile/H_2O (70/30, vol/vol) pour être injectés en CLHP couplée à un détecteur de radioactivité.

5.1.2.3 Fraction Protéines

Au culot protéique sec sont ajoutés 300 µL d'une solution contenant 1 mg/mL de trypsine bovine (réf. T8003, Sigma) dans un tampon 100 mM de bicarbonate d'ammonium pH 7,9. Ainsi, les protéines sont hydrolysées durant 1 heure à 37°C. Une prise d'essai de 20 µL permet de mesurer la radioactivité incorporée dans cette fraction. Afin d'inactiver l'enzyme, le mélange réactionnel est incubé durant 10 minutes à 100°C puis séché à sec sous un flux d'azote.

100 µL de tampon phosphate de sodium 20 mM, pH 7,5, EDTA 50 mM et 0,5 µL (500 mU) de PNGase F (isolée de *Flavobacterium meningosepticum*, New England Biolabs) sont alors ajoutés pour effectuer l'hydrolyse de la partie glycannique. L'incubation est réalisée à 37°C durant 16 heures. Les glycannes sont ensuite purifiés sur colonne de Biogel P2 : après élution, les fractions contenant les glycannes sont repérées par comptage de la radioactivité (prise d'essai de 50 µL) et les fractions d'intérêt sont rassemblées dans un ballon et séchées à sec sur un évaporateur rotatif. Le ballon est lavé par 500 µL d'acétonitrile/H_2O (70/30, vol/vol) puis les 500 µL récupérés sont transférés dans un tube et séchés à sec sous un flux d'azote. Les glycannes sont alors repris dans 50 µL d'acétonitrile/H_2O (70/30, vol/vol) pour être injectés en CLHP couplée à un détecteur de radioactivité.

5.1.2.4 Fraction CMW

La fraction CMW, contenant les dol-PP-oligosaccharides, est séchée à sec sous un flux d'azote. L'hydrolyse des dol-PP-oligosaccharides est effectuée par 9 mL d'une solution de tétrahydrofuranne anhydre (THF) (Prolabo) contenant 0,1 M d'HCl (83 µL d'une solution HCl 12 M) et 1 mL d'eau. Le mélange réactionnel est incubé durant 2 heures à 55°C. Cette réaction d'hydrolyse permet d'éliminer la partie lipidique (dol-PP) associée aux structures glycanniques. Les oligosaccharides sont ensuite séchés à sec sous un flux d'azote puis repris dans environ 1 mL d'acide acétique 5%. Ces produits sont purifiés sur colonne de Biogel P2 : après élution, les fractions contenant les glycannes sont repérées par comptage de la radioactivité (100 µL) puis séchées à sec sous un flux d'azote. Les oligosaccharides sont alors repris dans 50 µL d'acétonitrile/H_2O (70/30, vol/vol) pour l'injection en CLHP couplée à un détecteur de radioactivité.

5.1.3 Analyse des structures glycanniques par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur de radioactivité

La séparation des oligosaccharides s'effectue par chromatographie de partage entre la phase mobile et la phase stationnaire constituée de silice, sur laquelle sont greffés des groupements NH_2. Les composés les plus hydrophiles sont retenus tandis que les composés hydrophobes sont exclus de la colonne. La rétention de l'oligosaccharide augmente avec le degré de polymérisation (nombre de groupement hydroxyl). L'élution des oligosaccharides neutres s'effectue par un gradient d'acétonitrile et d'eau.

L'appareillage consiste en un système de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) à gradient (Spectra-Physics P1500) équipé d'une colonne de type amino Asahipak NH_2P-50 (250 mm × 4,6 mm, Asahi). L'élution s'effectue au moyen d'un gradient composé d'acétonitrile/eau allant de 70 /30 (vol/vol) à 50/50 en 90 minutes, avec un débit de 1 mL/min. La détection s'effectue en continu par mesure de la radioactivité de l'éluat grâce à un détecteur β-Flo-one (Packard) en scintillation liquide. L'injection de l'échantillon s'effectue au moyen d'une vanne rhéodyne, comportant une boucle d'échantillonnage de volume 50 µL. Les différentes espèces oligomannosidiques sont identifiées en fonction de leur temps de rétention, par comparaison avec des oligosaccharides standards, préparés au laboratoire. Le $Man_2GlcNAc_2$ standard a été isolé à partir des dol-PP-oligosaccharides

provenant de cellules CHO B3F7. Le $Man_4GlcNAc_2$, le $Man_5GlcNAc_2$ et le $Glc_1Man_5GlcNAc_2$ standards ont été obtenus à partir de cellules CHO Lec15 (Duvet *et al*., 2000). Le $Man_6GlcNAc_2$ et le $Man_7GlcNAc_2$ standards ont été obtenus par digestion partielle d'oligomannosides par la mannosidase cytosolique (Duvet, communication personnelle). Le $Man_8GlcNAc_2$, le $Man_9GlcNAc_2$ et le $Glc_1Man_9GlcNAc_2$ standards ont été obtenus à partir de cellules CHO MI8-5 (Cacan *et al*., 2001). Enfin, le $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ standard a été obtenu à partir de cellules CHO Lec23 (Ray *et al*., 1991).

5.1.4 Marquage des protéines néosynthétisées à la ^{35}S méthionine

L'utilisation de la ^{35}S méthionine permet de marquer spécifiquement les protéines néosynthétisées. Les cellules CHO (5.10^5 cellules) sont prélevées et centrifugées durant 5 minutes à 800 tr/min. Le culot cellulaire est lavé par 5 mL de milieu RPMI 1640 sans méthionine (Sigma) (5 minutes, 800 tr/min). Le surnageant est ensuite éliminé et les cellules sont remises en suspension dans le milieu de marquage de composition suivante : 980 µL de milieu RPMI 1640 sans sérum, dépourvu de méthionine, contenant 10 mM d'Hepes et 4 mM de glutamine. 20 µCi de ^{35}S Méthionine (réf. SJ1015, Amersham Biosciences) sont ajoutés au mélange pour réaliser le marquage des protéines. Les cellules sont incubées durant 1 heure à 37°C en tube eppendorf ouvert. Après incubation, les cellules sont lavées par 1 mL de PBS (5 minutes, 800 tr/min) et les protéines néosynthétisées sont précipitées par une solution d'acide trichloroacétique (ATCA)/acide phosphotungstique (PTA) sur membrane en fibre de verre. La radioactivité est mesurée à l'aide d'un liquide à scintillation (Ultima Gold, Perkin Elmer) et d'un compteur à scintillation (LS6000TA, Beckman). L'erreur sur la mesure est d'environ 22% pour un marquage à la ^{35}S méthionine.

5.1.5 Précipitation des protéines sur membrane en fibre de verre

Après incubation, les cellules sont lavées par 1 mL de PBS froid, puis lysées par 200 µL d'une solution PBS contenant 1% de SDS (m/vol). Les protéines intracellulaires sont alors précipitées par ajout d'1 mL d'une solution d'HCl 2 M contenant 0,6% (m/vol) de PTA (Across) et 12% (m/vol) d'ATCA (Across). Le précipité est filtré sur membranes en fibres de verre (Whatman, GF/A). Cette étape de filtration permet d'éliminer des petites molécules telles les nucléotides-sucres, le mannose libre marqué, et de retenir les glycoprotéines

radiomarquées sur la membrane. Les membranes sont placées sur une couronne de filtration (réf. XX2702550, Millipore) et lavées par une solution d'ATCA 10% (m/vol). Les échantillons sont ensuite déposés sur la membrane. Après filtration, les membranes sont lavées successivement par une solution d'ATCA 10%, de l'eau, puis de l'éthanol. Après ce dernier lavage, les membranes sont séchées durant 2 minutes dans une étuve à 100°C. La radioactivité présente sur la membrane est ensuite mesurée.

5.2 Analyse des glycannes associés aux précurseurs oligosaccharidiques par « *Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis* »

La méthode d'analyse par *Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis* (FACE) permet de séparer, par électrophorèse sur gel, des structures oligosaccharidiques, préalablement marquées avec un fluorophore. Naturellement, les sucres ne sont pas fluorescents. Il est donc nécessaire d'effectuer une réaction de dérivatisation. Le marqueur fluorescent utilisé est le 8-aminonaphtalène-1,3,6-sulfonate (ANTS). Les oligosaccharides possédant une extrémité réductrice terminale (résidu GlcNAc) réagissent avec le groupement amine primaire du fluorophore en formant une base de Schiff. La stoechiométrie de la réaction est telle qu'une molécule d'ANTS se lie à une seule molécule d'oligosaccharide. La liaison est ensuite stabilisée par l'ajout de cyanoborohydrure de sodium, qui permet la réduction du produit sous forme d'amine secondaire. Les oligosaccharides dérivés peuvent être séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, puis détectés et quantifiés grâce à l'émission de fluorescence.

5.2.1 Extraction, hydrolyse et purification des glycannes associés aux précurseurs oligosaccharidiques

3.10^7 cellules CHO sont prélevées dans le bioréacteur pour être centrifugées durant 5 minutes à 800 tr/min. Le surnageant est éliminé et au culot cellulaire sont ajoutés successivement 300 µL d'eau, 800 µL de méthanol et 1,2 mL de chloroforme. L'ensemble est mélangé vigoureusement, puis soumis au protocole d'extraction séquentielle détaillé précédemment.

Les glycannes portés par les dol-PP-oligosaccharides obtenus à l'issu du protocole d'extraction sont ensuite hydrolysés par 9 mL d'une solution de THF anhydre contenant

0,1 M d'HCl (83 µL d'une solution HCl 12 M) et 1 mL d'eau. Le mélange réactionnel est incubé pendant 2 heures à 55°C. Les dol-PP-oligosaccharides hydrolysés sont séchés à sec sous un flux d'azote et repris dans 1 mL d'acide acétique 5%. Ils sont ensuite purifiés sur colonne de graphite (Extract-clean columns carbograph, 150 mg / 4 mL, Alltech).

5.2.2 Dérivatisation des standards et des échantillons par le marqueur fluorescent (ANTS)

Des solutions de maltooligosaccharides (G20) à 12 mg/mL (kit de dérivation APTS des oligosaccharides, Beckman), de maltotétraose (DP4) à 10 mg/mL (Sigma) et de maltoheptaose (DP7) à 10 mg/mL (Sigma) sont utilisés comme standards. Ces marqueurs de taille sont constitués de polymères de glucose de poids moléculaires croissants, et ne différent entre eux que par une unité de glucose.

Les solutions standards (20 µL de G20, 5 µL de DP4 et 10 µL de DP7) sont séchées à sec sous un flux d'azote puis repris par 5 µL d'une solution d'ANTS 0,15 M (Research Organics) dans l'acide acétique/eau (3/17, vol/vol) et 5 µL d'une solution de $NaCNBH_4$ 1 M (Sigma) dans le DMSO (Prolabo). Le mélange est alors incubé pendant 16 heures à 37°C et à l'obscurité. Après incubation, le DMSO est évaporé sous un flux d'azote, et les glycannes sont remis en solution dans 100 µL de tampon d'échantillon (glycérol/eau : 1/4, vol/vol). Un protocole de marquage identique est effectué avec les glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides, extraits des cellules CHO.

5.2.3 Electrophorèse des structures glycanniques dérivatisées

La séparation des différents glycannes est effectuée en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 30%. La composition des gels de concentration et de séparation est présentée dans le tableau II.3. L'appareillage utilisé pour la migration électrophorétique est le système Mini-Protean II (Biorad).

Tableau II.3 : Composition des gels de concentration et de séparation utilisés pour la séparation électrophorétique des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides.

	Gel de concentration (4%)	**Gel de séparation (30%)**
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (mL)	-	1,25
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (mL)	0,625	-
H_20 (mL)	1,41	-
Acrylamide-bisacrylamide 40% (mL)	0,46	3,75
Persulfate d'ammonium 10% (µL)	25	25
Temed (µL)	2,5	10

10 µL de standards G20, DP4 et DP7 et la totalité des échantillons sont déposés sur le gel de polyacrylamide. La migration est effectuée durant environ 1 heure dans le tampon de migration (3 g/L Tris-Base, 14,4 g/L glycine) sous une intensité constante (15 mA/ gel).

5.2.4 Détection et quantification des glycannes marqués

Les bandes fluorescentes sont détectées sous une lumière UV grâce à un appareillage équipé d'une caméra CDD (Transilluminator 2000, Biorad). La quantification des bandes est effectuée grâce au logiciel Quantity One (Biorad) L'intégration des bandes est réalisée au moyen de la mesure de l'intensité du signal (mesure du nombre et de l'intensité des pixels supérieure au bruit de fond préalablement déterminé).

6. Analyse des nucléotides et nucléotides-sucres intracellulaires par chromatographie liquide à haute performance de paire d'ions

6.1 Extraction des nucléotides et nucléotides-sucres intracellulaires à l'acide perchlorique

L'analyse des contenus intracellulaires en nucléotides et nucléotides sucres a été effectuée d'après le protocole adapté de la méthode de Ryll et Wagner (1991).
2.10^6 à 4.10^6 cellules viables sont prélevées dans le bioréacteur et immédiatement centrifugées (4°C, 800 tr/min). Le surnageant est éliminé, et 185 µL d'une solution froide

d'acide perchlorique 0,5 M (Labosi) sont ajoutés au culot cellulaire, puis mélangés vigoureusement. Le mélange est placé pendant 2 minutes dans la glace, puis centrifugé (4°C, 10 000 g). Le surnageant est alors neutralisé par 42 µL d'une solution froide de K_2HPO_4 1,5 M (Fluka) contenant 2,5 M de KOH (Fluka). Le surnageant neutralisé est centrifugé (4°C, 10 000 g) afin d'éliminer le précipité de perchlorate de potassium, puis est filtré (0,2 µm, Millipore). Les échantillons sont stockés à -70°C jusqu'à l'analyse chromatographique.

6.2 Analyse par chromatographie liquide à haute performance de paire d'ions

La séparation des nucléotides et nucléotides-sucres est réalisée par CLHP de paire d'ions. L'agent d'appariemment utilisé dans notre cas est le tétrabutylammonium bisulfate, qui de par sa nature amphiphile, interagit, d'une part, avec la silice hydrophobe (colonne C18) et, d'autre part, avec les bases puriques et pyrimidiques hydrophiles. L'association des molécules est donc due à des interactions électrostatiques et hydrophobes.

Les analyses ont été réalisées sur le système CLHP Waters, composé d'un passeur automatique (Wisp 712), une pompe à gradient basse pression (module 600E) et d'un détecteur UV (Lambda-Max 481). La colonne Alltima C18 (taille des particules 3 µm, 150 mm × 4,6 mm, Alltech) associée une pré-colonne (taille des particules 3 µm, 7,5 mm × 4,6 mm, Alltech) est utilisée pour effectuer la séparation des nucléotides et nucléotides-sucres. La détection des molécules est réalisée à une longueur d'onde de 254 nm. La colonne est placée dans un four thermostaté à 40°C et les échantillons à analyser sont placés à 4°C.

Deux tampons ont été utilisés pour le gradient : le tampon A (tampon phosphate 0,1 M (Fluka) contenant 8 mM de tétrabutylammonium bisulfate (Sigma), pH6) et le tampon B (tampon A + 30% de méthanol (Carlo-Erba) (vol/vol), pH6). Les tampons sont préparés extemporanément, filtrés sur des filtres 0,2 µm avant chaque analyse chromatographique. Ces tampons sont également dégazés avec de l'hélium. Le gradient utilisé est le suivant : 100% de tampon A pendant 5 minutes, puis un gradient linéaire de tampon B de 0 à 77 % pendant 27 minutes. Un gradient linéaire de tampon B de 77% à 100% est ensuite appliqué pendant 5 minutes, suivi d'un maintien à 77% de tampon B durant 5 minutes. 0% de tampon B sont maintenus durant 1 minute, puis 100% de tampon A durant 10 minutes. La vitesse

d'écoulement est fixée à 1 mL/min. La durée d'une analyse chromatographique est de 47 minutes.

Avant chaque analyse sont injectés 30 µL d'une solution de mélange standard (20 µM de chaque molécule, 600 pmol injectées). Ce mélange se compose de treize molécules (Sigma) : adénosine 5'-monophosphate (AMP) sodique, adénosine 5'-diphosphate (ADP) sodique, adénosine 5'-triphosphate (ATP) disodique, cytidine 5'-triphosphate (CTP) disodique, guanosine 5'-diphosphate (GDP) sodique, guanosine 5'-triphosphate (GTP) sodique, guanosine 5'-diphosphate-D-mannose (GDP-Man) sodique, uridine 5'-diphosphate (UDP) sodique, uridine 5'-triphosphate (UTP) trisodique, uridine 5'-diphospho-D-glucose (UDP-Glc) disodique, uridine 5'-diphospho-D-galactose (UDP-Gal) disodique, uridine 5'-diphospho-*N*- acétyl-D-glucosamine (UDP-GlcNAc) sodique, uridine 5'-diphospho-*N*- acétyl-D-galactosamine (UDP-GalNAc) disodique.

Lorsque la série d'analyse est terminée, la colonne est lavée durant 30 minutes avec de l'eau puis durant 15 minutes avec un mélange eau/méthanol (50/50, vol/vol). Lorsqu'elle n'est pas utilisée, la colonne est stockée dans le mélange eau/méthanol (50/50, vol/vol).

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre III

INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE SUR LA MACROHETEROGENEITE DE LA GLYCOSYLATION DE L'IFN-γ AU COURS DE CULTURES DISCONTINUES DE CELLULES CHO

CHAPITRE III. INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE SUR LA MACROHETEROGENEITE DE LA GLYCOSYLATION DE L'IFN-γ AU COURS DE CULTURES DISCONTINUES DE CELLULES CHO

Les cellules CHO constituent un hôte privilégié pour la production de glycoprotéines à visée thérapeutique. En effet, celles-ci sont dotées d'une machinerie cellulaire leur permettant de réaliser des modifications post-traductionnelles très proches de celles retrouvées sur les protéines humaines naturelles, et tout particulièrement la N-glycosylation.

La glycoprotéine modèle de notre étude est l'IFN-γ humain recombinant. Cette cytokine possède deux sites potentiels de N-glycosylation. La variation d'occupation des sites de glycosylation correspond à la macrohétérogénéité de la glycosylation. Dans le cas de l'IFN-γ, la protéine peut ainsi être glycosylée sur deux sites (glycoforme 2N), un site (glycoforme 1N) ou aucun site (glycoforme 0N). Or, au cours d'un procédé de culture en mode discontinu, la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ humain recombinant, produit par des cellules CHO, varie au cours du temps. En effet, en début de culture, la proportion de molécules glycosylées sur deux sites est généralement de 60-70%, environ 30% de l'IFN-γ sont monoglycosylés, et environ 10% d'IFN-γ ne sont pas glycosylés. Lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance, 40 à 50% des molécules d'IFN-γ produites sont totalement glycosylés, alors que 30 à 40% sont glycosylés sur un site et que 20 à 30% sont non glycosylés (Curling *et al*, 1990; Hayter *et al*., 1991, 1992; Castro *et al*. 1995; Lamotte, 1997; Xie *et al*., 1997; Goldman *et al*., 1998; Yuk et Wang, 2002).

D'un point de vue industriel, il est essentiel de produire, tout au long du procédé, une glycoprotéine de qualité constante, c'est-à-dire un mélange de glycoformes dans des proportions identiques. De plus, la présence des chaînes N-glycanniques revêt une importance capitale pour l'activité biologique de certaines glycoprotéines (Jenkins et Curling, 1994 ; Cumming, 1991). Bien que l'IFN-γ soit actif sous forme non glycosylée, sa glycosylation favorise sa dimérisation, sa sécrétion (Sareneva *et al*., 1994), sa résistance aux protéases (Sareneva *et al*., 1995) et sa demie-vie circulatoire (Sareneva *et al*., 1994). Ainsi, l'IFN-γ non glycosylé présente des atouts biologiques moindres.

De façon à produire un IFN-γ humain recombinant présentant un profil de glycosylation constant au cours d'une culture discontinue de cellules CHO, il est nécessaire d'identifier les facteurs susceptibles d'influencer la glycosylation, ainsi que les mécanismes

biochimiques mis en jeu dans ce processus. La glycosylation peut être influencée par l'environnement extracellulaire (Goochee et Monica, 1990), et en particulier la composition du milieu de culture (Nyberg *et al*., 1999; Castro *et al*., 1995; Jenkins et Curling, 1994). Les conditions de culture peuvent modifier le métabolisme cellulaire, et par conséquent affecter le processus de glycosylation intracellulaire. Bien que la glycosylation des protéines ait fait l'objet de nombreux travaux ces dernières années, peu de données sont actuellement disponibles quant au suivi, au cours du temps, de l'évolution de la macrohétérogénéité de la glycosylation des glycoprotéines recombinantes. De plus, dans le cas de l'IFN-γ, les causes de l'évolution de la variation d'occupation des sites de glycosylation de l'IFN-γ produit au cours d'une culture discontinue de cellules CHO n'ont, jusqu'à présent, jamais pu être déterminées avec certitude car les mécanismes cellulaires conduisant à la production de variants de glycosylation pour une même protéine demeurent à l'heure actuelle très peu connus.

Ainsi, avant de procéder à l'analyse de différents précurseurs intracellulaires impliqués dans le processus de N-glycosylation, l'influence de la composition du milieu de culture sur la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ a, dans un premier temps, été étudiée. Pour cela, des cultures discontinues de cellules CHO productrices d'IFN-γ ont été mises en oeuvre dans trois milieux de culture différents : le milieu RPMI sans sérum, le milieu RPMI avec sérum (10%) et le milieu PF-BDM. La composition du milieu RPMI sans sérum a été optimisée par Castro *et al*. (1992) et contient notamment de l'albumine, de l'insuline, de la transferrine et des éléments minéraux. Le milieu PF-BDM est un milieu sans sérum et sans protéines, beaucoup plus riche que le précédent, tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif (Schneider, 1989). Ce milieu contient en particulier des vitamines, des cofacteurs, des précurseurs de nucléotides et des éléments minéraux. Au regard de la composition de chaque milieu de culture, un classement peut être établi dans la richesse de la composition des milieux de culture utilisés dans notre étude : le milieu PF-BDM est plus riche que le milieu RPMI avec sérum, lui-même plus riche que le milieu RPMI sans sérum (Tableau II.1 du chapitre II).

L'étude physiologique et cinétique comparée des deux lignées cellulaires CHO C5 et 320 dans les différents milieux de cultures a été réalisée à travers le suivi de plusieurs paramètres, à savoir la croissance et le décès cellulaires, la production d'IFN-γ, la consommation de substrats (glucose et glutamine) et la production de métabolites (lactate et ions ammonium).

1. Etude cinétique et physiologique des lignées CHO 320 et C5 cultivées en mode discontinu dans différents milieux de culture

Deux lignées de cellules CHO productrices d'IFN-γ ont été utilisées pour réaliser notre étude : la lignée CHO C5 et la lignée CHO 320. La lignée CHO 320 a été transfectée avec l'ADNc codant l'IFN-γ humain. La lignée CHO C5 résulte de la transfection de la lignée CHO 320 productrice d'IFN-γ avec l'ADNc codant une α2,6 sialyltransférase. Les deux lignées ont été adaptées à la culture en suspension. Les lignées cellulaires ont été propagées en flacons agités avant de réaliser les cultures en bioréacteurs de 4 L dans les différents milieux de culture.

1.1 Cinétique de croissance et de décès cellulaires

1.1.1 Densité cellulaire

L'évolution des concentrations en cellules viables et en cellules mortes, au cours des cultures discontinues, est présentée sur la figure III.1. La densité d'ensemencement de chacune des quatre cultures est voisine de 2.10^5 cellules/mL.

En milieu RPMI sans sérum, la densité cellulaire maximale est atteinte après 70 heures de culture ($5{,}6.10^5$ cellules/mL) alors que la viabilité cellulaire diminue de 50% après 80 heures de culture. En présence de sérum, la densité cellulaire maximale est plus élevée (8.10^5 cellules/mL) et est atteinte plus tardivement, au bout de 105 heures de culture. La phase de latence est plus longue (40 heures) dans cette culture, ce qui retarde la concentration cellulaire maximale et prolonge ainsi la durée de la culture. C'est avec le milieu PF-BDM que la densité cellulaire maximale est la plus importante, en particulier avec la lignée CHO 320 ($9{,}2.10^5$ cellules/mL). De même, la densité cellulaire atteint 7.10^5 cellules/mL après 80 heures de culture pour les cellules CHO C5, une valeur un peu plus élevée que lorsque ces mêmes cellules sont cultivées en milieu RPMI sans sérum.

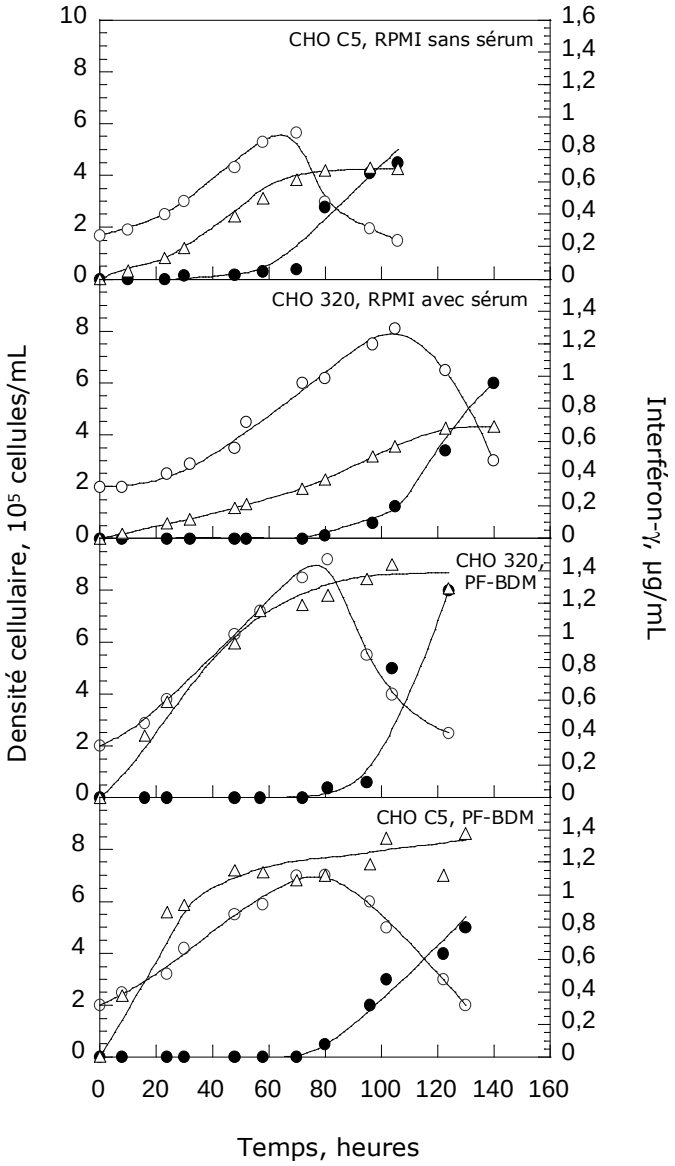


Figure III.1 : Cinétique de croissance et de décès cellulaires et de production d'interféron-γ au cours de cultures discontinues de cellules CHO C5 et 320 cultivées en milieu RPMI, avec et sans sérum, et en milieu PF-BDM (cellules viables : ○, cellules mortes : ●, IFN-γ : △).

1.1.2 Vitesse spécifique de croissance cellulaire

En milieu RPMI sans sérum, la vitesse spécifique de croissance cellulaire maximale μ_{max} est de 0,028 h^{-1} après 24 heures de culture (figure III.2). Lorsque la culture est effectuée en présence de sérum, μ_{max} est un peu plus élevée, et atteint 0,035 h^{-1} après 52 heures de culture. Ces valeurs sont comparables à celles que l'on peut trouver dans la littérature : la lignée non recombinée CHO K1, de laquelle dérive la lignée CHO 320, présente une μ_{max} de

0,04 h^{-1} contre 0,022 h^{-1} pour la lignée CHO 320 cultivée dans le même milieu (Leelavatcharamas *et al*., 1994). En milieu PF-BDM, les vitesses spécifiques maximales de croissance sont significativement augmentées, en particulier pour les cellules CHO C5. En effet, μ_{max} atteint une valeur de 0,038 h^{-1} après 26 heures de culture et 0,05 h^{-1} après 30 heures de culture pour les cellules CHO 320 et C5 respectivement (figure III.2).

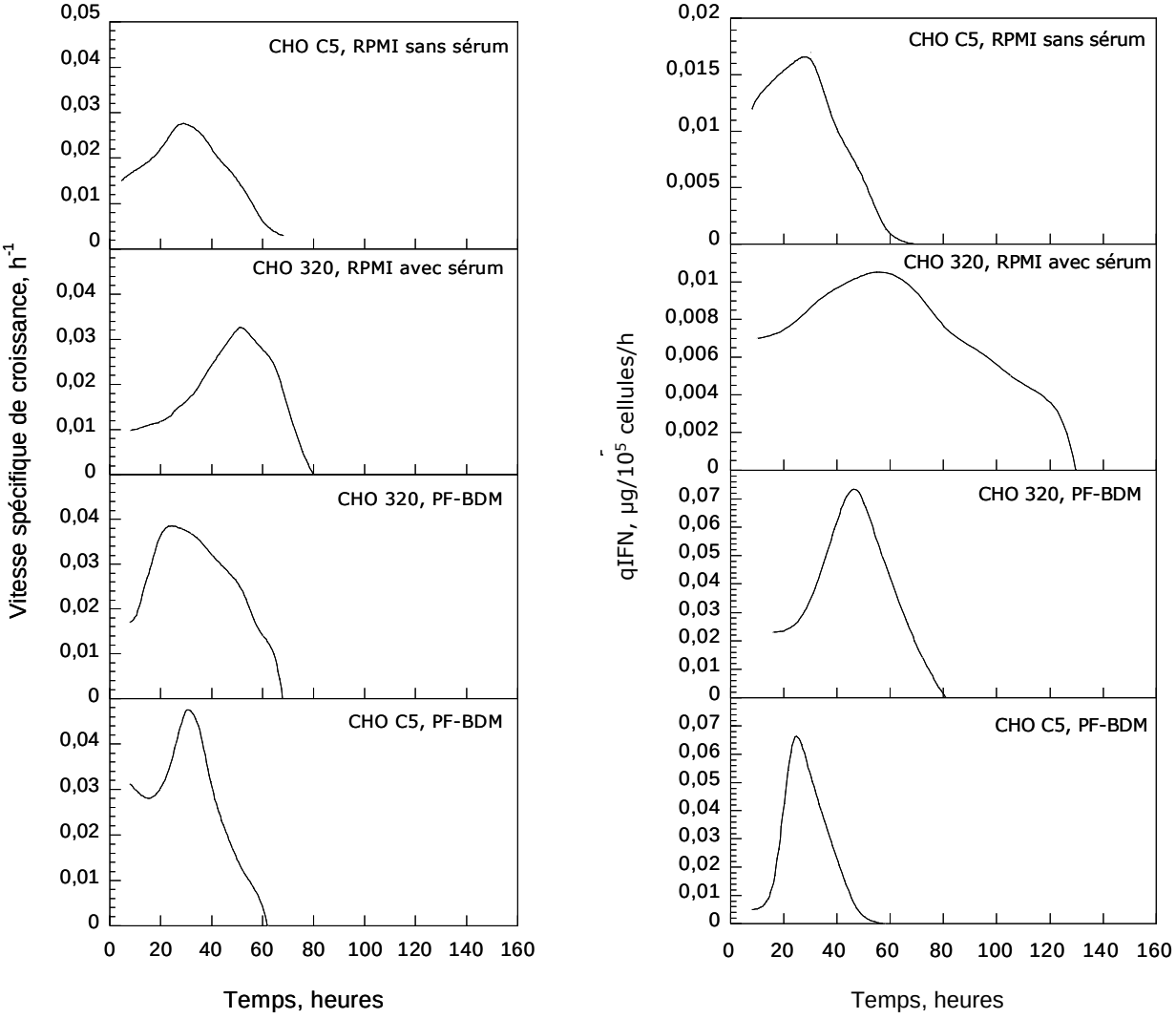


Figure III.2 : Vitesses spécifiques de croissance cellulaire et de production d'interféron-γ au cours des cultures discontinues de cellules CHO C5 et 320 cultivées en milieu RPMI, avec et sans sérum, et en milieu PF-BDM.

1.2 Cinétique de production d'IFN-γ

La figure III.1 présente les résultats concernant la production d'IFN-γ au cours des cultures discontinues effectuées dans les différents milieux de culture. La production d'IFN-γ recombinant est associée à la croissance. Les concentrations maximales en IFN-γ sont

comparables en milieu RPMI avec et sans sérum, et voisines de 0,7 µg/mL en fin de culture. La vitesse spécifique maximale de production d'IFN-γ est de 0,017 µg/10^5 cellules/h à 24 heures et de 0,01 µg/10^5 cellules/h à 52 heures pour les cellules CHO C5 en milieu RPMI sans sérum et les cellules CHO 320 en milieu RPMI avec sérum (figure III.2).

En milieu PF-BDM, la production d'IFN-γ est augmentée d'un facteur 2 pour atteindre des concentrations maximales proches de 1,4 µg/mL (figure III.2). Les vitesses spécifiques maximales de production d'IFN-γ sont fortement augmentées puisqu'elles sont multipliées par un facteur 6,5 pour atteindre 0,075 µg/10^5 cellules/h (48 heures) et 0,072 µg/10^5 cellules/h (24 heures) pour les cellules CHO 320 et C5 respectivement (figure III.2).

La relation entre la quantité d'IFN-γ produit et la quantité de cellules, durant les quatre cultures discontinues, est présentée sur la figure III.3. Le rendement de production d'IFN-γ ($Y_{IFN/cellule}$), exprimé en µg/10^5 cellules, est plus important en milieu PF-BDM (0,2 à 0,25 µg/10^5 cellules) qu'en milieu RPMI, avec ou sans sérum (0,1 à 0,16 à µg/10^5 cellules).

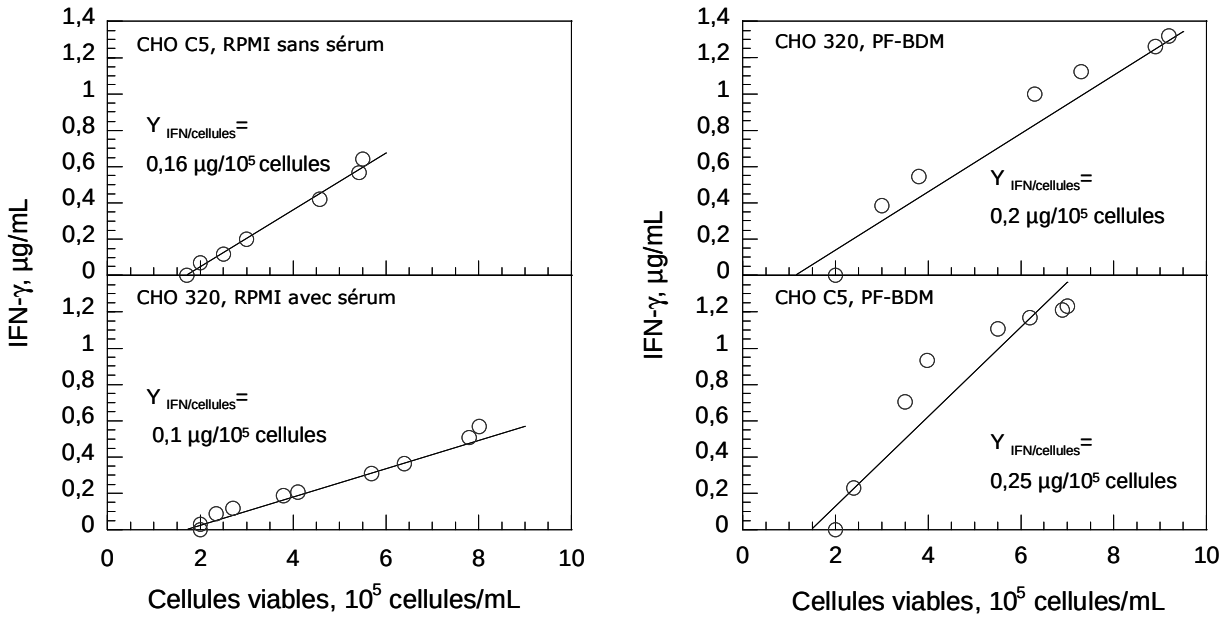


Figure III.3 : Relation entre la croissance cellulaire et la concentration en IFN-γ durant les cultures discontinues de cellules CHO C5 et 320, cultivées en milieu RPMI avec et sans sérum, et en milieu PF-BDM.

1.3 Cinétique de consommation de glucose et de production de lactate

1.3.1 Consommation du glucose

La concentration initiale en glucose est de 20 mM pour chacune des quatre cultures discontinues. Le glucose constituant la principale source de carbone, sa concentration décroît parallèlement à la croissance cellulaire (figure III.4). En milieu RPMI avec et sans sérum, le glucose n'est pas totalement consommé puisqu'en fin de culture, sa concentration est de 8 et 5 mM respectivement. Le glucose n'est donc pas limitant pour la croissance cellulaire.

Les vitesses spécifiques maximales de consommation du glucose (q glc) sont identiques dans ces deux conditions (0,041 et 0,043 µmol glc/10^5 cellules/h). En milieu PF-BDM, le glucose est presque entièrement consommé puisque sa concentration en fin de culture est de 1,8 et 3 mM pour les cellules CHO 320 et C5 respectivement. Les vitesses spécifiques maximales de consommation du glucose sont proches de celles obtenues en milieu RPMI, avec et sans sérum, puisqu'elles sont égales à 0,041 et 0,055 µmol/10^5 cellules/h respectivement. La croissance s'arrête alors que le glucose est encore présent dans le milieu suggérant que ce substrat n'est pas limitant pour la croissance cellulaire.

1.3.2 Production de lactate

Le lactate provient de la conversion glycolytique du glucose (Zen et Deckwer, 1995). Il est le produit de la réduction d'une partie du pyruvate formé au cours de la glycolyse. En milieu RPMI sans sérum, la concentration maximale en lactate est de 12 mM alors qu'en présence de sérum, le lactate est produit à raison de 25 mM en fin de culture. En milieu PF-BDM, les concentrations finales en lactate sont de 25 et 29 mM pour les cellules CHO 320 et C5 respectivement (figure III.4).

Il semble difficile d'établir une relation entre la concentration en lactate et l'arrêt de la croissance cellulaire car la sensibilité des cellules à l'effet inhibiteur de croissance du lactate varie en fonction de la lignée considérée et des conditions de culture utilisées. En effet, Hayter *et al*. (1991) ont montré que la croissance des cellules CHO pouvait être inhibée par le lactate, à des concentrations supérieures à 17,5 mM. Pour Schlaeger et Schumpp (1989), il faut des concentrations en lactate bien plus élevées, voisines de 90 à 110 mM, pour diminuer de 50% la croissance des cellules CHO. Goergen *et al*. (1992) ont montré que des concentrations en

lactate de l'ordre de 50 mM ne produisaient pas d'effet toxique sur la croissance d'hybridomes. Quant à Lao et Toth (1997), ils ont observé qu'une concentration en lactate de 30 mM n'a pas d'effet sur la vitesse spécifique de croissance des cellules CHO.

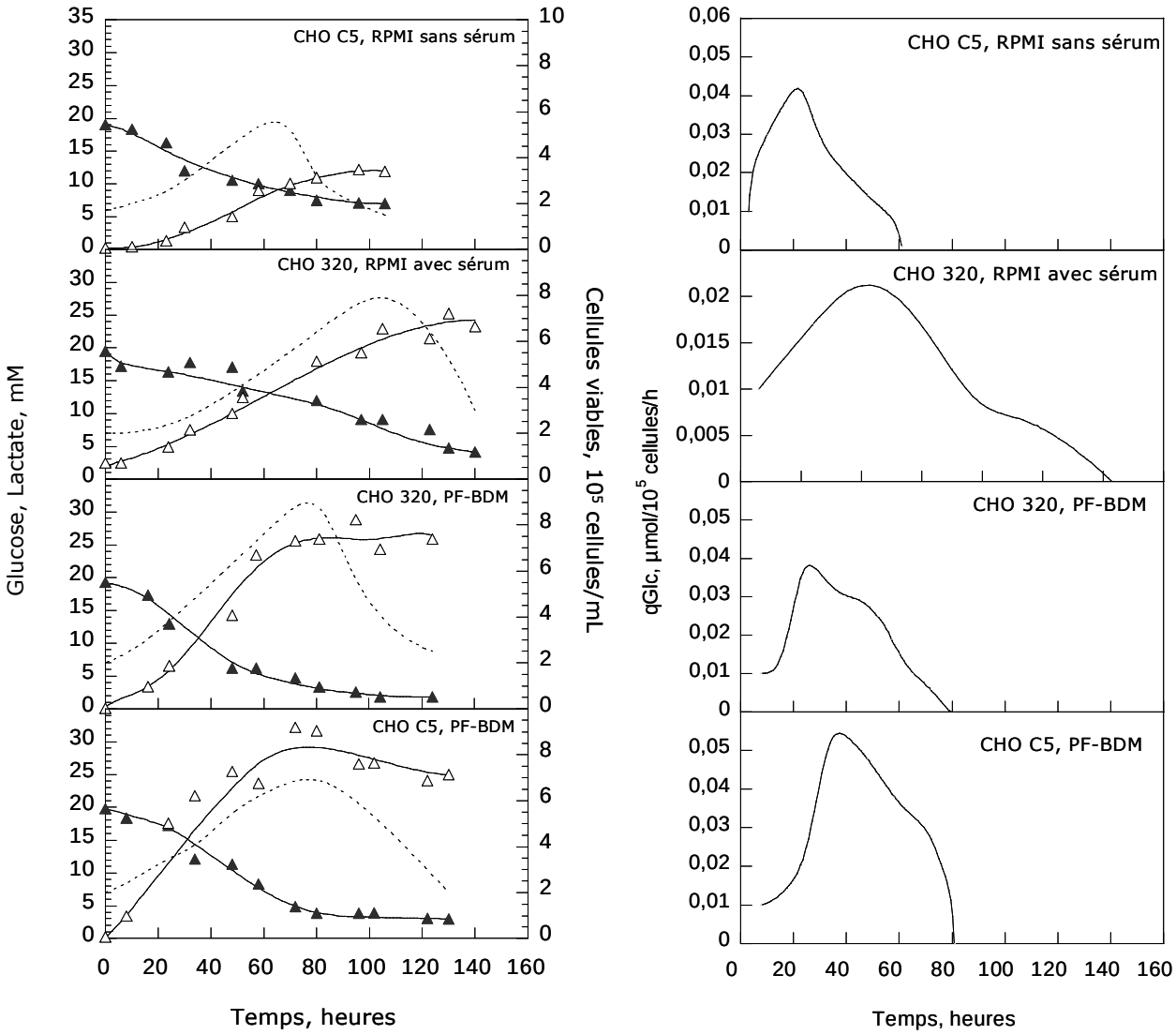


Figure III.4 : Cinétiques de consommation du glucose et de production du lactate au cours de cultures discontinues de cellules CHO C5 et 320 cultivées en milieu RPMI avec et sans sérum, et en milieu PF-BDM. (glucose : ▲, lactate : △, cellules viables : ⋯⋯).

On peut également définir le rendement de conversion glycolytique ($Y_{lac/glc}$) exprimé en moles de lactate produit par moles de glucose consommées. La valeur théorique maximale du rendement $Y_{lac/glc}$ est égale à 2, mais classiquement, le rendement $Y_{lac/glc}$ atteint des valeurs comprises entre 1,5 et 2. Dans nos conditions de culture, les rendements calculés $Y_{lac/glc}$ sont de l'ordre de 1,6-1,8 mole/mole pour toutes les cultures à l'exception de la culture réalisée en milieu RPMI sans sérum, pour laquelle le rendement $Y_{lac/glc}$ est plus faible et

proche de 1 (figure III.5). Ainsi, seulement 50% du glucose est converti en lactate dans le cas de la culture réalisée en milieu RPMI sans sérum, alors que dans les autres conditions de culture, 75% du substrat glucidique est converti en lactate. Ces résultats traduisent une faible efficacité d'utilisation de la source énergétique que constitue le glucose. Le métabolisme des cellules transformées est différent de celui des cellules primaires : en effet, les cellules modifiées génétiquement montrent des flux glycolytique et glutaminolytique généralement plus élevés que les cellules parentales. Il en résulte alors une production accrue de lactate et d'ions ammonium (McKeehan, 1982). Les cellules animales transformées convertissent une grande partie du glucose consommé en lactate, ce qui apparaît comme une utilisation peu efficace de la source d'énergie disponible (Petch et Butler, 1994). Nielsen *et al*. (1992) ont montré que les cellules animales ne sont pas limitées par la production d'énergie mais plutôt par le taux de biosynthèse et ajustent leur métabolisme énergétique dans ce but. Par ailleurs, l'accumulation de lactate dans les lignées cellulaires pourrait être liée à des déficiences enzymatiques aux points de connexion entre la glycolyse et le cycle de Krebs au niveau du complexe pyruvate deshydrogénase, de la phosphoénolpyruvate carboxykinase et de la pyruvate carboxylase (Fitzpatrick *et al*., 1993; Neermann et Wagner, 1996; Petch et Butler, 1994). Certaines de ces enzymes nécessitant de l'oxygène, il est intéressant de souligner que les cellules cultivées en milieu RPMI avec sérum et en milieu PF-BDM proliféraient sous forme d'agrégats. L'accumulation de lactate pourrait ainsi s'expliquer par des limitations en oxygène dans les agrégats cellulaires, favorisant la production de lactate à partir du glucose.

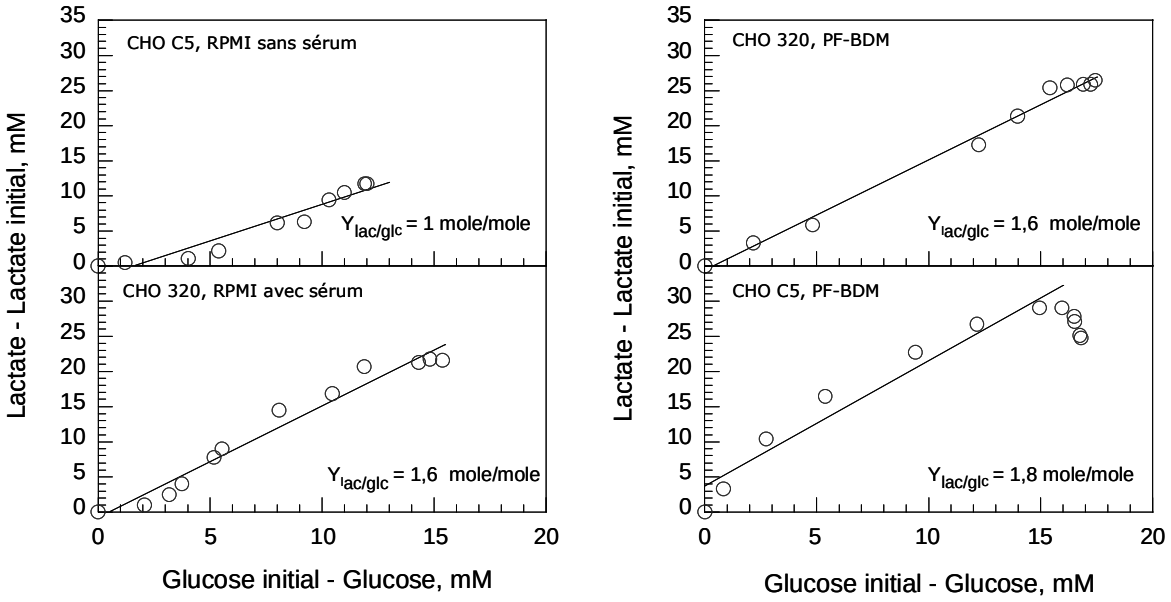


Figure III.5 : Rendements de conversion glucose-lactate ($Y_{lac/glc}$) lors des cultures discontinues de cellules CHO 320 et C5, cultivées en milieu RPMI avec et sans sérum, et en milieu PF-BDM.

1.4 Cinétique de consommation de la glutamine et de production d'ions ammonium

1.4.1 Consommation de la glutamine

La concentration initiale en glutamine dans le milieu de culture est de 4 mM. Tout comme le glucose, sa concentration décroît parallèlement à la croissance cellulaire (figure III.6). En milieu RPMI avec et sans sérum, la glutamine n'est pas totalement consommée, mais reste néanmoins faible en fin de culture (0,6 mM et 0,8 mM). Les vitesses spécifiques maximales de consommation de la glutamine (q gln) sont proches de 0,06 µmol/10^5 cellules/h sans sérum et 0,035 µmol/10^5 cellules/h en présence de sérum. En revanche, la glutamine est totalement consommée en milieu PF-BDM. L'annulation de la concentration en glutamine coïncide avec l'arrêt de la croissance cellulaire, suggérant que cet acide aminé est susceptible d'être limitant pour la croissance cellulaire dans ce milieu de culture. Quant aux vitesses spécifiques maximales de consommation de la glutamine, elles sont de l'ordre de 0,08 et 0,1 µmol/10^5 cellules/h pour les cellules CHO 320 et C5 respectivement.

1.4.2 Production d'ions ammonium

Les ions ammonium s'accumulent au cours de la culture et leurs concentrations, en fin de culture, sont comparables, quel que soit le milieu de culture considéré, puisqu'elles sont comprises entre 3,5 et 4 mM (figure III.6). Cette accumulation peut avoir un impact négatif sur la croissance cellulaire, en modifiant notamment le pH intracellulaire (Martinelle et Häggström, 1993). Cependant, il semble que l'effet inhibiteur des ions ammonium sur la croissance cellulaire se manifeste pour concentrations supérieures à celles que nous mesurons dans notre étude. En effet, Hayter *et al*. (1991) ont montré que les ions ammonium étaient susceptibles d'inhiber la croissance des cellules CHO 320 pour des concentrations supérieures à 4,5 mM. Schlaeger et Schumpp (1989) ont également observé une réduction de 50% de la croissance des cellules CHO, mais lorsque les ions ammmonium atteignent des concentrations de l'ordre de 8 à 10 mM.

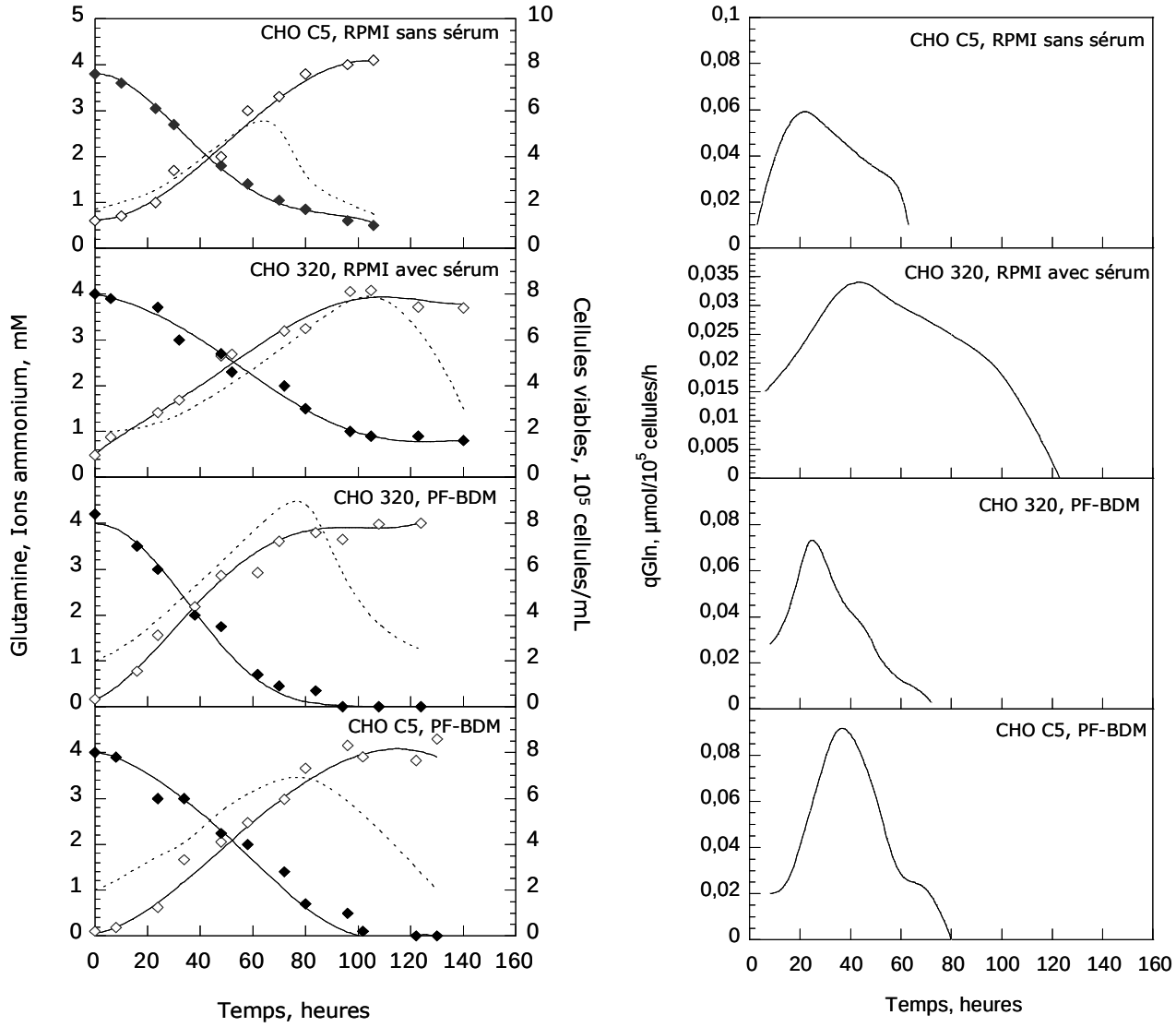


Figure III.6 : Cinétiques de consommation de la glutamine et de production d'ions ammonium au cours de cultures discontinues de cellules CHO C5 et 320, cultivées en milieu RPMI avec et sans sérum, et en milieu PF-BDM (glutamine : ◆, ions ammonium : ◇ , cellules viables : ·····).

D'autre part, le rendement de conversion de moles d'ions ammonium produites par moles de glutamine consommées ($Y_{NH4/gln}$) est proche de 1, quelle que soit la culture considérée (figure III.7). La valeur théorique maximale du rendement $Y_{NH4/gln}$ est égale à 1, mais généralement, le rendement $Y_{NH4/gln}$ est voisin de valeurs comprises entre 0,5 et 1.

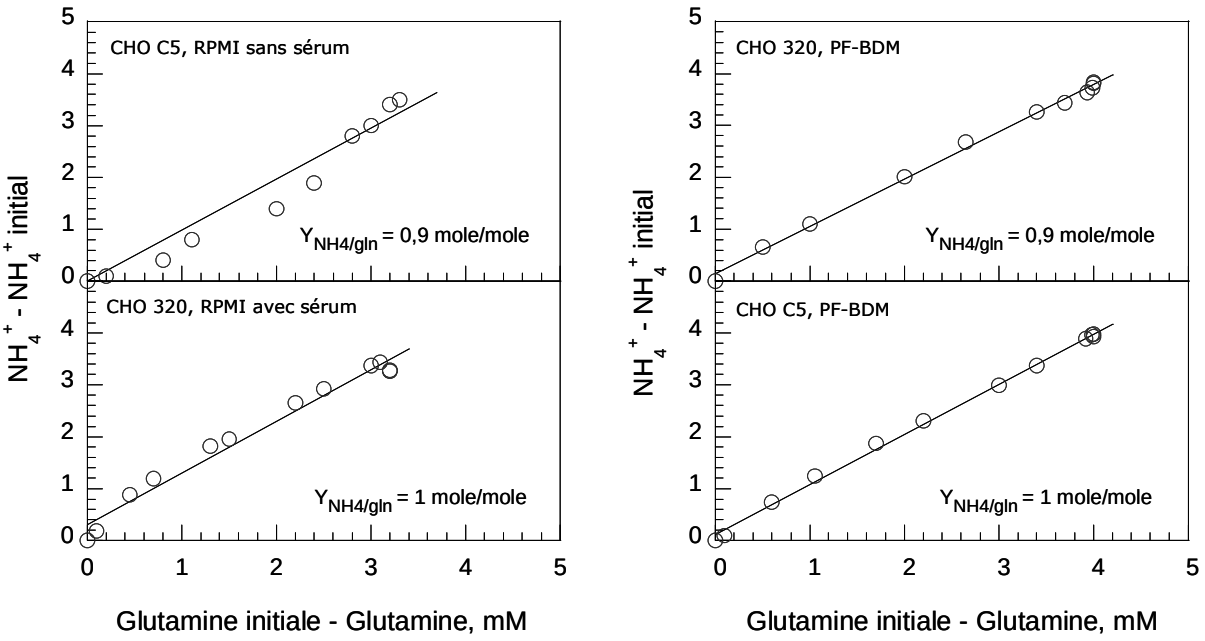


Figure III.7 : Rendements de conversion glutamine-ions ammonium ($Y_{NH4/gln}$) lors des cultures discontinues de cellules CHO C5 et 320, cultivées en milieu RPMI avec et sans sérum, et en milieu PF-BDM.

2. Macrohétérogénéité de la glycosylation de l'interféron-γ

L'IFN-γ humain possède deux sites potentiels de N-glycosylation, localisés au niveau des résidus Asn 25 et 97. Ainsi, la protéine peut être glycosylée sur deux sites (glycoforme 2N), un site (glycoforme 1N) ou aucun site (glycoforme 0N) (Rinderknecht *et al.*, 1994). Dans le cas de la glycoforme 1N, c'est l'Asn 25 qui est glycosylée dans 90% des cas, probablement parce que l'Asn 97 présente un encombrement stérique moins favorable à la fixation d'une structure glycannique (James *et al.*, 1995).

La variation d'occupation des sites de glycosylation de l'IFN-γ (macrohétérogénéité) peut être mise en évidence par électrophorèse capillaire (Lamotte, 1997; James *et al.*, 1994), mais également par électrophorèse sur gel (Lamotte, 1997). Par ailleurs, les différentes glycoformes de l'IFN-γ peuvent être séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes puis révélées à l'aide d'anticorps spécifiques (Mols *et al.*, 2003). Cette méthode est sensible puisque le seuil de détection de l'ordre du nanogramme. De plus, elle ne nécessite aucune d'étape préalable de purification de la glycoprotéine. La macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ a été caractérisée par cette méthode durant notre étude. Les trois glycoformes de l'IFN-γ, visualisées au cours d'une culture

discontinue de cellules CHO C5 cultivées en milieu RPMI sans sérum, sont présentées sur la figure III.8. La glycoforme 2N correspond à une masse de 23-27 kDa, la glycoforme 1N à 19-21 kDa et la glycoforme 0N à 15-17 kDa. La présence de bandes plus ou moins larges pour une même glycoforme peut être attribuée à la variation de la structure des glycannes fixés sur un même site (microhétérogénéité). Sur la piste correspondant à l'IFN-γ standard, la bande de 35 kDa correspond à des dimères d'IFN-γ et celle à 15 kDa correspond à des monomères d'IFN-γ non glycosylés. En effet, le standard utilisé a été produit chez la bactérie *E. coli*, hôte qui n'autorise pas la glycosylation des protéines.

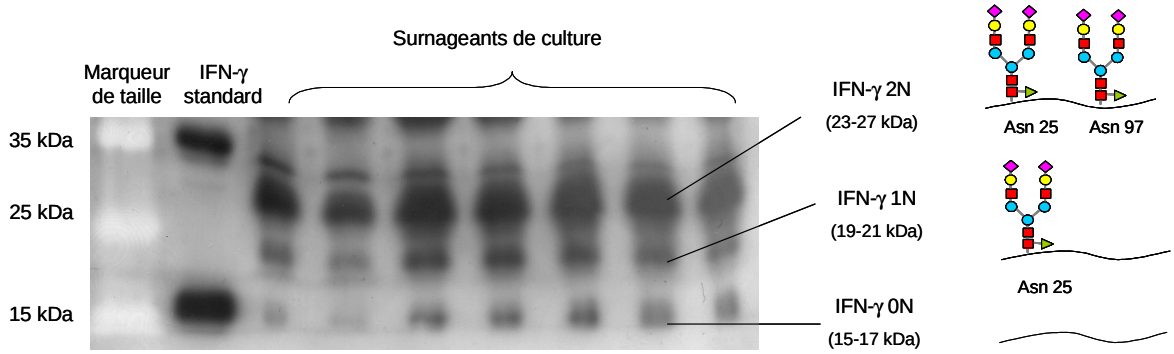


Figure III.8 : Visualisation par western-blot de la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ humain recombinant produit au cours d'une culture discontinue de cellules CHO C5 cultivées en milieu RPMI sans sérum.

Afin de s'assurer que les bandes détectées et visualisées sur le film photosensible correspondent bien aux différentes glycoformes de l'IFN-γ, une digestion enzymatique par une peptide-N-glycosidase (PNGase) a été réalisée sur les surnageants de culture de cellules CHO. Cette enzyme permet de déglycosyler les glycoprotéines. Le résultat d'un traitement à la PNGase d'un surnageant issu d'une culture de cellules CHO 320, cultivées en milieu RPMI avec sérum, a été visualisé par western-blot chimiluminescent (figure III.9). En présence de PNGase, les bandes correspondant aux glycoformes 2N et 1N de l'IFN-γ ne sont plus visibles, confirmant ainsi la spécificité de la détection réalisée par western-blot. Les trois bandes de 15 à 17 kDa, correspondant à la glycoforme 0N, semblent témoigner de l'hétérogénéité de structure de la chaîne polypeptidique de l'IFN-γ. En effet, Castro *et al*. (1995) ont avancé l'hypothèse d'une dégradation de la protéine par l'attaque de protéases présentes initialement dans le sérum. En outre, l'intégrité de la protéine pourrait également être altérée suite à l'action de protéases intra- ou extracellulaires synthétisées par les cellules (Gawlitzek *et al*., 1995b; Kratje *et al*., 1994).

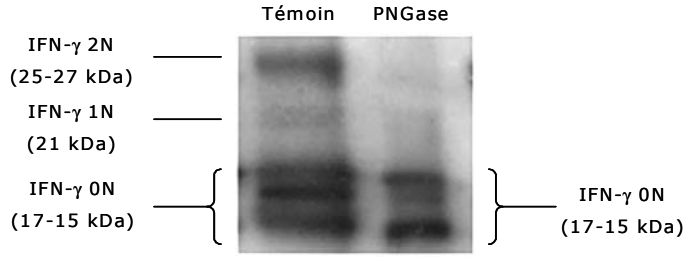


Figure III.9 : Visualisation par western-blot des différentes glycoformes de l'IFN-γ, avant et après digestion enzymatique de l'IFN-γ par la PNGase.

L'analyse densitométrique des films photosensibles impressionnés permet de suivre, au cours d'une culture, l'évolution de la proportion de chacune des trois glycoformes. Ainsi, la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ a été caractérisée au cours de cultures discontinues de cellules CHO C5 et 320, cultivées dans différents milieux de culture, à savoir le milieu RPMI avec et sans sérum, et le milieu PF-BDM. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure III.10.

Pour chacune des cultures, on distingue la présence des trois glycoformes de l'IFN-γ. En milieu RPMI sans sérum, la glycoforme 2N est présente majoritairement tout au long de la culture. En début de culture, 60% de l'IFN-γ sont doublement glycosylés, 25% sont mono-glycosylés et 10% sont non glycosylés. Toutefois, ce profil de glycosylation évolue au bout d'environ 40 heures de culture, vers une diminution du pourcentage de glycoformes 2N au profit d'une augmentation du pourcentage de glycoformes 0N. Ceci se traduit par des proportions de l'ordre de 45% (2N), 30% (1N) et 35% (0N) en fin de culture.

La présence de sérum dans le milieu de culture RPMI n'empêche pas le phénomène de sous-glycosylation observé en milieu RPMI sans sérum. En effet, au bout d'environ 50 heures de culture, une chute de la proportion de glycoformes 2N se produit également puisque d'une proportion de 72% en début de culture, elle chute à 38% en fin de culture. De façon concommittante, on observe une augmentation des proportions d'IFN-γ mono- et non glycosylé, qui atteignent respectivement 29% et 32% en fin de culture. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Lamotte (1997).

En revanche, lorsque les cellules CHO C5 et 320 sont cultivées dans le milieu PF-BDM, le profil de glycosylation de l'IFN-γ demeure constant tout au long de la culture discontinue. Les proportions des glycoformes 2N, 1N et 0N sont comparables dans les deux cultures et sont maintenues respectivement à des valeurs voisines de 65%, 10% et 25%.

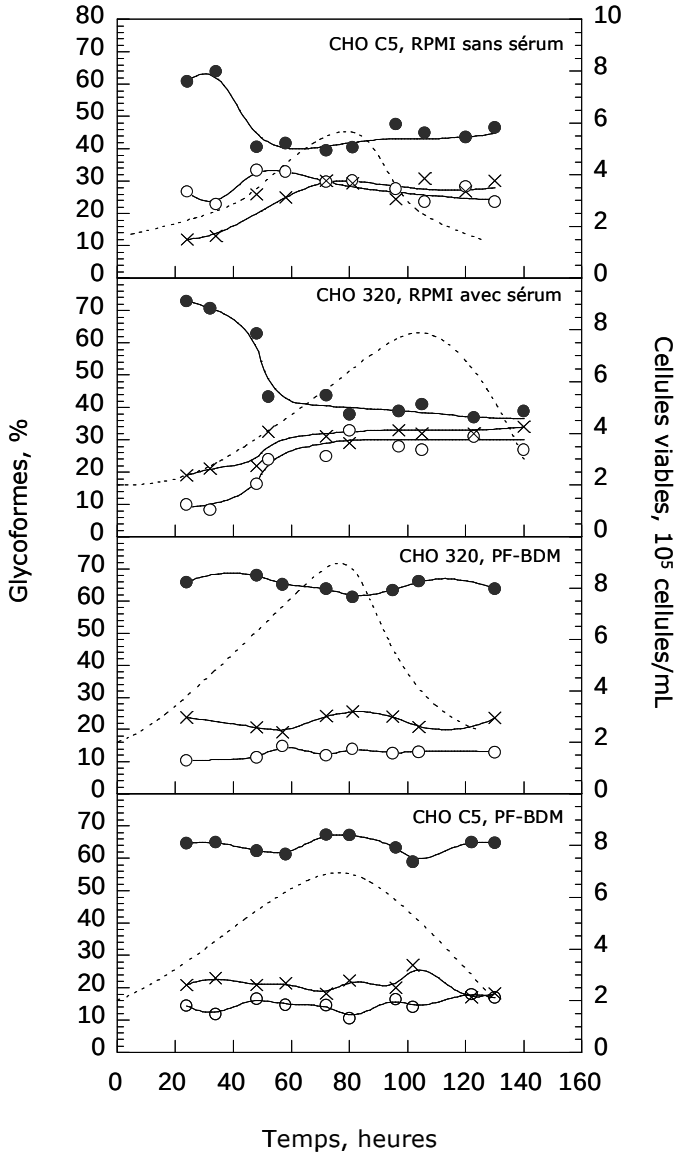


Figure III.10 : Evolution de la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'interféron-γ au cours de cultures discontinues de cellules CHO C5 et 320, cultivées en milieu RPMI, avec et sans sérum, et en milieu PF-BDM (IFN-γ biglycosylé : ●, IFN-γ monoglycosylé : ○, IFN-γ non glycosylé : ×, concentration en cellules viables : ·····).

3. Discussion

La macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ humain recombinant n'est pas constante au cours d'une culture discontinue de cellules CHO. En effet, la proportion de molécules glycosylées sur deux sites chute en milieu RPMI sans sérum, après environ 40 heures de culture, alors que les cellules ont atteint leur vitesse spécifique maximale de croissance. La présence de sérum dans le milieu de culture (10%) n'empêche pas la diminution de l'occupation des sites de glycosylation de la protéine recombinante. Ces résultats confirment ainsi les travaux antérieurs réalisés au laboratoire (Lamotte, 1997).

La variation de la glycosylation intervient exclusivement durant la phase de croissance. Or, les concentrations de plusieurs éléments nutritifs et métabolites évoluent au cours de cette période. Dans la mesure où les conditions de culture peuvent influer sur le métabolisme cellulaire et mener à des motifs de glycosylation différents (Maiorella *et al*., 1993; Goochee et Monica, 1990), il est fort probable que l'évolution de la composition du milieu de culture, au cours de la phase de croissance, puisse être la cause de la modification de la distribution des glycoformes de l'IFN-γ.

Les facteurs responsables du déclin de la glycosylation n'ont, jusqu'à présent, pas clairement été identifiés. Néanmoins, des travaux ont été conduits pour expliquer la diminution de la glycosylation, mais en particulier dans des conditions de limitation en glucose. En effet, l'épuisement de cet élément nutritif pourrait influencer la synthèse des précurseurs oligosaccharidiques (dol-PP-oligosaccharides) en induisant une synthèse de glycannes tronqués (Chapman et Calhoun, 1988), expliquant alors la diminution de la glycosylation par une diminution du transfert des structures glycanniques tronquées sur les protéines en voie de synthèse. Hayter *et al*. (1992) ont également montré que la proportion d'IFN-γ biglycosylé, produit par des cellules CHO 320, était inférieure lors d'une culture continue limitée en glucose en comparaison avec une culture discontinue. Dans notre cas, pour les quatre cultures réalisées, la concentration initiale en glucose a été fixée à 20 mM, afin de pallier une potentielle limitation en glucose. Lorsque la glycosylation de l'IFN-γ diminue en milieu RPMI sans sérum, après environ 40 heures de culture, la concentration en glucose dans le milieu extracellulaire est de l'ordre de 10-15 mM. Ainsi, ce substrat ne semble pas être limitant pour la croissance cellulaire ou pour la glycosylation. D'autres sucres ont été ajoutés au milieu de culture afin de remédier à la diminution de la glycosylation, mais les supplémentations en mannose (Gao et Lehrman, 2002; Körner *et al*., 1998) ou en galactose (Clark *et al*., 2005) n'ont pas eu d'effet sur la glycosylation.

Une limitation par d'autres constituants, tels la glutamine, pourrait également expliquer la sous-glycosylation de l'IFN-γ observée (Barnabé et Butler, 2000; Nyberg *et al*., 1999). Cependant, au moment où chute la glycosylation, la concentration en glutamine dans le milieu de culture RPMI est voisine de 2 mM. On peut ainsi raisonnablement affirmer que la glutamine ne constitue pas non plus un facteur qui serait limitant pour la croissance cellulaire ou pour la glycosylation.

Concernant les productions de métabolites toxiques, la concentration en lactate est de 10 mM lorsque le phénomène de sous-glycosylation est observé. Les différentes études disponibles dans la littérature semblent indiquer que des concentrations supérieures en lactate, comprises entre 17,5 et 110 mM en fonction de la lignée cellulaire étudiée, aient un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire. Ainsi, s'il est établi qu'une concentration en lactate de 10 mM n'est pas toxique pour la croissance cellulaire, rien n'a été montré à ce jour sur un éventuel effet du lactate sur la glycosylation des protéines recombinantes produites par des cellules CHO.

De nombreux travaux ont été menés quant à l'effet des ions ammonium sur la microhétérogénéité de la glycosylation. Il apparaît qu'une augmentation de la concentration en ions ammonium modifie la microhétérogénéité de la glycosylation, en augmentant notamment l'antennarité et en diminuant la sialylation des structures N-glycanniques (Yang et Butler, 2000; Gawlitzek *et al*., 1995a, 1998; Andersen et Goochee, 1995; Maiorella, 1992; Thorens et Vassalli, 1986; Zhangi *et al*., 1998). En revanche, beaucoup moins de données sont disponibles quant à l'effet potentiel des ions ammonium sur la macrohétérogénéité de la glycosylation. La N-glycosylation du lactogène-I placentaire murin exprimé dans des cellules CHO est inhibée lorsque les concentrations en chlorure d'ammonium (NH_4Cl) sont augmentées (Borys *et al*., 1994). Mais il est important de noter que ces auteurs induisent une augmentation de la concentration en ions ammonium par ajout de NH_4Cl, à des concentrations très élevées, généralement supérieures 15 mM. Or, de telles concentrations ne sont jamais atteintes au cours de nos cultures. En effet, au moment où chute la proportion de molécules d'IFN-γ glycosylées sur deux sites, la concentration en ions ammonium est voisine de 1,5-2 mM. Ceci suggère ainsi que les ions ammonium produits en début de culture discontinue ne sont pas responsables de la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ produit par des cellules CHO.

Il est intéressant de constater qu'en milieu PF-BDM, la macrohétérogénéité de la glycosylation demeure constante tout au long du procédé. La production spécifique d'IFN-γ est pourtant multipliée par un facteur 2 par rapport à la culture réalisée en milieu RPMI avec ou sans sérum. Certains auteurs ont par ailleurs observé que la nature des glycannes d'une protéine recombinante était indépendante de son taux de synthèse (Lin *et al*., 1993). Les travaux de Lamotte (1997) confortent également cette hypothèse, en montrant que des

clones de cellules CHO possédant des taux d'expression d'IFN-γ différents présentent des profils d'évolution de la macrohétérogénéité de la glycosylation comparables. Par conséquent, la variation d'occupation des sites de glycosylation semble être indépendante de l'expression de l'IFN-γ. On peut supposer que le milieu de culture PF-BDM, de par sa composition extrêmement riche et diversifiée, tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif, apporte des éléments permettant d'assurer une glycosylation efficace.

La supplémentation en sérum n'empêche pas la diminution de la sous-glycosylation, suggérant que des constituants additionnels apportés par le milieu PF-BDM sont absents ou présents en trop faible quantité dans le sérum. Ceci se vérifie, en outre, par la comparaison des compositions du milieu PF-BDM et d'un lot sérum de veau fœtal, présentées dans le tableau II.1 du chapitre II. D'autre part, il a été montré que le sérum pouvait influencer la microhétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ (Lamotte, 1997; Gawlitzek *et al*., 1995a). En effet, en présence de sérum, les structures glycanniques peuvent être tronquées, et ceci peut être attribué à la présence de glycosidases, relarguées dans le milieu de culture suite au décès cellulaire (Gramer et Goochee, 1993). De plus, les travaux de Hooker *et al*. (1995) ont montré, par analyse en spectrométrie de masse, que la nature des glycannes de l'IFN-γ excrété, lors de cultures discontinues de cellules CHO, pouvait être modifiée au cours de la phase de décès cellulaire. Néanmoins, un rôle inhibiteur de la glycosylation ne peut être attribué à la présence de sérum, puisque la diminution de la glycosylation est également observée en absence de sérum dans notre étude.

L'hypothèse d'une dégradation protéolytique de l'IFN-γ semble également pouvoir être écartée. En effet, Goldman *et al*. (1997) ont caractérisé par spectrométrie de masse la séquence polypeptidique de l'IFN-γ humain recombinant produit par des cellules CHO 320 au cours d'une culture discontinue en milieu RPMI sans sérum. Dès le début de la culture, l'IFN-γ comportant 143 acides aminés n'est jamais produit, mais les auteurs détectent une protéine amputée de 10 acides aminés, résultant d'un clivage entre la glutamine 133 et la méthionine 134, ces deux acides aminés étant situés du côté C-terminal de la protéine. Les sites de glycosylation de l'IFN-γ étant localisés au niveau des résidus Asn 25 et 97, cette dégradation protéolytique ne semble pas pouvoir expliquer la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ observée. De plus, les travaux de Mols *et al*. (2005) ont montré que des cellules CHO 320 productrices d'IFN-γ cultivées en milieu PF-BDM étaient, en partie, protégées

contre une protéolyse extracellulaire, car elles expriment naturellement des inhibiteurs de protéases tels les inhibiteurs de métalloprotéinases -1 et -2 et un inhibiteur du t-PA.

Ainsi, il semble qu'aucune des hypothèses évoquées précédemment ne soit satisfaisante pour expliquer la diminution du pourcentage de glycoformes 2N de l'IFN-γ en début de cultures discontinues de cellules CHO. Le phénomène de sous-glycosylation étant essentiellement observé jusqu'alors dans le cas de la production de l'IFN-γ, la possibilité d'une influence de cette cytokine sa propre glycosylation pourrait être envisagée.

4. Influence de la supplémentation en IFN-γ sur la glycosylation

Bien que peu d'études soient disponibles quant au suivi cinétique de l'évolution de la macrohétérogénéité de la glycosylation des glycoprotéines recombinantes produites par des cellules CHO au cours de cultures discontinues, la diminution de la glycosylation observée dans le cas de l'IFN-γ ne semble pas être un phénomène récurrent.

En effet, le cas du t-PA peut s'avérer intéressant. Le t-PA de type II possède trois sites potentiels de glycosylation. Au cours d'une culture discontinue de cellules CHO, la proportion de chacune des glycoformes du t-PA demeure constante tout au long de la culture et le pourcentage de molécules de t-PA glycosylées sur trois sites tend même à augmenter légèrement en fin de culture (Andersen *et al*., 2000). Ainsi, il apparaît que le phénomène de diminution de la glycosylation observé dans le cas de l'IFN-γ ne puisse être généralisé à toutes les glycoprotéines produites par des cellules animales. Au contraire, on peut se demander si ce phénomène ne serait pas restreint à l'IFN-γ lui-même et l'on peut s'interroger sur l'influence de cette cytokine sur sa propre synthèse et sur sa glycosylation. Dans la littérature, plusieurs auteurs évoquent l'influence potentielle inhibitrice de l'IFN-γ sur sa propre glycosylation, sans qu'aucune expérience ne confirme ou n'infirme cette hypothèse. Comme nous l'avons précisé dans la synthèse bibliographique, l'IFN-γ est une cytokine impliquée dans de nombreuses réactions de médiation immunitaire et cellulaire et on peut supposer que cette molécule est susceptible d'avoir une influence non négligeable sur le métabolisme cellulaire.

4.1 Influence de la supplémentation en IFN-γ sur la croissance cellulaire

Avant de tester l'influence de l'IFN-γ sur la glycosylation, nous avons, dans un premier temps, souhaité vérifier l'effet de la supplémentation en IFN-γ sur la croissance cellulaire. Ainsi, différentes concentrations en IFN-γ humain commercial non glycosylé, comprises entre 0 et 1 000 ng/mL, ont été ajoutées au milieu de culture et la croissance des cellules CHO C5 a été suivie dans ces conditions. La croissance cellulaire a été évaluée en micro-plaques de 96 puits par analyse d'images sur une période d'environ 150 heures.

L'évolution de la densité cellulaire en présence de différentes concentrations en IFN-γ est présentée sur la figure III.11. Cette évolution est comparable dans les témoins et dans les cultures supplémentées en IFN-γ, quelles que soient les concentrations en IFN-γ testées. Les concentrations cellulaires maximales atteignent une valeur moyenne de $3{,}8.10^5$ cellules/mL après 90 heures de culture. Il apparaît ainsi que la supplémentation en IFN-γ, pour les concentrations testées dans ces essais, n'a aucune influence, ni sur la croissance, ni sur le décès cellulaires.

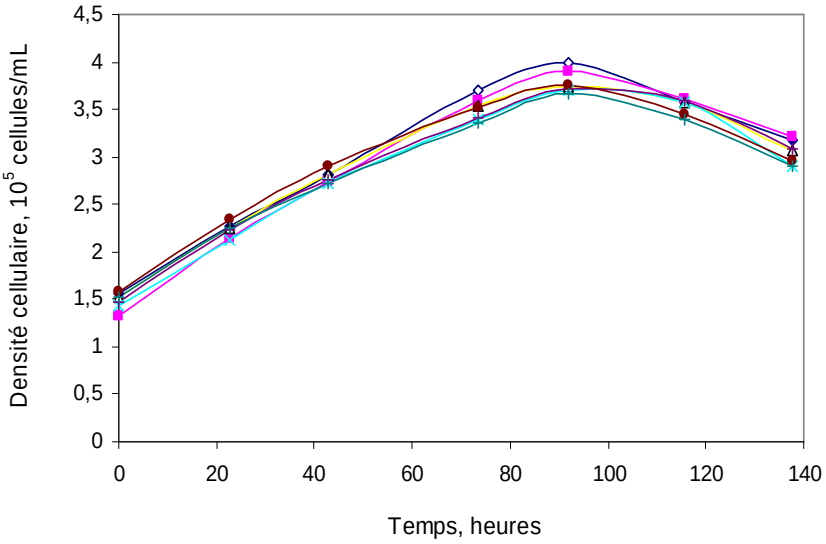


Figure III.11 : Influence de la concentration en IFN-γ commercial (0 à 1000 ng/mL) sur la croissance des cellules CHO C5 (Témoin1 (◇) ; Témoin 2 (■) ; IFN 50 ng/mL (Δ) ; IFN 100 ng/mL (×) ; IFN 250 ng/mL (+) ; IFN 500 ng/mL (◆) ; IFN 1000 ng/mL (l)).

Ces résultats sont néanmoins contradictoires à ceux couramment retrouvés dans la littérature puisque l'effet inhibiteur de l'IFN-γ sur la croissance cellulaire semble être clairement établi. Takamatsu *et al*. (2003) ont montré que l'IFN-γ glycosylé humain naturel,

ou produit à partir de cellules CHO, avait une activité antiproliférative marquée pour des concentrations supérieures à 0,1 ng/mL. De plus, l'IFN-γ produit dans les cellules CHO présente une activité supérieure à celle de l'IFN-γ humain naturel. Au contraire, l'IFN-γ produit chez *E. coli* est celui qui possède l'activité antiproliférative la plus faible, puisqu'il diminue significativement la croissance cellulaire pour des concentrations supérieures à 1 ng/mL. Il est intéressant de noter que les cellules utilisées pour réaliser les tests de cytotoxicité sont des cellules humaines (adénocarcinomes du colon). L'absence d'activité antiproliférative, dans notre cas, pourrait vraisemblablement s'expliquer par l'utilisation de cellules CHO, dépourvues de récepteurs spécifiques de l'IFN-γ humain (Jung *et al*., 1990; Jung *et al*., 1987).

4.2 Influence de la supplémentation en IFN-γ sur la vitesse spécifique de synthèse des dol-PP-oligosaccharides et des glycoprotéines

4.2.1 Supplémentation en IFN-γ par dilution du milieu de culture avec du milieu de culture usagé riche en IFN-γ

Pour ces premiers essais, des cultures de cellules CHO Pro-5, non productrices d'une protéine recombinante, cultivées en présence de sérum, ont été supplémentées par un milieu de culture épuisé contenant de l'IFN-γ. Une expérience similaire a été réalisée en utilisant des cellules CHO C5, productrices d'IFN-γ et adaptées à la culture en suspension. Ainsi, l'influence de la supplémentation en IFN-γ a été testée sur deux lignées cellulaires, présentant des caractéristiques différentes.

4.2.1.1 Supplémentation en IFN-γ sur des cultures de cellules non productrices d'une protéine recombinante

Sachant qu'il est reporté dans la littérature que l'IFN-γ est susceptible d'avoir un effet inhibiteur sur la synthèse protéique (Tomlinson, 1991), nous avons testé l'impact de la supplémentation en IFN-γ sur l'incorporation de [2-^{3}H] mannose. Ceci offre l'avantage de pouvoir déterminer l'influence de l'IFN-γ sur les vitesses spécifiques de synthèse des glycoprotéines néosynthétisées, des dol-PP-oligosaccharides ainsi que du dol-P-Man. Il est

important de noter que l'utilisation des marquages métaboliques radioactifs permet d'apprécier des vitesses spécifiques de synthèse en dpm/cellules/h puisqu'une quantité de radioactivité incorporée (dpm) par quantité de cellules et par heure de marquage est mesurée.

Les premiers essais ont été effectués sur des cellules CHO Pro-5, cultivées dans le milieu D-MEM supplémenté par 10% de sérum (milieu neuf). Le milieu « riche en IFN-γ », utilisé dans nos expériences, est un milieu prélevé à la fin d'une culture discontinue de cellules CHO C5. La concentration en IFN-γ présente dans le milieu de culture épuisé, déterminée par test ELISA, est de 450 ng/mL. Les cellules CHO Pro-5 (2.10^6 cellules /essai) ont été incubées en flacons de Roux, durant 16 heures, dans un milieu de culture contenant diverses proportions de milieu neuf et de milieu épuisé « riche » en IFN-γ : 100% de milieu neuf (essai 1), 75% de milieu neuf et 25% de milieu riche en IFN-γ (soit 112,5 ng/mL d'IFN-γ) (essai 2) , 50% de milieu neuf et 50% de milieu riche en IFN-γ (225 ng/mL d'IFN-γ) (essai 3) ainsi que 100% de milieu riche en IFN-γ (450 ng/mL d'IFN-γ) (essai 4). Après incubation dans ces différents milieux de culture, les vitesses spécifiques de synthèse des précurseurs oligosaccharidiques, des glycoprotéines et du dol-P-Man ont été déterminées après un marquage au [2-^{3}H] mannose suivi d'une extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques.

Dans l'essai 4, lorsque les cellules CHO Pro-5 sont incubées en présence de 100% de milieu épuisé « riche » en IFN-γ (450 ng/mL d'IFN-γ), la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines est augmentée d'un facteur 3 par rapport au témoin (figure III.12). Pour des concentrations en IFN-γ inférieures (essais 1 à 3), la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines est relativement constante, ce qui semble indiquer que l'IFN-γ ajouté n'a pas d'effet à ces concentrations. Bien que la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines soit augmentée de façon significative à la plus forte concentration en IFN-γ testée, il semblerait que les vitesses de synthèse des dol-PP-oligosaccharides et du dol-P-Man soient également induites en présence d'IFN-γ, mais dans une moindre mesure.

.

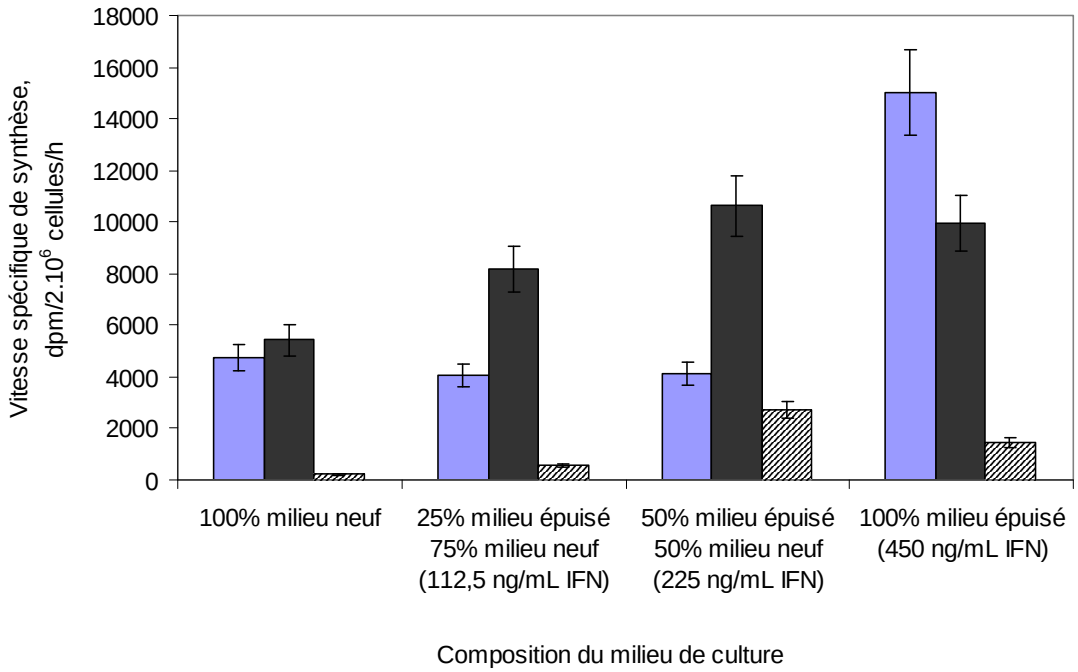


Figure III.12 : Influence de la supplémentation en IFN-γ, contenu dans un milieu de culture épuisé, sur les vitesses spécifiques de synthèse des glycoprotéines (□), des dol-PP-oligosaccharides (■) et du dol-P-Man (▨). Les cellules CHO Pro-5 (2.10^6 cellules), non productrices d'une protéine recombinante, ont été incubées durant 16 heures en présence de différentes concentrations en IFN-γ.

4.2.1.2 Supplémentation en IFN-γ sur des cultures de cellules CHO productrices d'IFN-γ

L'objectif est ici de confirmer l'effet positif de la supplémentation en IFN-γ sur la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines, en utilisant une autre lignée CHO, les cellules CHO C5, elles-mêmes productrices d'IFN-γ.

Tout comme dans l'expérience précédente, les cellules CHO C5 (2.10^6 cellules /essai) ont été incubées, pendant 16 heures, dans un milieu de culture contenant diverses proportions de milieu neuf et de milieu épuisé riche en IFN-γ : 100% de milieu neuf (essai 1), 75% de milieu neuf et 25% de milieu riche en IFN-γ (essai 2), 50% de milieu neuf et 50% de milieu riche en IFN-γ (essai 3), 100% de milieu riche en IFN-γ (essai 4). Les concentrations en IFN-γ sont identiques à celles testées précédemment. Après incubation dans ces différents milieux de culture, les vitesses spécifiques de synthèse des dol-PP-oligosaccharides, des glycoprotéines et du dol-P-Man ont été déterminées après un marquage au [2-^{3}H] mannose suivi d'une extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques.

L'incubation des cellules CHO C5 en présence de 100% de milieu épuisé et riche en IFN-γ (450 ng/mL d'IFN–γ) induit une augmentation d'un facteur 3 de la vitesse de synthèse des glycoprotéines par rapport au témoin (figure III.13). Pour une concentration en IFN-γ de 225 ng/mL, la vitesse de synthèse des glycoprotéines est augmentée d'un facteur 2 alors qu'un ajout d'IFN-γ à une concentration de 112,5 ng/mL ne semble pas avoir d'effet sur la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines. Comme lors de la supplémentation des cultures de cellules CHO non productrices d'une protéine recombinante, les vitesses spécifiques de synthèse des dol-PP-oligosaccharides et du dol-P-Man augmentent légèrement avec la concentration en IFN-γ, mais de façon bien moins prononcée que dans le cas des glycoprotéines.

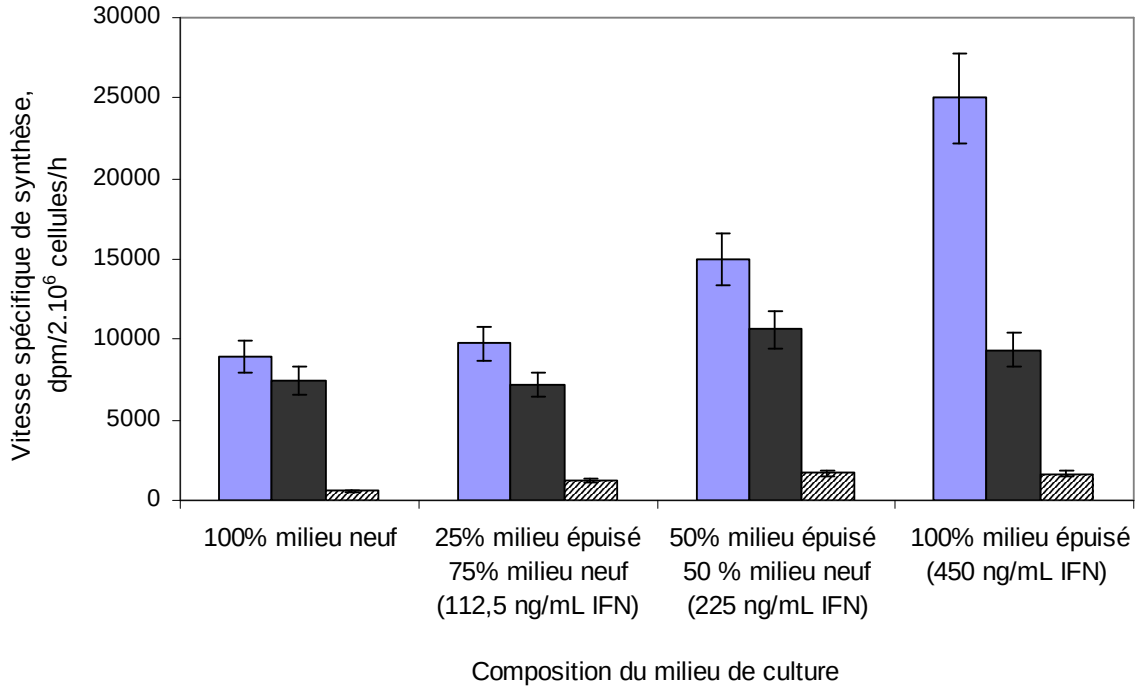


Figure III.13 : Influence de la supplémentation en IFN-γ, contenu dans un milieu de culture épuisé, sur les vitesses spécifiques de synthèse des glycoprotéines (□), des dol-PP-oligosaccharides (■) et du dol-P-Man (▨). Les cellules CHO C5 (2.10^6 cellules/essai), productrices d'IFN-γ, ont été incubées durant 16 heures en présence de différentes concentrations en IFN-γ.

Les expériences de supplémentation en IFN-γ réalisées avec les lignées cellulaires CHO Pro-5, non productrices d'une protéine recombinante, et les cellules CHO C5, productrices d'IFN-γ, révèlent que l'ajout d'IFN-γ induit significativement la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines, sans pour autant induire les vitesses de synthèse des dol-PP- oligosaccharides de façon aussi prononcée. Cependant, l'IFN-γ ajouté est issu

d'un milieu de culture épuisé, obtenu à la fin d'une culture discontinue de cellules CHO productrices d'IFN-γ. Ainsi, ce milieu peut contenir des métabolites toxiques (lactate, ions ammonium…) ou des enzymes protéolytiques, susceptibles d'interférer avec l'étude de l'influence de la supplémentation en IFN-γ. Nous proposons donc d'ajouter de l'IFN-γ commercial au milieu de culture dans les études suivantes.

4.2.2 Supplémentation en IFN-γ commercial à différentes concentrations

4.2.2.1 Influence de la supplémentation en IFN-γ ajouté à une concentration de 500 ng/mL

Afin de confirmer l'effet potentiel de la supplémenation en IFN-γ sur la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines, la supplémentation est effectuée à l'aide d'IFN-γ pur commercial, produit chez *E. coli* et par conséquent non glycosylé.

Les cellules CHO C5 productrices d'IFN-γ (2.10^6 cellules/essai) ont été incubées durant 16 heures dans le milieu RPMI sans sérum (témoin) ainsi que dans le milieu RPMI supplémenté en IFN-γ commercial (500 ng/mL). Après un marquage au [2-^{3}H] mannose, les intermédiaires lipidiques ont été extraits suivant le protocole de Cacan et Verbert (1995), et les vitesses spécifiques de synthèse des dol-PP-oligosaccharides, des glycoprotéines et du dol-P-Man ont été déterminées.

L'influence de la supplémentation en IFN-γ sur les vitesses spécifiques de synthèse des glycoprotéines, des dol-PP-oligosaccharides et du dol-P-Man est présentée sur la figure III.14. En présence d'IFN-γ commercial, la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines est augmentée d'un facteur 2,5 par rapport au témoin (figure III.14). Quant à la vitesse spécifique de synthèse des dol-PP-oligosaccharides, elle ne semble pas être influencée par la supplémentation en IFN-γ puisqu'elle reste identique à celle mesurée en absence de supplémentation en IFN-γ.

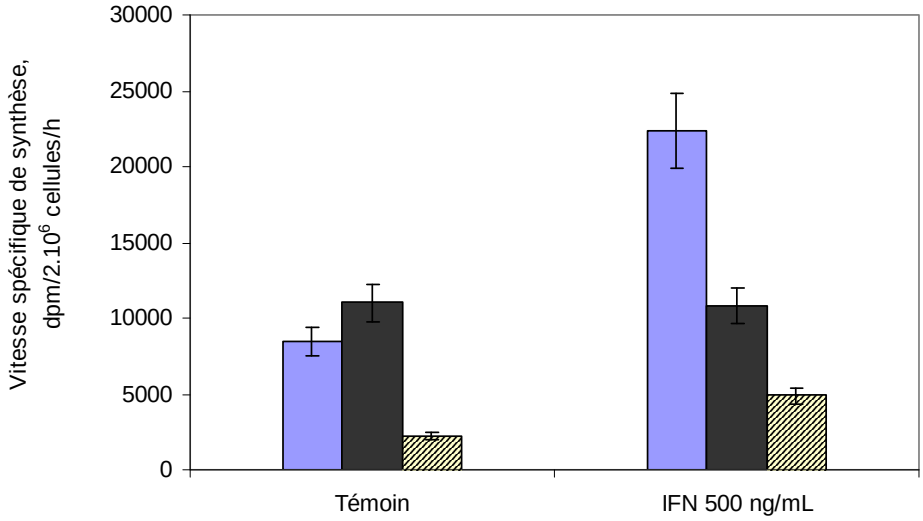


Figure III.14 : Influence de la supplémentation en IFN-γ (500 ng/mL) sur les vitesses spécifiques de synthèse des glycoprotéines (▫), des dol-PP-oligosaccharides (■) et du dol-P-Man (▨). Les cellules CHO C5 (2.10^6 cellules/essai), productrices d'IFN-γ, ont été incubées durant 16 heures en présence de 500 ng/mL d'IFN-γ commercial.

L'ensemble de ces résultats confirment la reproductibilité des expériences puisque l'effet de l'IFN-γ sur la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines se révèle par l'utilisation de deux lignées différentes de cellules CHO, les cellules Pro-5, non productrices de protéine recombinante, et les cellules C5, productrices d'IFN-γ. On peut ainsi supposer que l'augmentation de la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines mesurée avec les cellules CHO Pro-5 et C5 est bien due à l'ajout d'IFN-γ, puisqu'un phénomène identique a été observé lors de la supplémentation en IFN-γ commercial et lorsqu'il apporté par un milieu de culture épuisé riche en IFN-γ.

4.2.2.2 Influence de la concentration en IFN-γ commercial, ajouté à des concentrations comprises entre 0 et 1 000 ng/mL

Au cours des expériences précédentes, l'IFN-γ commercial a été ajouté à une concentration fixe, à savoir 500 ng/mL. Dans un second temps, nous avons étudié l'influence de la supplémentation en IFN-γ, ajouté à différentes concentrations, sur les vitesses spécifiques de synthèse des protéines et des glycoprotéines.

Les cellules CHO C5 (5.10^6 cellules /essai) ont été incubées durant 16 heures en micro-plaques de 96 puits. L'IFN-γ a été ajouté, dans le milieu de culture, aux concentrations suivantes : 0, 10, 50, 100, 250, 500 et 1000 ng/mL. Après marquages au [2-^{3}H] mannose et à la [^{35}S] méthionine, les glycoprotéines marquées ont été récupérées par une précipitation à l'ATCA/PTA, puis la radioactivité présente sur les membranes en fibre de verre a été mesurée.

L'influence de la supplémentation en IFN-γ, ajouté à différentes concentrations, sur les vitesses spécifiques de synthèse des glycoprotéines et des protéines néosynthétisées est présentée sur la figure III.15. L'ajout d'IFN-γ en concentrations croissantes, comprises entre 0 et 500 ng/mL, induit une augmentation de la vitesse de synthèse des glycoprotéines. L'augmentation devient particulièrement significative à partir d'une concentration en IFN-γ égale à 100 ng/mL. Au-delà de 500 ng/mL, la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines est diminuée, probablement en raison de l'effet toxique de l'IFN-γ. En ce qui concerne la vitesse spécifique de synthèse des protéines, elle ne semble pas être influencée de façon majeure par la supplémentation en IFN-γ. La supplémentation en IFN-γ semble donc avoir un effet significatif et dépendant de la dose ajoutée sur la vitesse de synthèse des glycoprotéines, mais ne semble pas influencer la vitesse de synthèse des protéines. Ces résultats suggérent ainsi que l'IFN-γ a une influence sur la glycosylation.

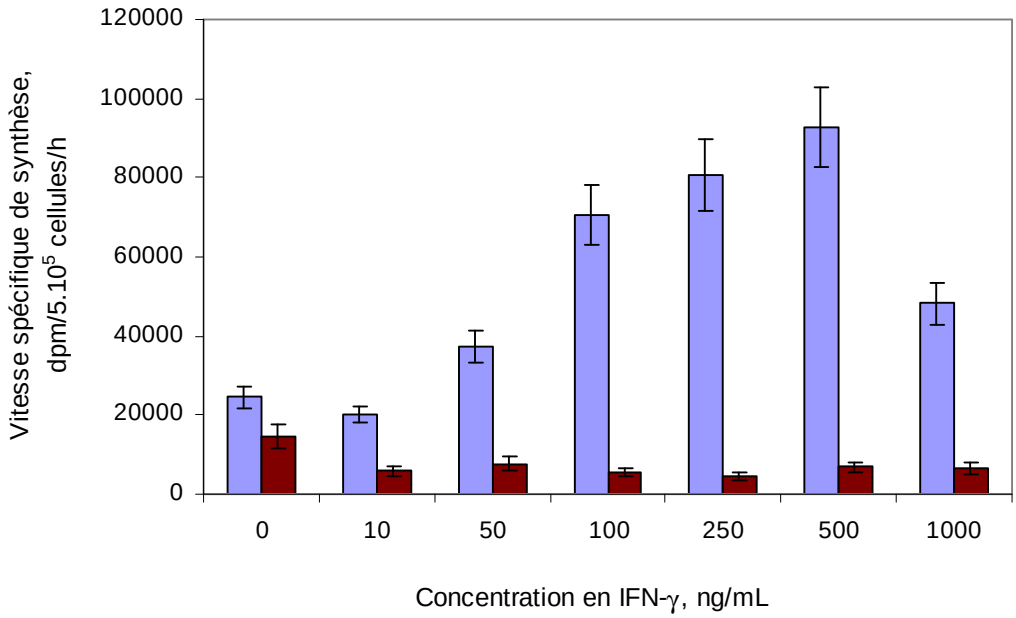


Figure III.15 : Influence de la supplémentation en IFN-γ commercial, ajouté à différentes concentrations, sur les vitesses spécifiques de synthèse des glycoprotéines néosynthétisées (□) et des protéines néosynthétisées (■).

4.2.3 Influence de la durée d'incubation des cellules en présence de 500 ng/mL d'IFN-γ commercial sur les vitesses spécifiques de synthèse des glycoprotéines

Dans un troisième temps, nous avons cherché à déterminer si l'action de l'IFN-γ était immédiate. Pour cela, les cellules CHO C5 ont été incubées en présence de 500 ng/mL en plaques 6 puits durant une période variant de 1 à 48 heures.

Après marquage des cellules (5.10^5 cellules/essai) au [2-^{3}H] mannose, les glycoprotéines ont été récupérées par précipitation à l'ATCA/PTA et la radioactivité présente sur les membranes en fibre de verre a été mesurée.

L'influence de la durée d'incubation des cellules, en présence de 500 ng/mL d'IFN-γ, sur les vitesses spécifiques de synthèse des glycoprotéines est présentée sur la figure III.16. L'IFN-γ ajouté à une concentration de 500 ng/mL augmente la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines lorsque la durée d'incubation des cellules en présence d'IFN-γ est supérieure à 13 heures. L'influence de l'IFN-γ sur la vitesse de synthèse spécifique des glycoprotéines n'est donc pas immédiate. On peut supposer que ce laps de temps est

nécessaire pour qu'un système de transduction du signal se mette en place. En effet, l'IFN-γ est impliqué dans de nombreuses réactions et les mécanismes moléculaires d'action de cette cytokine sont complexes, car ils font appel à de nombreuses cascades de signaux de transduction.

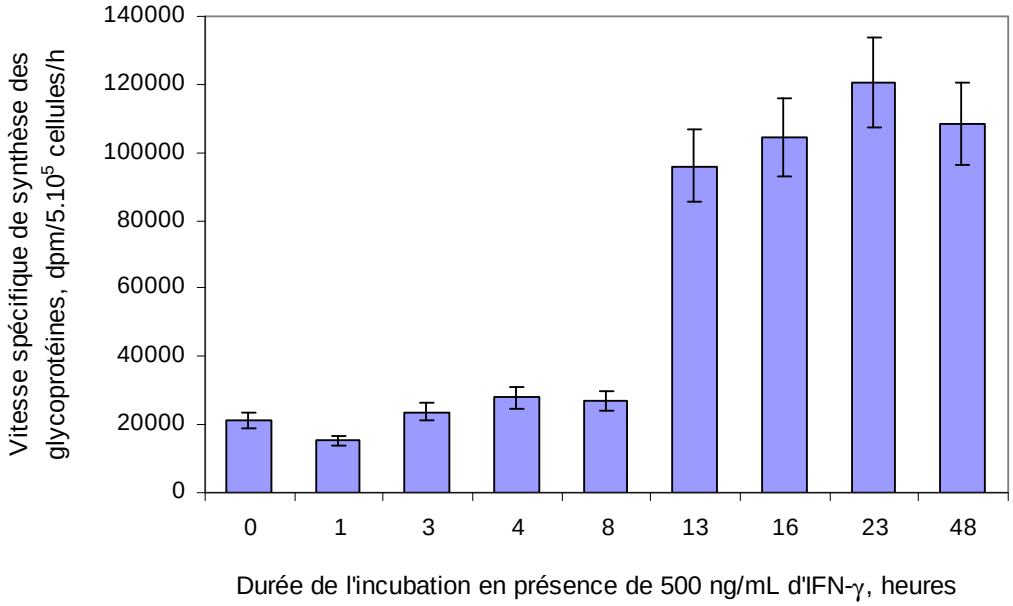


Figure III.16 : Influence de la durée d'incubation des cellules CHO en présence de 500 ng/mL d'IFN-γ commercial sur les vitesses spécifiques de synthèse des glycoprotéines néosynthétisées.

Afin de confirmer que l'augmentation de la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines, au cours du temps, est bien due à la supplémentation en IFN-γ, et pas uniquement à la croissance cellulaire, nous avons mesuré simultanément les vitesses spécifiques de synthèse des glycoprotéines et des protéines, et la vitesse spécifique de croissance cellulaire.

Entre 0 et 48 heures, la vitesse spécifique de croissance double quasiment dans chaque essai, puisqu'elle atteint une valeur voisine de 0,018 h^{-1} au bout de 48 heures (figure III.17). La vitesse spécifique de synthèse des protéines augmente, quant à elle, d'un facteur 2,5 environ. Une relation est donc observée entre la vitesse spécifique de synthèse des protéines et la croissance cellulaire.

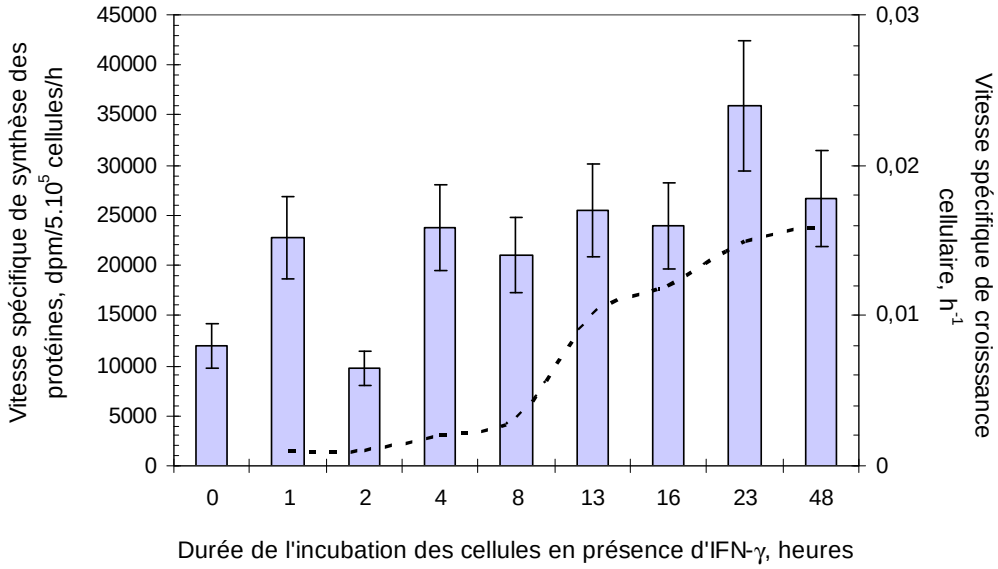


Figure III.17 : Evolution de la vitesse spécifique de synthèse des protéines (▫) et de la vitesse spécifique de croissance cellulaire (·····) durant l'incubation des cellules CHO C5 en présence de 500 ng/mL d'IFN-γ commercial.

La vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines augmente de façon beaucoup plus importante, d'un facteur 5 environ, puisqu'elle passe d'une valeur initiale proche de 10 000 dpm à environ 120 000 dpm après 48 heures d'incubation (figure III.18). On peut ainsi en conclure que l'augmentation de l'incorporation de la radioactivité dans les glycoprotéines est bien due à l'effet de la supplémentation en IFN-γ.

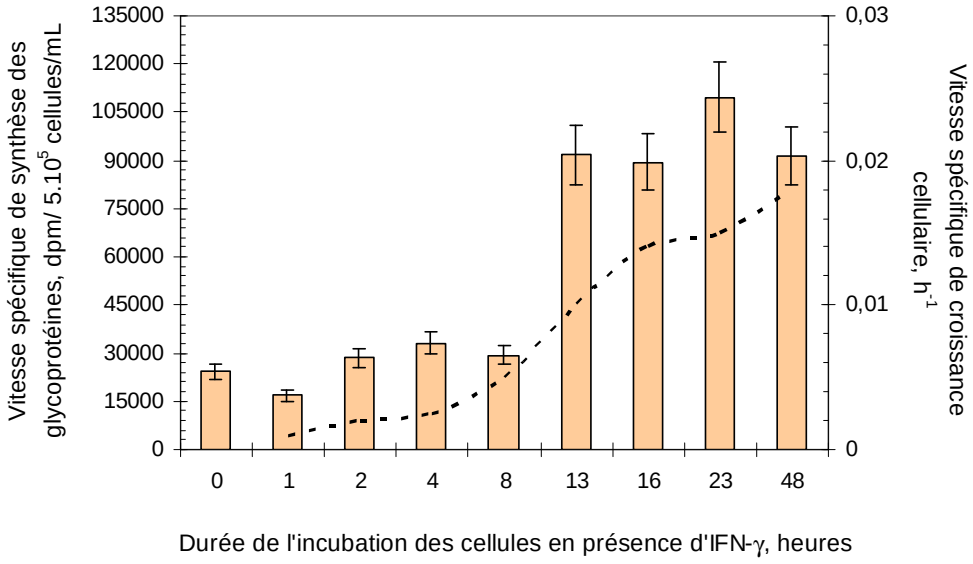


Figure III.18 : Evolution de la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines (▫) et de la vitesse spécifique de croissance cellulaire (·····) durant l'incubation des cellules CHO C5 en présence de 500 ng/mL d'IFN-γ commercial.

4.3 Discussion

L'ajout d'IFN-γ à une concentration de 450 ng/mL semble induire une augmentation de la vitesse de synthèse des glycoprotéines, chez les deux lignées CHO étudiées, une lignée non productrice de protéine recombinante (CHO Pro-5) et une autre lignée, productrice d'IFN-γ (CHO C5).

L'influence de l'IFN-γ est bien due à une stimulation de la glycosylation, et non à une augmentation de la synthèse protéique, puisque l'augmentation de la vitesse de synthèse des protéines est liée à l'augmentation du nombre de cellules. Les essais effectués en présence de différentes concentrations en IFN-γ, comprises entre 0 et 1 µg/mL, révèlent un mode d'action de l'IFN-γ dépendant de la concentration ajoutée sur l'augmentation de la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines. Cette action n'est pas immédiate, puisque l'augmentation de la vitesse de synthèse des glycoprotéines ne se visualise qu'à partir de 13 heures d'incubation des cellules en présence d'IFN-γ. Celui-ci augmente significativement la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines, alors que les vitesses spécifiques de synthèse des dol-PP-oligosaccharides et du dol-P-Man ne sont que faiblement induites. Si les vitesses de synthèse des différents précurseurs impliqués dans le processus de glycosylation aboutissant à l'élaboration du précurseur final de type $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ ne sont pas augmentées en présence d'IFN-γ, on peut envisager l'hypothèse d'une stimulation par l'IFN-γ de la réaction de transfert des dol-PP-oligosaccharides, cette réaction étant catalysée par l'OST. Cette dernière, en présence d'IFN-γ, pourrait transférer davantage de $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ sur les protéines en voie de synthèse.

L'effet de l'IFN-γ commercial sur la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines se manifeste à partir d'une concentration égale à 100 ng/mL. Dans le cas des cultures discontinues réalisées en milieu RPMI avec et sans sérum, les concentrations en IFN-γ sont voisines de 250 à 300 ng/mL lorsque se produit la diminution du pourcentage de glycoformes 2N de l'IFN-γ recombinant. Ainsi, contrairement à l'effet stimulateur de l'IFN-γ sur la glycosylation mesuré dans ces dernières expériences, c'est un phénomène de diminution de la glycosylation qui est observé au cours des cultures discontinues de cellules CHO en milieu RPMI avec et sans sérum. Si l'IFN-γ induit bien une augmentation de la vitesse de synthèse des glycoprotéines, on peut supposer que, pour une raison encore inexpliquée, les précurseurs oligosaccharidiques synthétisés ne soient pas transférés sur la chaîne polypeptidique de

l'IFN-γ, mais sur d'autres protéines au cours des cultures discontinues de cellules CHO en bioréacteurs.

5. Conclusion du chapitre III

La diminution du pourcentage de glycoformes 2N de l'IFN-γ s'observe lorsqu'il est produit par des cellules CHO cultivées en milieu RPMI sans sérum. Cette diminution se produit alors que les cellules sont en phase de croissance. La présence de sérum n'empêche cependant pas la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ. Le suivi de l'évolution de la consommation du glucose et de la glutamine révèle que ces deux substrats ne sont non pas limitants pour la croissance cellulaire et la glycosylation. En ce qui concerne l'accumulation des métabolites toxiques, comme le lactate ou les ions ammonium, ils sont produits à des concentrations trop faibles pour pouvoir avoir une influence sur la glycosylation de l'IFN-γ.

Par ailleurs, nos résultats montrent l'absence d'effet inhibiteur de l'IFN-γ sur la croissance et la synthèse protéique, mais, contrairement à ce qui était attendu, cette cytokine semble stimuler la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines, sans pour autant augmenter les vitesses spécifiques de synthèse des dol-PP-oligosaccharides et du dol-P-Man.
A l'inverse des cultures effectuées en milieu RPMI avec et sans sérum, la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ demeure constante lorsque les cellules CHO sont cultivées en mode discontinu en milieu PF-BDM. Il apparaît ainsi que la composition du milieu de culture influence la variation d'occupation des sites de glycosylation de l'IFN-γ. Les paramètres extracellulaires ne pouvant expliquer la diminution de la glycosylation observée en milieu RPMI, nous proposons de suivre l'évolution des paramètres intracellulaires, impliqués dans le processus de glycosylation, au cours d'une culture discontinue de cellules CHO productrices d'IFN-γ.

Chapitre IV

LES PRECURSEURS OLIGOSACCHARIDIQUES ET LA MACROHETEROGENEITE DE LA GLYCOSYLATION DE L'IFN-γ

CHAPITRE IV. LES PRECURSEURS OLIGOSACCHARIDIQUES ET LA MACROHETEROGENEITE DE LA GLYCOSYLATION DE L'IFN-γ

Les résultats précédents révèlent que la diminution de l'occupation des sites de glycosylation de l'IFN-γ se produit très tôt au cours d'une culture discontinue, lorsque les cellules CHO sont encore en phase exponentielle de croissance, et dans des conditions où le glucose et la glutamine ne sont pas limitants pour la croissance cellulaire.

Outre l'influence des paramètres extracellulaires sur la macrohétérogénéité de la glycosylation, les facteurs intracellulaires peuvent également jouer un rôle essentiel. En effet, Chapman et Calhoun (1988) ont montré que des cellules CHO, cultivées dans des conditions de limitation en glucose, synthétisent des glycannes tronqués, de type $Glc_3Man_5GlcNAc_2$, au lieu de $Glc_3Man_9GlcNAc_2$. Bien que l'OST soit tout à fait capable de transférer des structures glycanniques plus courtes sur les protéines en voie de synthèse (Stoll, 1986), il semble que cette enzyme transfère le précurseur sous sa forme $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ avec une efficacité supérieure (Karaoglu *et al*., 2001). Une hypothèse découlant de ces quelques observations pourrait consister à penser que, pour une raison encore indéterminée, les cellules CHO synthétisent des structures glycanniques tronquées. Ayant moins d'affinité pour ces glycannes tronqués, l'activité de l'OST en serait diminuée, et cette dernière transférerait dès lors une quantité moindre de glycannes sur les protéines en voie de synthèse.

Jusqu'à présent, aucune étude n'a caractérisé, au cours du temps, la structures des glycannes des précurseurs oligosaccharidiques (dol-PP-oligosaccharides) du RE. Ainsi, nous avons choisi de suivre l'évolution de la structure des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides au cours de cultures discontinues de cellules CHO, cultivées en milieu RPMI sans sérum. En raison de la très faible concentration en précurseurs oligosaccharidiques dans les cellules, la technique d'analyse généralement utilisée consiste à effectuer un marquage radioactif des précurseurs à l'aide de [2-^{3}H] mannose, suivi d'une extraction séquentielle permettant de récupérer une fraction contenant les précurseurs oligosaccharidiques, d'une hydrolyse de ces précurseurs de manière à éliminer la partie lipidique (dolichol) et conserver uniquement les structures glycanniques marquées. Ces dernières peuvent ensuite être caractérisées par analyse CLHP couplée à un détecteur de radioactivité.

1. Mise au point de l'analyse qualitative des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides au cours de cultures discontinues de cellules CHO en bioréacteurs

1.1 Principe du marquage au [2-^{3}H] mannose

La biosynthèse des glycoconjugués se fait par le transfert d'unités saccharidiques, à partir d'un nucléotide-sucre, sur un accepteur. Ainsi, l'utilisation de monosaccharide radioactif permet de marquer une variété de glycoconjugués (les intermédiaires lipidiques, les N-glycannes, les O-glycannes, les glycolipides et les protéoglycannes) mais aussi les oligosaccharides et les polysaccharides comme le glycogène. Il s'agit alors de bien choisir le monosaccharide radioactif de façon à assurer un marquage qui soit le plus spécifique possible. Le [2-^{3}H] mannose est l'isotope radioactif du mannose le plus couramment utilisé pour marquer les N-glycannes des glycoprotéines, car les possibilités d'interconversion sont restreintes à la formation de GDP-Fucose (figure IV.1). Les autres réactions d'interconversion se produisent par l'isomérisation du mannose-6-phosphate (Man-6-P) en fructose-6-phosphate (Fru-6-P) : la formation d'une cétone en position 2 conduit à la perte de l'hydrogène marqué. En conséquence, tous les sucres dérivant du Fru-6-P ne sont pas marqués.

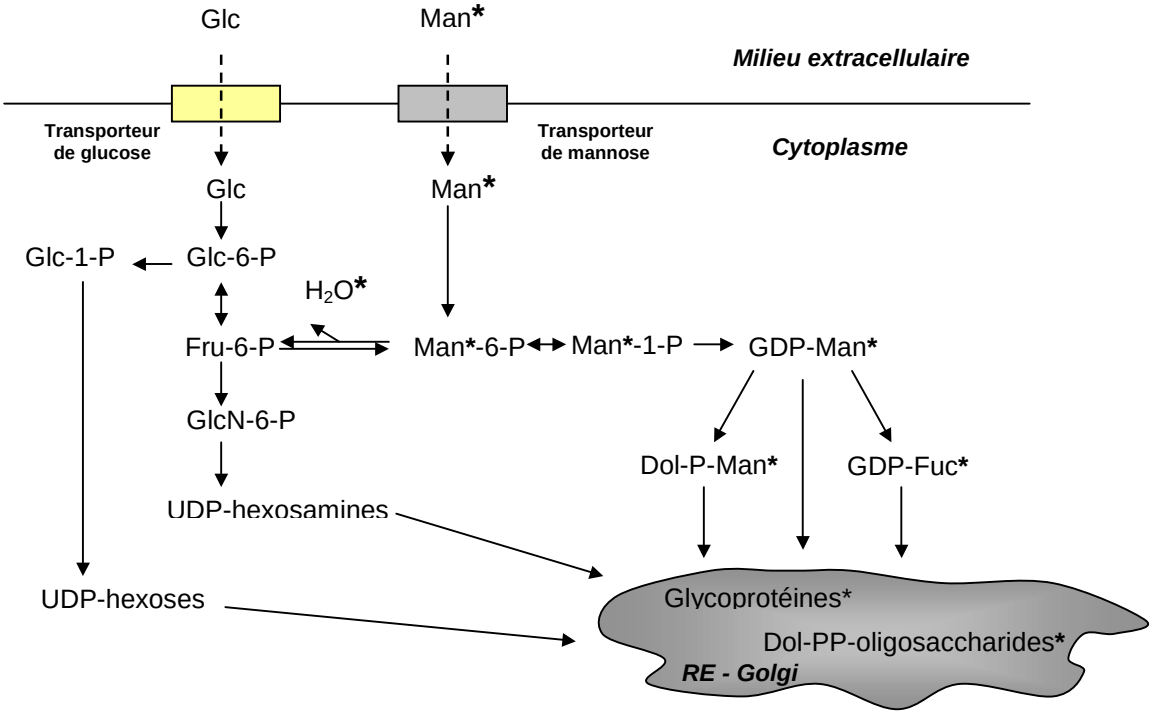


Figure IV.1 : Principe du marquage au [2-^{3}H] mannose et réactions d'interconversion des sucres dans les cellules animales.

L'incorporation d'un sucre radioactif se déroule en trois étapes :

1. L'entrée du monosaccharide marqué dans les cellules *via* un transporteur plus ou moins spécifique
2. L'activation du monosaccharide marqué en nucléotide-sucre marqué
3. L'incorporation du monosaccharide marqué porté par le nucléotide-sucre dans les glycoconjugués.

1.2 Mise au point des conditions de marquage

De nombreux essais ont été effectués dans des conditions classiquement utilisées pour réaliser les marquages métaboliques au [2-^{3}H] mannose. Brièvement, 4.10^6 cellules ont été incubées dans un milieu de marquage contenant 100 µCi de [2-^{3}H] mannose et 0,5 mM de glucose durant 1 heure. Dans ces conditions, l'incorporation de [2-^{3}H] mannose dans les dol-PP-oligosaccharides, est très faible et ne permet pas l'analyse CLHP des structures glycanniques. Les conditions de marquage ont donc dues être réadaptées aux cellules et conditions de culture utilisées dans notre étude.

1.2.1 Influence de la concentration en glucose du milieu de marquage sur l'incorporation de la radioactivité dans les glycoprotéines

Les cellules étant cultivées dans un milieu contenant 20 mM de glucose lors des cultures discontinues en flacon agité ou bioréacteur, on peut penser que la concentration élevée en glucose du milieu de culture est susceptible de limiter l'incorporation de [2-^{3}H] mannose par les cellules. Afin de vérifier cette hypothèse, 4.10^6 cellules CHO C5 ont été préincubées dans un milieu contenant 20 mM glucose durant 16 heures. A l'issue de la préincubation, la suspension cellulaire a été divisée en six essais (6.10^5 cellules/essai). Ces cellules ont alors été incubées dans 1 mL de milieu de marquage contenant différentes concentrations en glucose froid, comprises entre 0 et 20 mM, et une concentration constante en [2-^{3}H] mannose (5 µCi - 0,35 µM).

Après incubation, les glycoprotéines intracellulaires ont été précipitées sur des membranes en fibres de verre, cette méthode offrant l'avantage de pouvoir mesurer rapidement (après environ 30 minutes) la radioactivité incorporée dans les glycoprotéines néosynthétisées. L'influence de la concentration en glucose du milieu de marquage sur la radioactivité incorporée dans les glycoprotéines est présentée sur la figure IV.2.

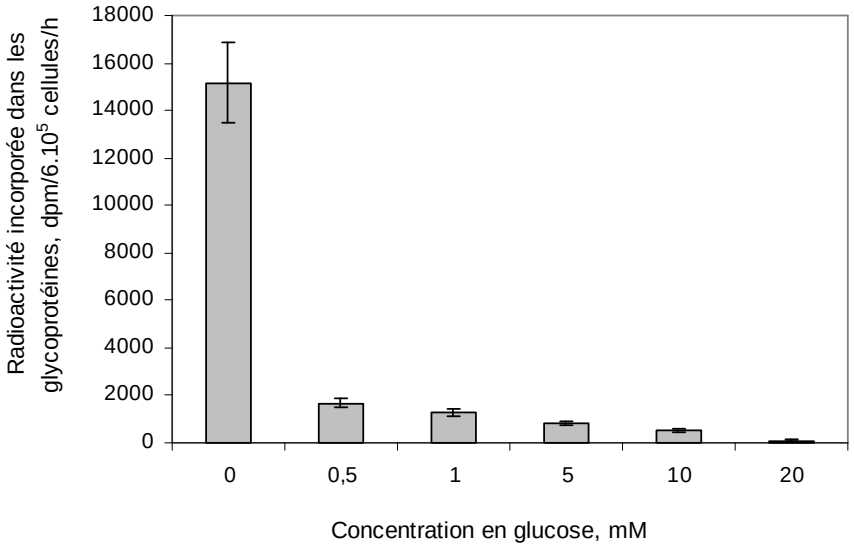


Figure IV.2 : Influence de la concentration en glucose du milieu de marquage sur l'incorporation de [2-^{3}H] mannose dans les glycoprotéines intracellulaires néosynthétisées (6.10^5 cellules CHO C5 /essai).

Pour des concentrations en glucose comprises entre 0,5 et 20 mM, la radioactivité incorporée dans les glycoprotéines est relativement faible et comprise entre 500 et 1800 dpm. En revanche, le marquage effectué dans un milieu contenant 0 mM de glucose permet d'augmenter d'un facteur 10 l'incorporation de [2-^{3}H] mannose dans les glycoprotéines par rapport au milieu contenant 0,5 mM de glucose. Il apparaît ainsi que l'absence totale de glucose dans le milieu de marquage semble favoriser l'entrée et l'utilisation du [2-^{3}H] mannose dans les cellules CHO C5.

Néanmoins, on peut supposer que cette limitation en glucose n'est pas négligeable pour le métabolisme cellulaire. En effet, le fait d'effectuer le marquage sans glucose, source d'énergie et de carbone pour les cellules, n'est pas anodin et amène à se demander si l'absence totale de glucose durant 1 heure ne perturberait pas le métabolisme cellulaire. Ainsi, les résultats obtenus à l'issue du marquage pourraient ne pas refléter de l'état physiologique des cellules au moment où s'effectue le prélèvement dans le bioréacteur. Les travaux de Foulquier (2003) ont montré que la structure des glycannes portés par les dol-PP-

oligosaccharides pouvait être altérée lorsque les cellules CHO sont placées dans des conditions de limitation en glucose. Après 20 minutes de limitation en glucose, la structure des glycannes portés par les dol-PP-oligosaccharides est majoritairement de type $Glc_3Man_5GlcNAc_2$ alors qu'après 120 minutes de limitation en glucose (0,175 mM), la structure évolue vers du $Glc_3Man_9GlcNAc_2$. Par ailleurs, Schang *et al*. (2001) ont observé que les cellules CHO soumises à un stress déclenchent l'UPR et synthétisent, dans un premier temps, des structures oligosaccharidiques courtes de type $Glc_3Man_5GlcNAc_2$. Dans un deuxième temps, les cellules s'daptent au stress et allongent la longueur des glycannes des dol-PP-oligosaccharides, pour aboutir à des structures de type $Glc_3Man_9GlcNAc_2$.

La durée du marquage au [2-^{3}H] mannose a été fixée à 1 heure, car l'on considère qu'il s'agit du temps nécessaire pour atteindre un état d'équilibre entre la radioactivité incorporée dans le GDP-Man et celle incorporée dans le dol-P-Man (Varki, 1994). En effet, après 1 heure de marquage, il est estimé qu'autant dol-P-Man que de GDP-Man sont marqués. Au contraire, si la durée d'incubation des cellules en présence de [2-^{3}H] mannose est trop courte, seul le GDP-Man sera marqué. Dans ces conditions, les résultats seront faussés car davantage de structures incorporant le GDP-Man, c'est-à-dire de type $Glc_3Man_5GlcNAc_2$, seront générées.

Il est à noter que la quantité de [2-^{3}H] mannose utilisé pour les réactions de glycosylation reste très faible. Panneerselvam *et al*. (1997) ont montré que 7 à 14% du [2-^{3}H] mannose était utilisé pour la glycosylation dans des fibroblastes, tandis que le reste de la radioactivité (86 à 93%) se retrouvait sous forme de ^3H_2O. Ainsi, compte-tenu de la faible incoporation et utilisation de [2-^{3}H] mannose par les cellules, la présence de glucose, même en très faible concentration, est susceptible de limiter fortement l'incorporation de mannose radioactif.

En résumé, il apparaît clairement que la synthèse des structures glycanniques portées par les dol-PP-oligosaccharides est fortement influencée par les conditions de culture. Il faudra ainsi garder à l'esprit tous les points critiques énoncés précédemment lorsque seront réalisés les marquages métaboliques au [2-^{3}H] mannose, et effectuer l'interprétation des résultats avec prudence.

1.2.2 Influence de la concentration en [2-^{3}H] mannose du milieu de marquage sur l'incorporation de radioactivité dans les dol-PP-oligosaccharides

L'influence de la quantité de [2-^{3}H] mannose dans le milieu de marquage sur l'incorporation de la radioactivité dans les dol-PP-oligosaccharides a été déterminée. Afin d'augmenter la concentration en [2-^{3}H] mannose lors du marquage, le volume du milieu de marquage a été diminué en maintenant une quantité constante de [2-^{3}H] mannose (100 µCi /essai).

Les cellules CHO C5 (2.10^6 cellules/essai) ont été préincubées dans le milieu RPMI sans sérum, en présence de 20 mM de glucose durant 16 heures. Après incubation, les culots cellulaires ont été resuspendus dans le milieu de marquage, dont le volume était compris entre 0,25 et 1 mL (tableau IV.1).

Tableau IV.1 : Volumes des milieux de marquage utilisés pour effectuer les 3 essais.

	Essai 1	**Essai 2**	**Essai 3**
Volume du milieu de marquage (mL)	1	0,5	0,25
Concentration en [2-^{3}H] Mannose dans l'échantillon marqué (µM)	7	14	28
Concentration cellulaire (10^6 cellules/mL)	2	4	8

Après incubation, l'extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques a été réalisée selon le protocole de Cacan et Verbert (1995) de façon à mesurer la radioactivité incorporée dans la fraction contenant les dol-PP-oligosaccharides.

Les résultats de l'incorporation de radioactivité dans les dol-PP-oligosaccharides en fonction de la concentration en mannose dans le milieu de marquage utilisé sont présentés sur la figure IV.3. Plus la concentration en [2-^{3}H] mannose est élevée, plus l'incorporation de radioactivité dans les dol-PP-oligosaccharides est importante. Bien que la quantité de cellules soit identique dans chaque essai (2.10^6 cellules), la réduction du volume du milieu de marquage induit une augmentation de la densité cellulaire de 2.10^6 à 8.10^6 cellules/mL.

En revanche, la quantité de [2-^{3}H] mannose par 10^6 cellules demeure constante et égale à 3,5 µM/10^6 cellules dans les trois essais réalisés.

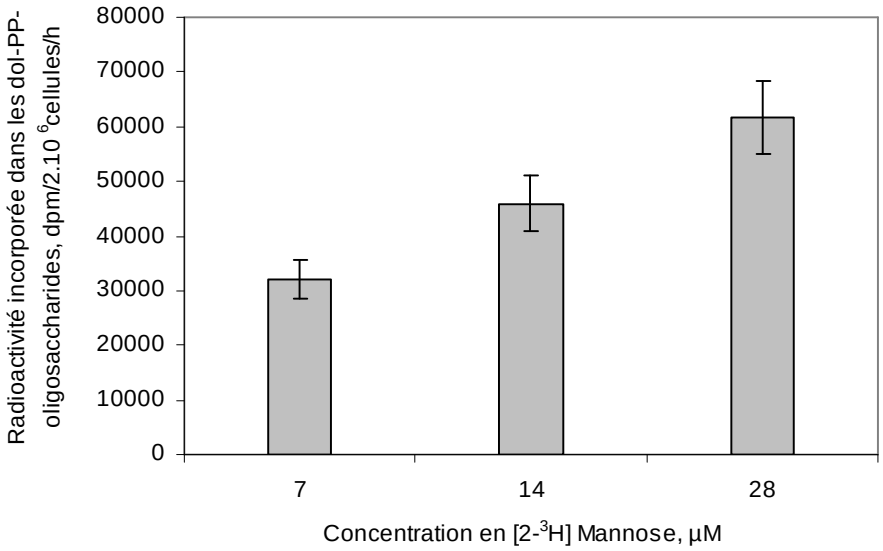


Figure IV.3 : Influence de la concentration en [2-^{3}H] mannose sur l'incorporation de [2-^{3}H] mannose dans les dol-PP-oligosaccharides (2.10^6 cellules CHO C5/essai).

Les mécanismes d'entrée du mannose dans les cellules animales par les transporteurs sont sujets à controverse. En effet, le mannose peut entrer dans les cellules par un transporteur de glucose tel GLUT1 (Gould et Holdman, 1993). Dans ce cas, le transporteur de glucose possède un Km pour le mannose de l'ordre de la millimole par litre. Toutefois, l'existence d'un transporteur spécifique du mannose, a également été mise en évidence dans les cellules animales (Panneerselvam et Freeze, 1996). Celui-ci possède un Km de 30-70 µM pour le mannose en présence de 5 mM glucose et 50 µM mannose. Cependant, le transport du mannose dans les fibroblastes est inhibé de 50% lorsque le glucose est présent en très large excès (5000 fois plus). Les concentrations en mannose testées dans nos expériences se situent en dessous de la constante d'affinité du transporteur de mannose, suggérant ainsi qu'un ajout de mannose favorise la cinétique de transport du [2-^{3}H] mannose dans les cellules.

Il est important de souligner que la radioactivité incorporée mesurée dans les différentes espèces glycanniques est le résultat de deux phénomènes : l'entrée du [2-^{3}H] mannose dans les cellules *via* les transporteurs membranaires et son incorporation dans les différents précurseurs impliqués dans le cycle des dolichols. Après 1 heure de marquage, il paraît évident que les résultats traduisent davantage l'incorporation du mannose dans les divers précurseurs intracellulaires que l'entrée du [2-^{3}H] mannose, l'entrée de l'isotope

radioactif dans les cellules se produisant par ailleurs en seulement quelques minutes (Rodriguez *et al*., 2005). Ainsi, les résultats d'incorporation de la radioactivité que nous mesurons sont davantage le reflet de l'utilisation du [2-^{3}H] mannose dans les intermédiaires et les précurseurs de la glycosylation que son entrée dans les cellules *via* les transporteurs. D'autant plus que les réactions de biosynthèse intracellulaires incorporant le [2-^{3}H] mannose constituent généralement les étapes limitantes en comparaison avec les cinétiques de transport (Rodriguez *et al*., 2005).

Ainsi, dans les expérimentations suivantes, l'extraction séquentielle et le suivi de l'évolution de la qualité des structures glycanniques associées aux dol-PP-oligosaccharides au cours des cultures nécessiteront l'utilisation de 4.10^6 cellules. Afin de ne pas trop concentrer les cellules dans un volume réduit de milieu de culture, nous choisirons de conserver un volume de 1 mL.

1.2.3 Influence de l'ajout de mannose froid dans le milieu de marquage sur l'incorporation de radioactivité dans les dol-PP-oligosaccharides

Une stratégie alternative pour augmenter la concentration de [2-^{3}H] mannose a consisté en l'ajout de mannose froid dans le milieu de marquage. L'augmentation de la concentration en mannose total devrait accroître l'entrée de mannose dans les cellules, mais également favoriser son incorporation les dérivés du mannose (GDP-Man, dol-P-Man…) *via* les enzymes de la N-glycosylation. Il s'agit alors de trouver un compromis entre la concentration en mannose froid et la concentration en mannose radioactif, de façon à minimiser la dilution isotopique. Sachant que la concentration en mannose radioactif est équivalente à 7 µM (100 µCi), trois concentrations en mannose froid, comprises entre 0 et 7 µM, ont été testées (tableau IV.2). Après marquage de 1.10^6 cellules, l'extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques a été réalisée selon le protocole de Cacan et Verbert (1995) de façon à mesurer la radioactivité incorporée dans la fraction contenant dol-PP-oligosaccharides.

Tableau IV.2 : Concentrations en mannose froid, en mannose marqué et concentration totale en mannose dans le milieu de marquage.

	Essai 1	**Essai 2**	**Essai 3**
Concentration en mannose froid	0 µM	7 µM	14 µM
Concentration en [2-^{3}H] mannose (100 µCi)	7 µM	7 µM	7 µM
Concentration en mannose totale	7 µM	14 µM	21 µM

Comme attendu, l'ajout de concentrations croissantes en mannose froid augmente l'incorporation de [2-^{3}H] mannose dans les dol-PP-oligosaccharides (figure IV.4). L'augmentation de la radioactivité incorporée dans les dol-PP-oligosaccharides suit une évolution de type exponentielle à mesure que la quantité de mannose totale augmente. La concentration maximale testée (21 µM) est inférieure au Km du transporteur spécifique du mannose; ainsi il est probable qu'une augmentation de la concentration en mannose favorise son entrée dans les cellules. On peut également supposer que si davantage de mannose rentre dans les cellules, il sera incorporé en plus grande quantité dans les différents précurseurs impliqués dans le processus de N-glycosylation. Un raisonnement identique au précédent peut être appliqué pour expliquer la relation entre la quantité accrue de radioactivité incorporée dans les dol-PP-oligosaccharides et l'augmentation concentration en mannose total dans le milieu de marquage. En considérant que l'incorporation du mannose dans les différents précurseurs de la glycosylation constitue généralement l'étape limitante, on peut supposer qu'à partir d'une concentration voisine de 21 µM, le [2-^{3}H] mannose n'est plus utilisé aussi efficacement dans les réactions de biosynthèse.

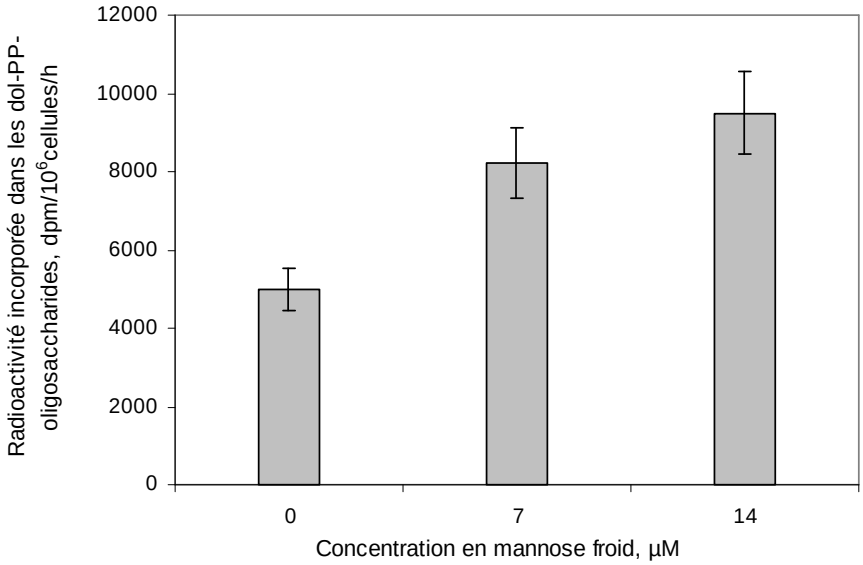


Figure IV.4 : Influence de la concentration en mannose froid du milieu de marquage sur l'incorporation de [2-^{3}H] mannose dans les dol-PP-oligosaccharides (1.10^6 cellules CHO C5/essai). Les cellules ont été préalablement préincubées durant 16 heures dans le milieu RPMI sans sérum contenant 20 mM de glucose.

Il s'agit néanmoins de ne pas trop ajouter de mannose froid de façon à ne pas diluer le [2-^{3}H] mannose et gêner son incorporation. En présence de 14 µM de mannose froid dans le milieu de marquage, la radioactivité incorporée dans les dol-PP-oligosaccharides est significativement augmentée, suggérant que les marquages au [2-^{3}H] mannose pourront être réalisés dans ces conditions dans les expériences suivantes.

1.3 Conclusion

L'incorporation de [2-^{3}H] mannose dans les cellules, et en particulier dans les dol-PP-oligosaccharides, a pu être améliorée en réalisant le marquage dans un milieu totalement dépourvu de glucose, auquel sont ajoutés 14 µM de mannose froid. Les conditions retenues pour réaliser les marquages métaboliques au cours d'une culture discontinue de cellules CHO sont résumées dans le tableau IV.3.

Tableau IV.3 : Récapitulatif des conditions de marquage retenues.

Quantité de cellules vivantes	4.10^6
Temps de marquage	1 heure
Volume du milieu de marquage	1 mL
Concentration en glucose	0 mM
Quantité de [2-^{3}H] mannose	100 µCi (7µM)
Concentration en mannose froid	14 µM

2. Analyse qualitative des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides au cours d'une culture discontinue de cellules CHO C5 cultivées en milieu RPMI sans sérum

Les conditions de marquage et d'hydrolyse définies précédemment permettent une analyse CLHP des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides et ont été appliquées à une culture discontinue de cellules CHO C5, cultivées en milieu RPMI sans sérum, afin de caractériser les différentes populations oligosaccharidiques au cours du temps, et en particulier les structures glycanniques des dol-PP-oligosaccharides et des glycoprotéines néosynthétiésés. L'objectif était de vérifier s'il existait un lien entre la modification de la structure des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides et la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ en début de culture.

La cinétique de référence a été réalisée avec les cellules CHO C5, productrices d'IFN-γ. Le milieu de base utilisé pour effectuer la culture est le milieu RPMI 1640 sans sérum, supplémenté par de la glutamine (concentration finale de 4 mM) et du glucose (concentration finale de 20 mM). La culture discontinue a été mise en oeuvre en flacon agité (volume utile de 250 mL). Afin de suivre et caractériser l'évolution des différentes populations oligomannosidiques au cours du temps, les marquages au [2-^{3}H] mannose ont été effectués aux temps suivants : 0, 23, 32, 47, 57, 73, 81 et 96 heures, selon les conditions définies dans le paragraphe précédent.

2.1 Croissance, décès et métabolisme des cellules CHO C5 cultivées en milieu RPMI sans sérum en mode discontinu

Les cinétiques de croissance et de décès cellulaires, de production d'IFN-γ, de consommation de glucose et de glutamine, de production de lactate et d'ions ammonium au cours d'une culture discontinue de cellules CHO C5, cultivées dans le milieu RPMI sans sérum, sont présentées sur la figure IV.5.

La densité de cellules viables atteint une valeur maximale de 6.10^5 cellules/mL au bout de 96 heures de culture tandis que la vitesse spécifique maximale de croissance cellulaire de 0,024 h^{-1} est atteinte après environ 30 heures de culture. La production d'IFN-γ, associée à la croissance, atteint une concentration maximale d'environ 0,7 µg/mL en fin de culture. La vitesse spécifique maximale de production d'IFN-γ est de 0,028 $\mu g/10^5$ cellules/h après 35 heures.

Au cours de la culture, la concentration en glucose décroît parallèlement à la croissance pour atteindre une valeur voisine de 6 mM en fin de culture, suggérant que l'arrêt de la croissance cellulaire n'est pas dû à une limitation en glucose. La concentration en lactate augmente de façon inversement proportionnelle pour atteindre une concentration maximale de 13 mM.

Tout comme le glucose, la concentration en glutamine décroît de manière inversement proportionnelle à la croissance cellulaire. En fin de culture, la glutamine est présente dans le milieu de culture à une concentration faible, de l'ordre de 0,5 mM. Les ions ammonium dérivent du métabolisme de dégradation de la glutamine et s'accumulent au fur et à mesure de la culture. On peut noter que le comportement cinétique des cellules CHO C5 au cours de cette culture discontinue effectuée en flacon agité est relativement comparable à celui observé au cours d'une culture discontinue réalisée en bioréacteur (chapitre III).

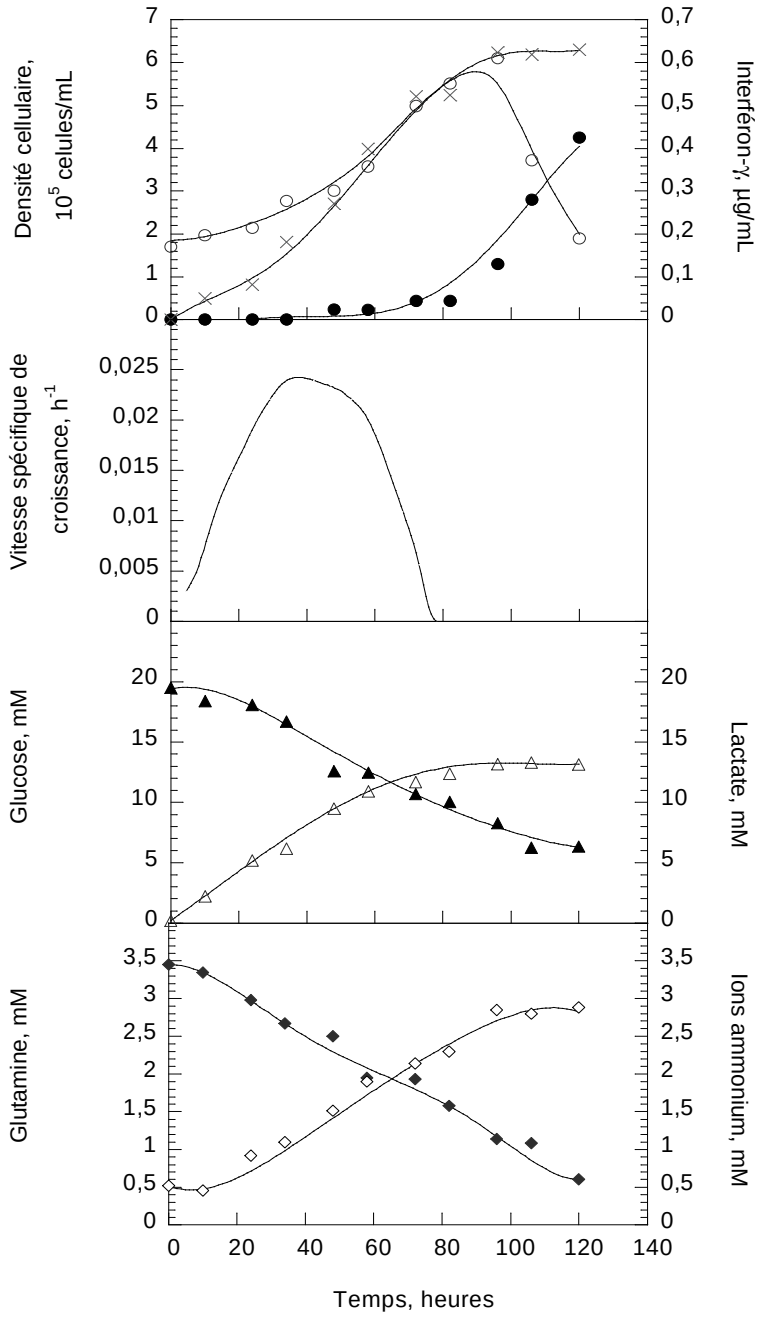


Figure IV.5 : Cinétique de croissance (○), de décès cellulaire (●), de production d'IFN-γ (×), de consommation de glucose (▲) et de glutamine (◆), de production de lactate (Δ) et d'ions ammonium (◇) d'une culture discontinue de cellules CHO C5, cultivées en milieu RPMI sans sérum.

2.2 Evolution de la capacité des cellules CHO C5 à incorporer le mannose radioactif au cours d'une culture discontinue

L'objectif est ici de suivre l'évolution de la capacité des cellules CHO C5 à incorporer le [2-^{3}H] mannose lors de tests de marquage des glycoprotéines. Comme indiqué précédemment lors de la mise au point du marquage radioactif, l'intégration du mannose radioactif intracellulaire est la résultante de deux composantes : l'entrée du [2-^{3}H] mannose dans les cellules *via* un/plusieurs système(s) de transporteur(s) et son utilisation, notamment dans les réactions de la glycosylation. Ainsi, on souhaite vérifier, tout au long de la culture, que : (i) le mannose radioactif est incorporé dans les cellules, et ce par la détermination de la quantité de radioactivité intracellulaire totale, (ii) le mannose est utilisé pour les réactions de la glycosylation, à l'aide de la mesure de la radioactivité incorporée dans les quatre populations oligomannosidiques.

Le marquage a été effectué avec 4.10^6 cellules CHO C5 issues des prélèvements réalisés à différents temps de la culture discontinue, en flacon agité, dans les conditions retenues précédemment. Après incubation dans le milieu de marquage, les cellules ont été lysées par une solution de PBS contenant 1% de SDS et la radioactivité totale intracellulaire incorporée a été mesurée. Le protocole d'extraction séquentielle nous a permis de mesurer la radioactivité incorporée dans les quatre populations oligomannosidiques, à savoir les oligosaccharides libres, les dol-PP-oligosaccharides, les glycoprotéines et le dol-P-Man.

La figure IV.6 présente la radioactivité totale incorporée dans les cellules ainsi que la radioactivité incorporée dans les quatre populations oligomannosidiques. La radioactivité intracellulaire totale représente la radioactivité incorporée dans les différents précurseurs oligosaccharidiques impliqués dans la glycosylation, celle présente sous forme de [2-^{3}H] mannose intracellulaire libre ainsi que celle incorporée dans les intermédiaires de biosynthèse sous forme de ^3H_2O, suite à l'isomérisation du [2-^{3}H] mannose en Fru-6-P. On observe une diminution au cours du temps de la radioactivité totale incorporée dans les cellules, avec une chute importante entre 72 heures et 81 heures. La radioactivité incorporée dans les quatre populations oligomannosidiques suit une évolution comparable. Il est à noter qu'une très faible proportion de radioactivité est incorporée dans les quatre populations oligomannosidiques, puisque moins de 0,4% de la radioactivité présente initialement dans le

milieu de marquage est incorporée dans les cellules. Ceci est en accord avec les observations de Panneerselvam *et al*. (1997), qui ont montré qu'un faible pourcentage de radioactivité se trouvait incorporé dans les intermédiaires de la glycosylation.

Quant à la radioactivité incorporée dans les quatre populations oligomannosidiques, elle diminue, elle aussi, légèrement jusqu'à 57 heures de culture, puis la chute est plus brutale à partir de 72 heures pour atteindre une valeur quasi-nulle après 96 heures de culture. Cette diminution observée au cours du temps est vraisemblablement reliée à l'évolution de la physiologie cellulaire : lorsque l'état physiologique des cellules se détériore, on peut supposer que la radioactivité n'est plus incorporée dans les populations oligomannosidiques, en raison du ralentissement des biosynthèses cellulaires. D'autre part, la radioactivité incorporée dans les quatre populations oligomannosidiques chute de façon beaucoup plus importante (diminution de 90% entre 57 heures et 72 heures) que la radioactivité intracellulaire totale (diminution de 25% entre 57 heures et 72 heures). Ainsi, la radioactivité intracellulaire totale mesurée semble être essentiellement le résultat de la présence de [2-^{3}H] mannose sous forme de mannose libre.

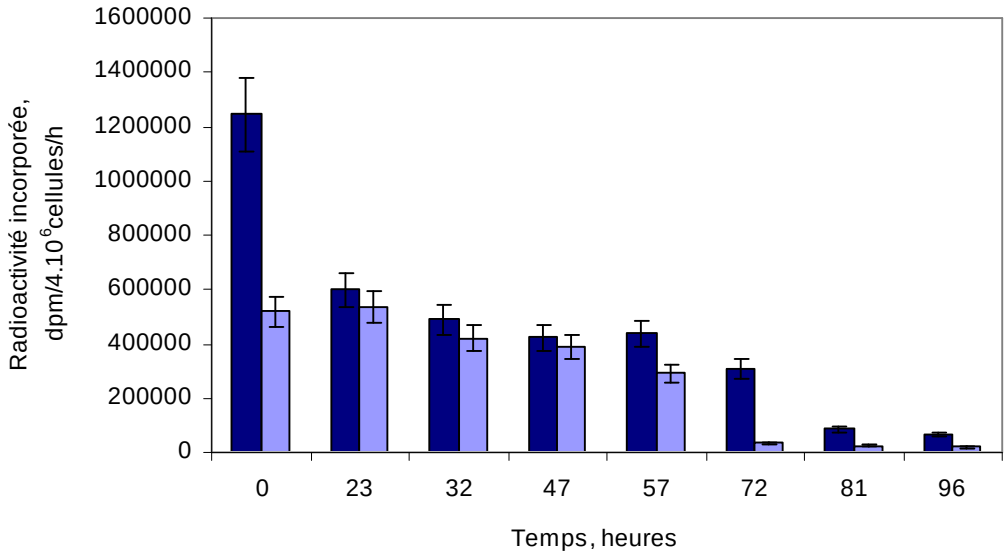


Figure IV.6 : Evolution de la radioactivité intracellulaire totale incorporée dans les cellules (■) et de la radioactivité incorporée dans les quatre populations oligomannosidiques (□) après marquage de 4.10^{6} cellules issues de prélèvements réalisés au cours d'une culture discontinue de cellules CHO C5 cultivées en milieu RPMI sans sérum.

Par conséquent, ces résultats indiquent que l'analyse des différentes populations oligomannosidiques (glycoprotéines néosynthétisées, dol-PP-oligosaccharides, dol-P-Man et oligosaccharides libres) au cours d'une culture discontinue ne sera possible que jusqu'à 57 heures de culture.

2.3 Comparaison des vitesses spécifiques de synthèse des glycoprotéines et des protéines avec la vitesse spécifique de croissance cellulaire

Le suivi de l'évolution des vitesses spécifiques de synthèse des protéines et des glycoprotéines a pour objectif de vérifier leur couplage tout au long de la culture. Une modification de l'évolution de la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines aura des répercussions sur la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines et on peut imaginer qu'un déphasage entre les vitesses spécifiques de synthèse des protéines et des glycoprotéines pourrait, par exemple, expliquer la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ observée au cours d'une culture discontinue de cellules CHO. Les vitesses spécifiques de synthèse des protéines et glycoprotéines ont également été comparées avec la vitesse spécifique de croissance cellulaire.

Pour chaque marquage, les vitesses spécifiques de synthèse en dpm/cellules/h peuvent être déterminées puisque l'on mesure une quantité de radioactivité incorporée (dpm) par quantité de cellules et par heure de marquage. Ainsi, l'utilisation de marquages métaboliques radioactifs permet d'étudier des intermédiaires intracellulaires néosynthétisés (protéines, glycoprotéines, précurseurs oligosaccharidiques…). La vitesse spécifique de synthèse des protéines, à chaque instant de la culture, a été déterminée à l'aide d'un marquage à la ^{35}S méthionine, alors que la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines a été suivie à l'aide d'un marquage au [2-^{3}H] mannose.

La figure IV.7 présente l'évolution des vitesses spécifiques de synthèse des glycoprotéines, des protéines et la vitesse spécifique de croissance cellulaire. Il apparaît que l'évolution des vitesses spécifiques de synthèse des protéines et glycoprotéines suivent une évolution comparable au cours du temps et peuvent être reliées à l'évolution de la vitesse spécifique de croissance cellulaire. Lorsque les cellules sont en phase de ralentissement de croissance, après environ 40 heures de culture, les vitesses spécifiques de synthèse diminuent également.

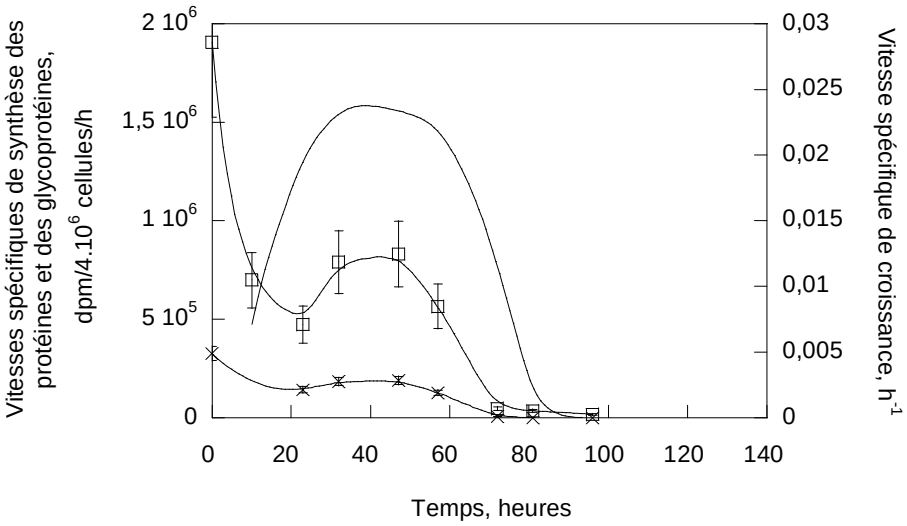


Figure IV.7 : Evolution des vitesses spécifiques de synthèse des protéines (□), des glycoprotéines (×) et de la vitesse spécifique de croissance cellulaire (–).

Le taux de glycosylation, défini comme étant le rapport de la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines sur la vitesse spécifique de synthèse des protéines (Crick *et al*., 1994), reste stable jusqu'à environ 60 heures de culture, avant de diminuer (figure IV.8). Le taux de glycosylation est maximal aussi longtemps que les cellules sont en phase de croissance. Ainsi, il semblerait que la glycosylation diminue lorsque les cellules entrent en phase de ralentissement de croissance, au bout de 60 heures de culture. Andersen *et al*. (2000) ont établi une relation entre l'occupation des sites de glycosylation du t-PA et le pourcentage de cellules en phase G0/G1. Quand les cellules réduisent leur croissance, il est plausible le pourcentage de cellules en phase G0/G1 augmente et que le pourcentage de cellules en phase S diminue. Ainsi, la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines est reliée à la vitesse spécifique de synthèse des protéines, et toutes deux sont reliées à la vitesse spécifique de croissance cellulaire. Elles atteignent des valeurs maximales lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance, puis diminuent lorsque les cellules ralentissent leur croissance.

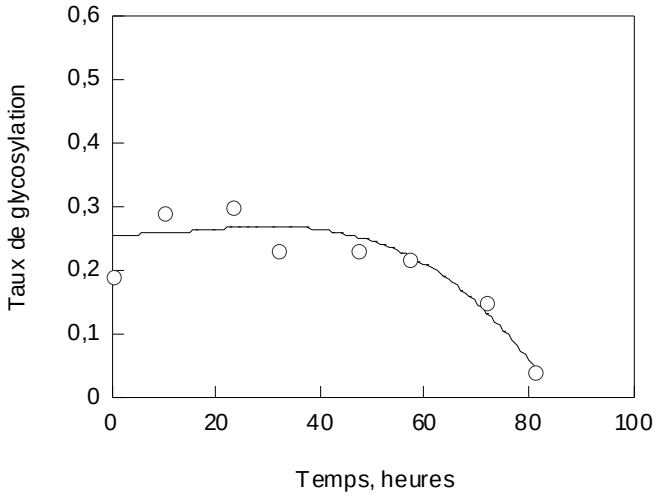


Figure IV.8 : Evolution du taux de glycosylation au cours de la culture discontinue de cellules CHO C5, cultivées en milieu RPMI sans sérum. Le taux de glycosylation est défini comme étant le rapport de la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines sur la vitesse spécifique de synthèse des protéines.

La diminution du pourcentage de glycoformes 2N de l'IFN-γ débute à partir d'environ 40 heures de culture en milieu RPMI sans sérum. Or, le marquage dans les conditions définies préalablement ne nous permet pas d'analyser la structure des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides au-delà de 57 heures de culture. Ainsi, un marquage a été effectué sur 4.10^7 cellules (dix marquages simultanés réalisés avec 4.10^6 cellules) prélevées après environ 70 heures de culture en mode discontinu. Les résultats des comptages ont révélé qu'il n'y a eu qu'une faible incorporation de [2-^{3}H] mannose, dans les glycannes associés aux protéines ou aux dol-PP-oligosaccharides. A ce stade de la culture (70 heures), les cellules ne sont pas dans un état physiologique permettant une incorporation suffisante de radioactivité pour l'analyse CLHP des structures glycanniques.

2.4 Evolution des vitesses spécifiques de synthèse des différentes populations oligomannosidiques.

Les différents intermédiaires lipidiques sont obtenus à l'issue d'un protocole d'extraction séquentielle, basé sur les différences de solubilité des produits générés par le cycle des dolichols (Verbert et Cacan, 1995).

L'extraction séquentielle génère ainsi trois phases distinctes :

- la phase supérieure aqueuse (OSRM) contenant les éléments les plus polaires (nucléotides-sucres comme le GDP-Man, les monosaccharides libres, les oligosaccharides libres comme les $OSGn_1$ et les $OSGn_2$).
- l'interphase contenant le matériel insoluble. Elle regroupe deux fractions :
  - les protéines nouvellement synthétisées
  - les dol-PP-oligosaccharides
- la phase inférieure organique (CM) contenant les précurseurs lipidiques de petite taille tel le Man-P-dol, le Glc-P-dol, le Glc-PP-dol et le $GlcNAc_2$-PP-dol.

La radioactivité incorporée dans chacune des quatre populations oligomannosidiques a été mesurée afin de suivre et déterminer l'évolution des vitesses de synthèses de chacune des populations (figure IV.9). Les vitesses spécifiques de synthèse de chacune des populations oligomannosidiques sont mesurables jusqu'à 57 heures de culture, la quantité de radioactivité incorporée au-delà étant insuffisante pour permettre l'analyse par CLHP couplée à un détecteur de radioactivité.

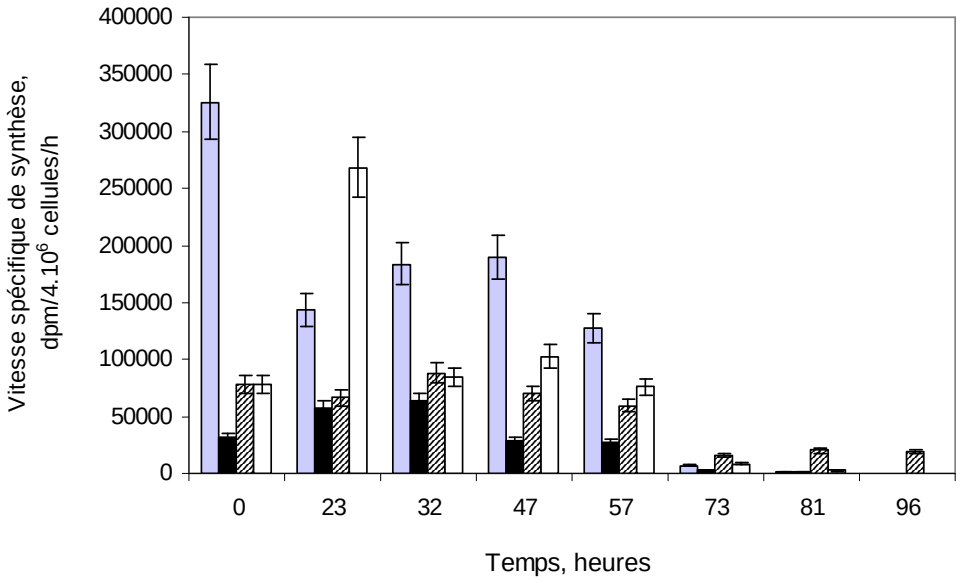


Figure IV.9 : Evolution des vitesses de synthèse des glycoprotéines (□), des dol-PP-oligosaccharides (■), du dol-P-Mannose (▨), des $OSGn_1$, $OSGn_2$ et du GDP-Mannose (□) au cours d'une culture discontinue de cellules CHO C5, cultivées en milieu RPMI sans sérum.

Les pourcentages relatifs de chaque fraction, considérée individuellement, sont présentés sur la figure IV.10. La vitesse spécifique de synthèse des glycannes associés aux protéines est relativement constante jusqu'à 47 heures, pour diminuer ensuite jusqu'à devenir

nulle après 96 heures de culture. La vitesse spécifique de synthèse des dol-PP-oligosaccharides augmente jusqu'à 32 heures, puis reste relativement constante lorsque les cellules sont en fin de phase exponentielle de croissance. On peut ainsi observer que la synthèse des dol-PP-oligosaccharides ainsi que celles des glycoprotéines sont associées à la croissance. En effet, la synthèse des dol-PP-oligosaccharides est maximale lorsque les cellules atteignent leur vitesse spécifique maximale de croissance. Si les cellules ont une vitesse spécifique de croissance amoindrie, elles diminuent également les vitesses de synthèses, y compris celle des glycoprotéines et des dol-PP-oligosaccharides.

Les vitesses spécifiques de synthèse des oligosaccharides libres ($OSGn_1$, $OSGn_2$) et du GDP-Man, restent globalement stables, ce qui signifie qu'il n'y a pas d'augmentation du processus de dégradation des glycannes associés aux protéines. En effet, les $OSGn_1$ et $OSGn_2$ peuvent avoir deux origines. Anumula et Spiro (1983) ont montré que la formation des $OSGn_2$ entrait en compétition avec la glycosylation des protéines et que l'OST utilisait le même substrat pour glycosyler les protéines et générer les $OSGn_2$, afin d'ajuster le taux de précurseurs oligosaccharidiques à la synthèse protéique. Par la suite, d'autres travaux ont révélé que les $OSGn_1$ et $OSGn_2$ trouvaient également leur origine dans un processus de dégradation des protéines mal conformées (Duvet *et al*., 1998; Hughes, 1997). En effet, les protéines ne possédant pas une conformation tridimensionnelle correcte sont dégradées dans le protéasome ; un prérequis nécessaire aux réactions de dégradation consiste en l'élimination de la partie glycannique par une PNGase cytosolique (Hirsch *et al.*, 2003; Suzuki *et al*., 1998). Dans notre cas, les taux d'$OSGn_1$ et $OSGn_2$ demeurent constants tout au long de la culture (à l'exception du temps cinétique 23 heures, que l'on peut considérer comme étant un point aberrant), suggérant que le taux de dol-PP-oligosaccharides n'est pas en excès pour le processus de glycosylation.

La radioactivité présente dans la fraction contenant le dol-P-Man est stable jusque 57 heures, puis augmente. Au bout de 96 heures de culture, la totalité de la radioactivité se retrouve dans cette fraction, ce qui laisse penser que les cellules ne synthétisent plus alors que de courtes espèces oligosaccharidiques, probablement en raison de la dégradation de l'état physiologique des cellules et de l'amoindrissement de leur capacités de biosynthèse.

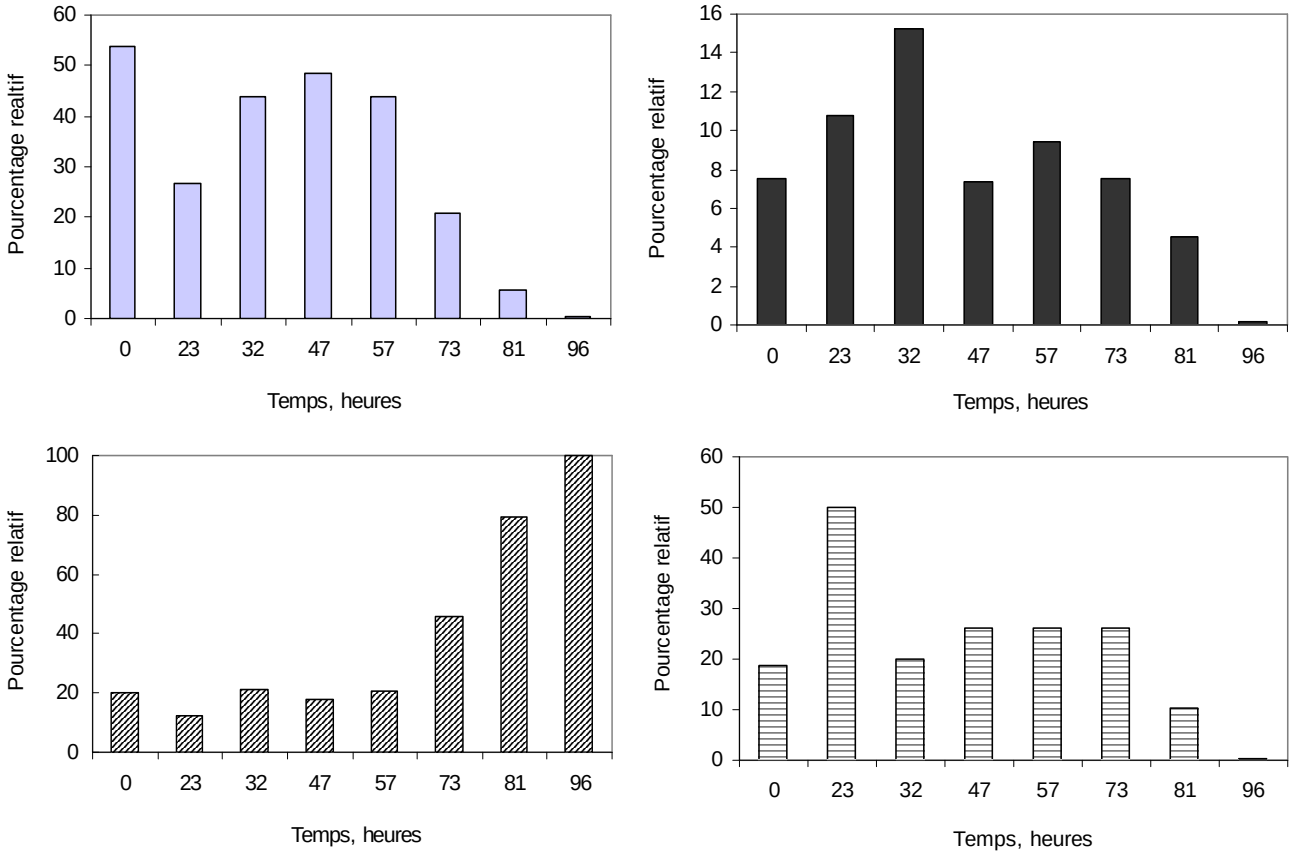


Figure IV.10 : Pourcentage relatif de radioactivité incorporée dans les glycoprotéines néosynthétisées (□), les dol-PP-oligosaccharides (■), le dol-P-Man (▨), les $OSGn_1$, $OSGn_2$ et le GDP-Man (⊟), au cours d'une culture discontinue de cellules CHO C5 cultivées en milieu RPMI sans sérum. L'extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques a été effectuée avec 4.10^6 cellules préalablement marquées au [2-^{3}H] mannose.

2.5 Analyse de la structure des glycannes par CLHP couplée à un détecteur de radioactivité

Les structures des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides, aux glycoprotéines ainsi qu'aux oligosaccharides libres ont été analysées par CLHP couplée à un détecteur de radioactivité au cours d'une culture discontinue de cellules CHO C5, en milieu RPMI sans sérum. Les différentes structures glycanniques ont été identifiées grâce à leurs temps d'élution, par comparaison avec un profil d'un mélange d'oligosaccharides standards (figure IV.11).

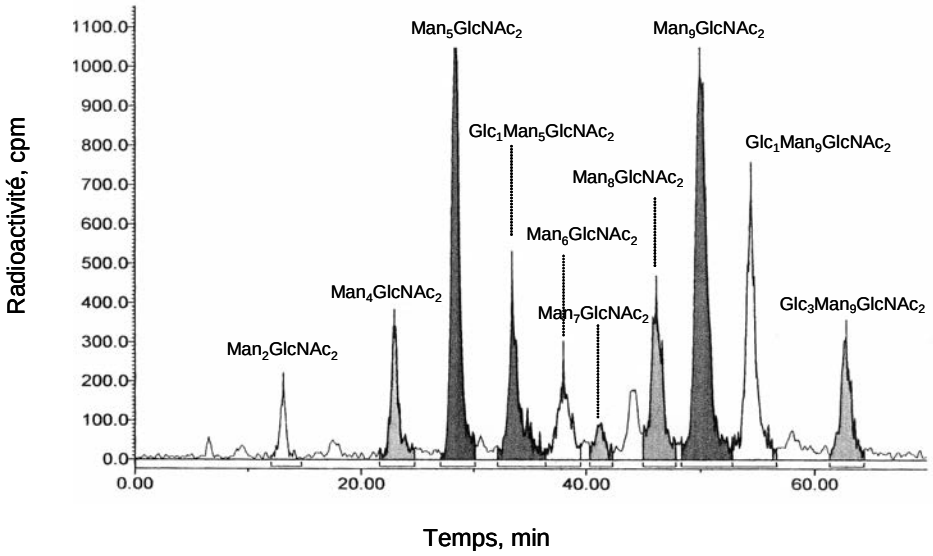


Figure IV.11 : Mélange standard d'oligosaccharides séparés et analysés par CLHP couplée à un détecteur de radioactivité.

2.5.1 Structure des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides

Au regard de la quantité de radioactivité incorporée dans les dol-PP-oligosaccharides, seuls les prélèvements effectués aux temps 0, 23, 32, 47 et 57 heures sont analysables en CLHP. Aucune évolution de la structure des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides n'est observée jusqu'à 57 heures de culture. Dans tous les cas, l'espèce majoritaire est le $Glc_3Man_9GlcNAc_2$, précurseur classiquement transféré sur les protéines en voie de synthèse (figure IV.12). Ainsi, il semble que la qualité des précurseurs oligosaccharidiques (dol-PP-oligosaccharides) ne soit pas responsable de la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ observée après 40 heures de culture.

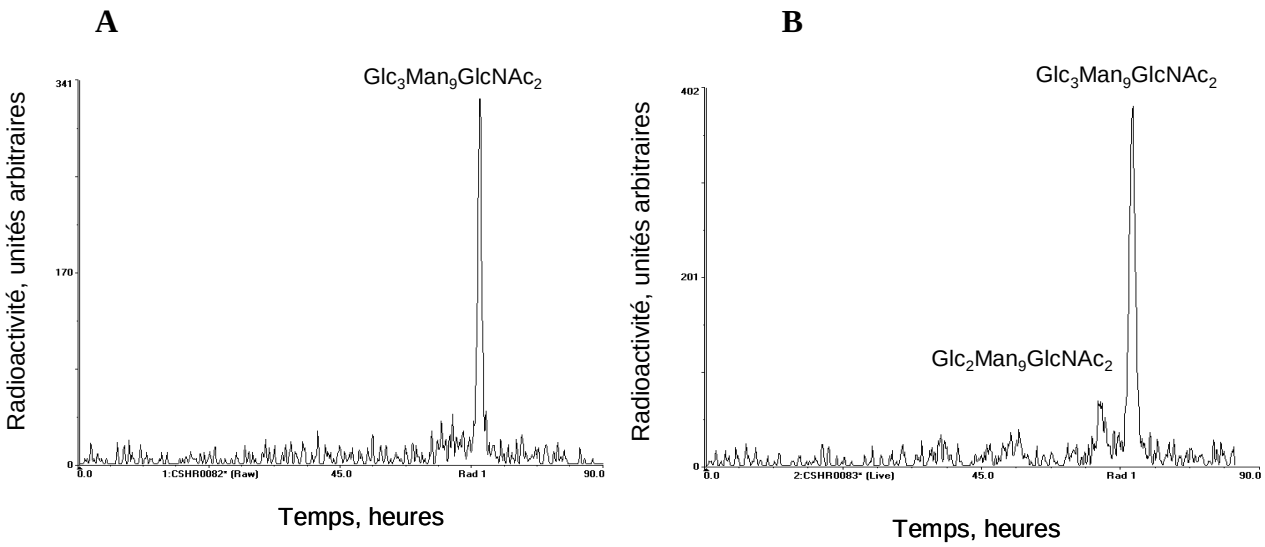


Figure IV.12 : Chromatogrammes CLHP des glycannes portés par les dol-PP-oligosaccharides (A : 0 heures, B : 57 heures).

2.5.2 Structure des glycannes associés aux protéines

Les chromatogrammes CLHP des glycannes portés par les protéines aux temps cinétiques de 0 et 57 heures sont présentés sur la figure IV.13. Trois espèces glycanniques majeures sont associées aux protéines : le $Glc_1Man_9GlcNAc_2$, le $Man_9GlcNAc_2$ et le $Man_8GlcNAc_2$.

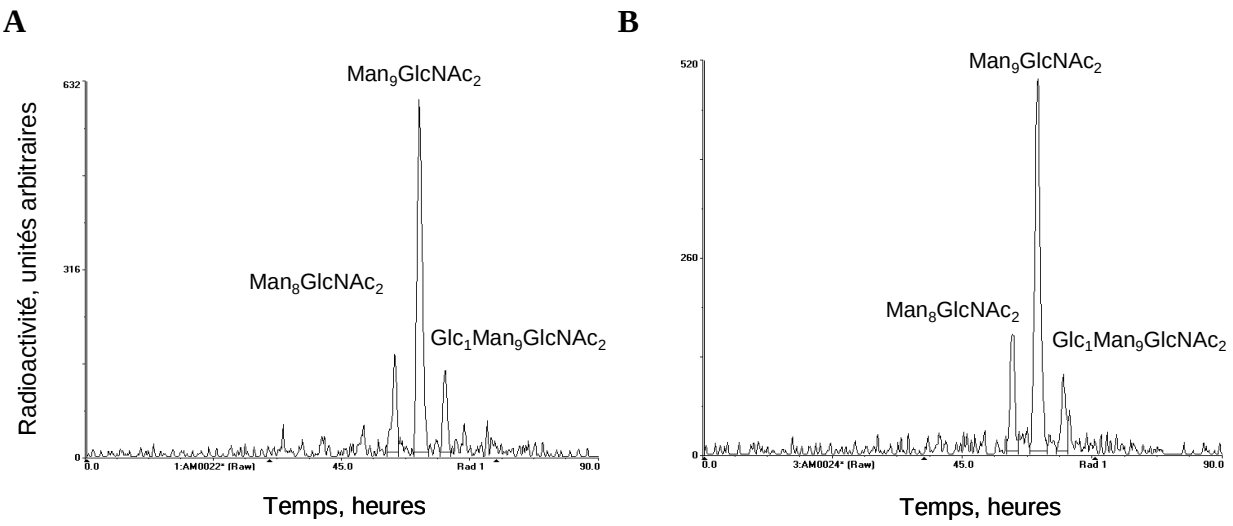


Figure IV.13 : Chromatogrammes CLHP des glycannes associés aux protéines (A : 0 heures, B : 57 heures).

Lorsque le précurseur glycannique est transféré sur la protéine néosynthétisée, il subit très vite une étape de maturation, qui commence dans le RER mais dont les principales étapes sont effectuées dans l'appareil de Golgi. La présence de $Glc_1Man_9GlcNAc_2$, $Man_9GlcNAc_2$, $Man_8GlcNAc_2$ témoigne de ce processus de maturation réticulaire. En effet, le dernier résidu de glucose transféré sur le précurseur glycannique est très rapidement retiré par la glucosidase I. La glucosidase II peut alors retirer les deux derniers résidus de glucose liés en α1,3. Enfin, c'est la mannosidase I du RER qui élimine un résidu mannose lié en α1,2, ce qui donne naissance au glycanne de structure $Man_8GlcNAc_2$.

Pour chaque prélèvement effectué au cours de la culture discontinue de cellules CHO C5 cultivées en milieu RPMI sans sérum, la structure des glycannes portés par les protéines demeure inchangée. L'évolution des pourcentages relatifs de chaque espèce glycannique (tableau IV.4) confirme que le profil des glycannes associés aux protéines est constant pour les prélèvements analysables de la culture.

Tableau IV.4 : Pourcentages relatifs des espèces glycanniques $Man_8GlcNAc_2$, $Man_9GlcNAc_2$ et $Glc_1Man_9GlcNAc_2$ portées par les protéines néosynthétisées au cours de la culture discontinue de cellules CHO C5 cultivées en milieu RPMI sans sérum.

	0 heures	**23 heures**	**32 heures**	**46 heures**	**57 heures**
$Man_8GlcNAc_2$	16,6	16,5	17,2	19,2	18,4
$Man_9GlcNAc_2$	70,1	69,3	69,9	71,8	69,8
$Glc_1Man_9GlcNAc_2$	13,3	10,2	12,8	9	11,8

2.5.3 Structure des oligosaccharides libres

Les travaux de Cacan *et al*. (1980) et Spiro *et al*. (1979) ont montré que le processus de N-glycosylation s'accompagnait de la libération d'oligosaccharides solubles de type oligomannosidique dans la lumière du RER. L'étude la structure de ces oligomannosides neutres a montré qu'une partie d'entre eux possédait deux résidus GlcNAc en position terminale réductrice ($OSGn_2$). Les espèces présentes majoritairement à chaque point cinétique de la culture sont le $Glc_1Man_9GlcNAc_2$, le $Man_9GlcNAc_2$, le $Man_8GlcNAc_2$, le $Man_8GlcNAc_1$ et le $Man_5GlcNAc_1$ (figure IV.14).

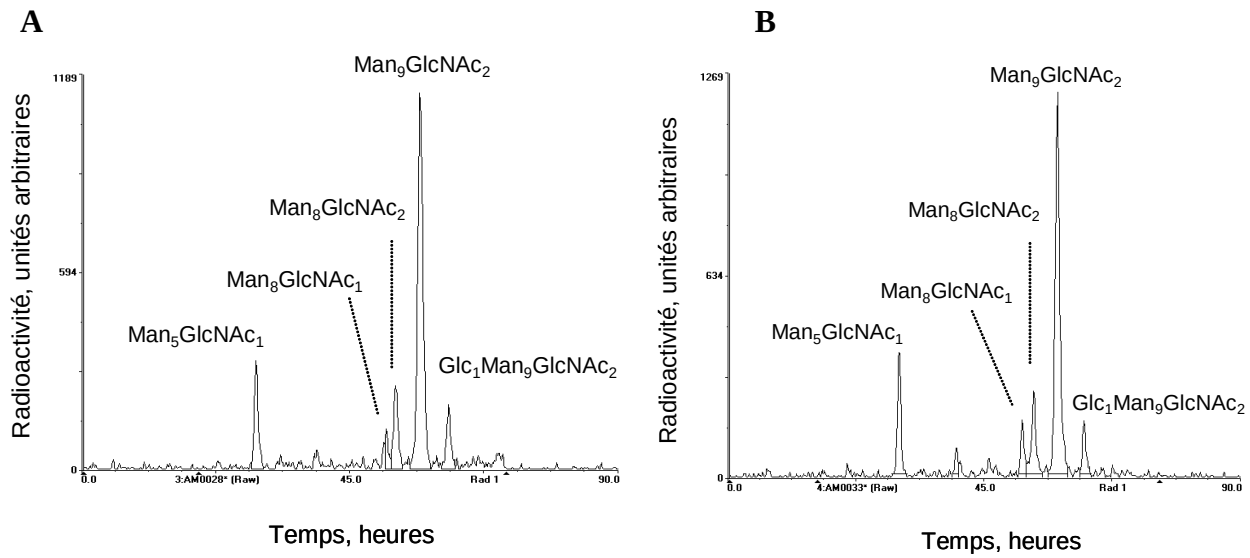


Figure IV.14 : Chromatogrammes CLHP des oligosaccharides libres (A : 0 heures, B : 57 heures).

Plusieurs études ont montré que la libération d'oligosaccharides libres accompagnait la biosynthèse des glycoprotéines. Les oligosaccharides libres $OSGn_1$ et $OSGn_2$ peuvent avoir deux origines :

- Les $OSGn_1$ et $OSGn_2$ peuvent résulter du transfert du précurseur oligosaccharidique $Glc_3Man_9GlcNc_2$ sur une molécule d'eau. En effet, des travaux effectués *in vitro* ont montré que la libération des $OSGn_2$ était fortement diminuée en présence d'un large excès d'accepteur peptidique exogène suggérant que la même enzyme, à savoir l'OST, pouvait catalyser à la fois le transfert en bloc de l'oligosaccharide sur un accepteur protéique et produire des $OSGn_2$ en utilisant une molécule d'eau comme accepteur (Spiro et Spiro, 1991). Depuis, il a été montré que la libération des $OSGn_2$ augmentait proportionnellement à la diminution du taux d'accepteur protéique observée en présence d'inhibiteur de la synthèse protéique tel que la cycloheximide (Villers *et al*., 1994).

- Les $OSGn_2$ peuvent également provenir des réactions de déglycosylation des protéines mal conformées engagées dans la voie de maturation (Duvet *et al*., 1998). Cette réaction est alors catalysée par une PNGase cytosolique (Suzuki *et al*., 2002). Cette étape de déglycosylation est nécessaire pour la dégradation dans le protéasome.

Dans les deux cas, les oligosaccharides libres sont sujets au même processus de maturation et dégradation. En effet, sitôt libéré dans la lumière du RER, le précurseur glycannique subit l'étape de maturation réticulaire de façon identique à celle des glycannes portés par les N-glycosylprotéines. Ainsi, les glucosidases I et II hydrolysent très rapidement les résidus de glucose pour donner le $Man_9GlcNAc_2$. La mannosidase I du RER entre en jeu pour donner le

$Man_8GlcNAc_2$, qui quitte rapidement le RER pour rejoindre le compartiment cytosolique (Moore *et al*., 1995). Les $OSGn_2$ cytosoliques sont rapidement convertis en $OSGn_1$ sous l'action d'une chitobiase cytosolique (Cacan *et al*., 1996). Les $OSGn_1$ sont ensuite progressivement démannosylés pour former l'oligomannoside simple $Man_5GlcNAc_1$ (Kmiecik *et al*., 1995) qui est ensuite importé dans les lysosomes pour être dégradé en espèces plus petites et en monosaccharides (Saint-Pol *et al*., 1997).

L'analyse CLHP des structures glycanniques des oligosaccharides libres, entre 0 et 57 heures de culture, montre qu'il ne semble pas y avoir d'évolution de ces structures au cours du temps (figure IV.14). Le suivi de l'évolution des pourcentages relatifs de chaque espèce glycannique au cours de la cinétique est présenté dans le tableau IV.5. Ces pourcentages sont quasiment constants pour les cinq prélèvements analysables, et confirment les résultats précédents en indiquant qu'il n'y pas d'augmentation du processus de dégradation des glycoprotéines.

Tableau IV.5 : Pourcentages relatifs des espèces glycanniques $Man_5GlcNAc_1$, $Man_8GlcNAc_1$, $Man_8GlcNAc_2$, $Man_9GlcNAc_2$ et $Glc_1Man_9GlcNAc_2$ des oligosaccharides libres au cours de la culture discontinue de cellules CHO C5, cultivées en milieu RPMI sans sérum.

	0 heures	**23 heures**	**32 heures**	**46 heures**	**57 heures**
$Man_5GlcNAc_1$	13,4	10,8	11,5	12,3	14,6
$Man_8GlcNAc_1$	3,3	6,6	4,6	5,2	6,2
$Man_8GlcNAc_2$	12	11	12,3	11,1	12,3
$Man_9GlcNAc_2$	62,4	65,7	65,5	66,2	60,3
$Glc_1Man_9GlcNAc_2$	8,9	5,9	6,1	5,2	6,5

2.6 Discussion

Au cours de la culture discontinue de cellules CHO C5 cultivées en milieu RPMI sans sérum, la radioactivité incorporée dans les quatre fractions issues de l'extraction séquentielle diminue au cours du temps. Cette diminution est progressive jusqu'à 60 heures, moment à partir duquel on observe une chute brutale de l'incorporation de [2-^{3}H] mannose. Cette diminution est vraisemblablement à relier à la dégradation de l'état physiologique des cellules, ces dernières étant alors en phase de croissance ralentie.

La vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines reste globalement constante jusqu'à 72 heures. La vitesse spécifique de synthèse des dol-PP-oligosaccharides suit une évolution comparable. Quant à la vitesse spécifique de synthèse des oligosaccharides libres $OSGn_1$ et $OSGn_2$, elle reste relativement stable, ce qui suggère qu'il n'y a pas d'augmentation du processus de dégradation des glycoprotéines néosynthétisées. La vitesse de synthèse du dol-P-Man reste stable en début de cinétique, puis augmente à partir de 72 heures; après 96 heures de culture, seule la biosynthèse de dol-P-Man est mesurée. Il apparaît ainsi que la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ ne puisse être reliée à une diminution signifaicative de la vitesse de synthèse des dol-PP-oligosaccharides.

En ce qui concerne les structures glycanniques associées aux dol-PP-oligosaccharides, celles-ci ne sont analysables par CLHP que juqu'au temps 57 heures de la culture, après quoi les cellules n'incorporent plus suffisamment de radioactivité pour générer des résultats satisfaisants et analysables.

L'analyse par CLHP couplée à un détecteur de radioactivité des structures glycanniques associées aux protéines, des dol-PP-oligosaccharides et des $OSGn_1$ et $OSGn_2$ ne révèle aucune évolution de structure tout au long du procédé discontinu. La seule espèce glycannique détectée sur les dol-PP-oligosaccharides est de type $Glc_3Man_9GlcNAc_2$, précurseur normalement transféré sur les protéines en voie de synthèse. Tout en tenant compte des conditions de marquage réalisées en absence de glucose, on peut supposer que l'hypothèse d'une évolution de la qualité des structures glycanniques associées aux précurseurs oligosaccharidiques n'est pas validée.

Ainsi, la modification de la structure des glycannes portés par les dol-PP-oligosaccharides ne semble pas être responsable de la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ observée après 40 heures de culture en milieu RPMI avec et sans sérum, la possibilité d'une limitation en dol-PP-oligosaccharides, peut être envisagée.

3. Analyse quantitative des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides par « *Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis* » (FACE)

3.1 Principe de la méthode d'analyse

L'utilisation des marquages métaboliques ne permet pas de réaliser une étude quantitative, car il est difficile de déterminer la quantité molaire de chaque espèce glycannique à partir de la quantité de radioactivité incorporée. De plus, la dilution isotopique diffère d'un marquage à l'autre en raison du pool intracellulaire de mannose, dont la concentration dépend de l'état physiologique des cellules (Gao et Lehrman, 2002).

Bien que développée depuis une dizaine d'années par Jackson (1996), la méthode d'analyse par *Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis* (FACE) n'a été appliquée que récemment à la mesure quantitative des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides (Gao et Lehrman, 2002). Les saccharides possédant une extrémité réductrice terminale peuvent réagir avec un fluorophore, contenant un groupement amine primaire, pour former une base de Schiff avec le groupement carbonyl du saccharide. La liaison est stabilisée par réduction pour former une amine secondaire grâce à du cyanoborohydrure de sodium. Le marqueur fluorescent fréquemment utilisé est le 8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonate (ANTS) et sa fixation sur la structure oligosaccharidique et la détection sont indépendantes du nombre de résidus présents par oligosaccharide. Seule une molécule d'ANTS peut se fixer par saccharide. Les oligosaccharides marqués sont ensuite séparés sur un gel d'électrophorèse puis détectés à l'aide d'une caméra CDD sous une lumière UV.

Cette technique est très sensible puisque le seuil de détection de la méthode est de l'ordre de 1 à 2 pmol (Gao, 2005). Un inconvénient majeur réside néanmoins dans la quantité de cellules nécessaire pour effectuer l'analyse car elle se situe en général entre 1.10^7 et 5.10^7 cellules. La technique d'analyse par FACE a ainsi été appliquée à des cultures discontinues de cellules CHO, de façon à quantifier les glycannes associés aux précurseurs oligosaccharidiques au cours d'une culture et établir une éventuelle relation entre la quantité disponible de glycannes associés aux précurseurs et la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ, et ce au cours du temps. Un autre objectif a été d'étudier l'influence potentielle du milieu de culture sur la quantité de précurseurs oligosaccharidiques synthétisés.

Le suivi de l'évolution des quantités de glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides synthétisés a été réalisé tout au long de cultures discontinues, en

bioréacteurs, de cellules CHO C5 cultivées en milieu RPMI sans sérum et de cellules CHO 320 cultivées en milieu RPMI avec sérum et en milieu PF-BDM.

3.2 Détermination du seuil de détection et du pourcentage d'erreur sur la mesure de la méthode FACE

Dans un premier temps, le seuil de détection ainsi que le pourcentage d'erreur sur la mesure ont été déterminés à l'aide de standards. Différentes quantités de DP7 (polymère de 7 unités glucose) ont été déposées sur un gel de polyacrylamide et ces quantités sont comprises entre 5 ng et 100 ng. Le gel obtenu à l'issue de la migration est présenté sur la figure IV.15.

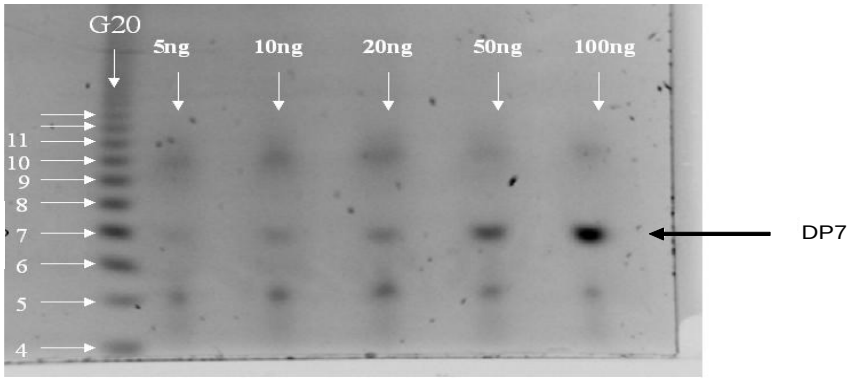


Figure IV.15 : Gel de polyacrylamide réalisé pour la détermination de la sensibilité et le seuil de détection de la méthode FACE.

L'intégration des surfaces détectées en fonction des quantités déposées permet de réaliser une courbe de calibration présentée sur la figure IV.16. Pour des quantités de standard DP7 déposées comprises entre 5 ng et 100 ng, la courbe d'étalonnage évolue linéairement, avec un coefficient de régression r^2 très élevé, égal à 0,99. D'autre part, le seuil de détection peut être fixé à 5 ng. En deçà, le signal est trop faible pour permettre une analyse fiable.

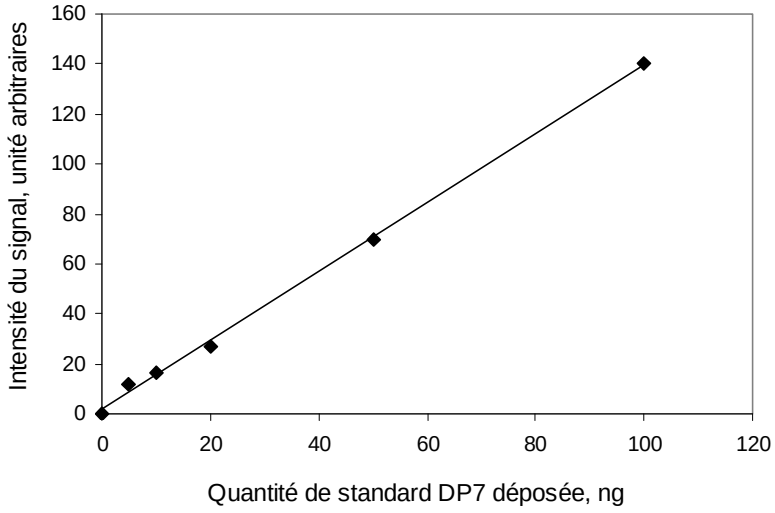


Figure IV.16 : Courbe de calibration établie pour des quantités de standard DP7 comprises entre 5 ng et 100 ng.

Le pourcentage d'erreur sur la mesure a également été estimé en mesurant l'intensité du signal obtenu des quantités de standards DP7 comprises entre 10 ng et 40 ng, déposées en triplicata. Le pourcentage d'erreur sur la mesure est déterminé à 5%.

3.3 Application de la méthode FACE à des cultures discontinues de cellules CHO cultivées dans différents milieux de culture

3.3.1 Etude physiologique et macrocinétique

L'étude physiologique et macrocinétique des cultures discontinues de cellules CHO C5 cultivées en bioréacteurs en milieu RPMI sans sérum et de cellules CHO 320 cultivées en milieu PF-BDM, c'est-à-dire les cinétiques de croissance et décès cellulaires, de production d'IFN-γ, de consommation de glucose et de glutamine, de production de lactate et d'ions ammonium, sont présentées dans le paragraphe 1 du chapitre III.

3.3.2 Analyse quantitative des glycannes portés par les dol-PP-oligosaccharides au cours de cultures discontinues de cellules CHO

3.2.2.1 Culture discontinue de cellules CHO C5 cultivées en milieu RPMI sans sérum

L'évolution des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides synthétisés au cours de la culture discontinue de cellules CHO C5 cultivées en milieu RPMI sans sérum est présentée sur la figure IV.17. L'identification des structures glycanniques est effectuée au moyen d'un marqueur de taille, constitué de polymères de glucose (DP) de poids moléculaires croissants ne différant entre eux que d'une unité de glucose. La totalité des précurseurs oligosaccharides obtenus à partir du protocole d'extraction séquentielle, effectué sur 3.10^7 cellules, a été déposée sur le gel de polyacrylamide. Une seule bande, située entre le DP14 et DP13, pour chaque temps de la culture, correspond au précurseur $Glc_3Man_9GlcNAc_2$.

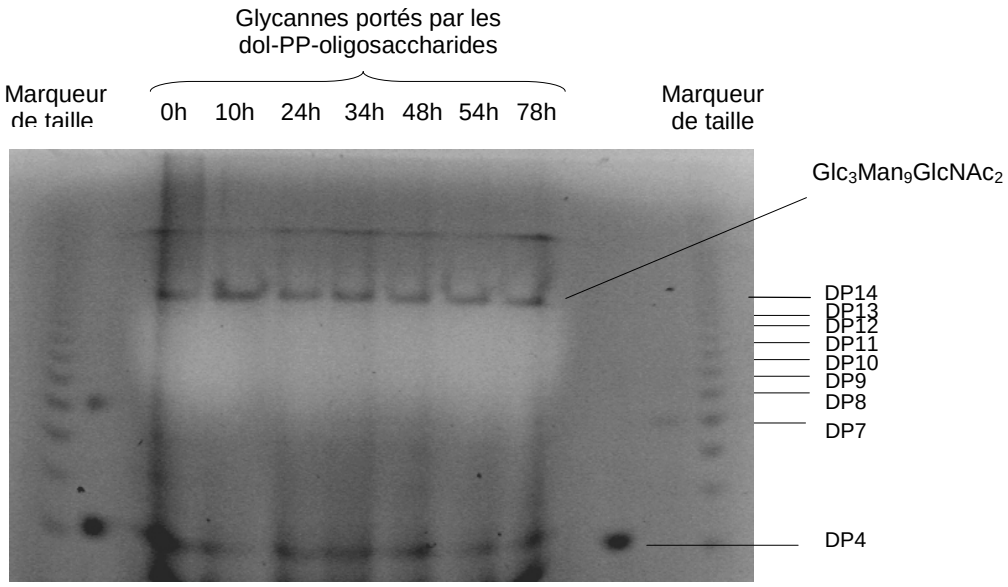


Figure IV.17 : Visualisation par FACE des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides, au cours d'une culture discontinue de cellules CHO C5 cultivées en milieu RPMI sans sérum.

La visualisation par FACE des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides nécessitent d'effectuer plusieurs étapes successives : l'extraction séquentielle des intermédiaires lipidiques, l'hydrolyse des dol-PP-oligosaccharides par une solution de tétrahydrofuranne (THF) afin d'isoler les structures glycanniques, la purification de ces

structures sur colonne de charbon, la dérivatisation par l'ANTS, et enfin le dépôt et la migration sur le gel de polyacrylamide. La succession de ces différentes étapes est susceptible de générer des pertes d'échantillons. Afin de visualiser les pertes éventuelles dues aux étapes allant de l'hydrolyse par le THF à la migration par électrophorèse, un standard interne, le DP4 (5 ng), a été ajouté à chaque échantillon de la culture avant d'effectuer l'hydrolyse des dol-PP-oligosaccharides. L'intensité du signal correspondant au standard interne est présentée sur la figure IV.18. Ainsi, l'intensité correspondant au DP4 est pratiquement constante pour les sept points de la culture, ce qui témoigne de la quasi non perte de produit pouvant se produire entre les étapes d'hydrolyse et d'électrophorèse sur gel.

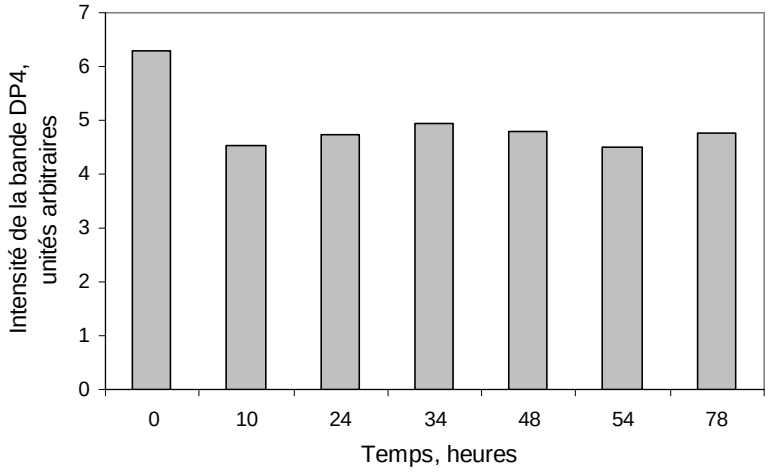


Figure IV.18 : Intensités des bandes correspondant au standard interne (DP4) ajouté à chaque échantillon de la culture.

Un standard ayant été déposé pour chaque gel, les quantités de précurseurs oligosaccharidiques synthétisés peuvent être estimées au cours de la culture discontinues de cellules CHO C5 cultivées en milieu RPMI sans sérum. L'analyse densitométrique des bandes correspondant à la structure glycannique montre que la quantité de $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ synthétisé est constante au cours du temps et égale à environ 8 ng/3.10^7 cellules (figure IV.19). Par conséquent, il n'y pas d'évolution de la quantité de précurseur synthétisé au cours de la culture.

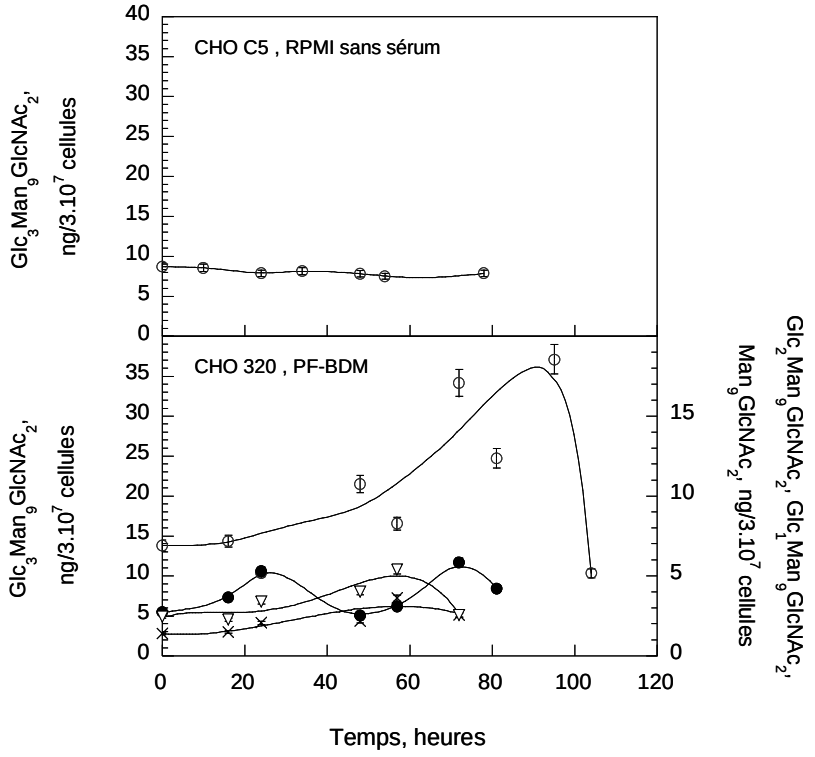


Figure IV.19 : Evolution des quantités de $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ (○), $Glc_2Man_9GlcNAc_2$ (●), $Glc_1Man_9GlcNAc_2$ (×), et $Man_9GlcNAc_2$ (▽) détectés par FACE au cours de cultures discontinues de cellules CHO C5 et 320, cultivées respectivement en milieu RPMI sans sérum et en milieu PF-BDM.

3.2.2.2 Culture discontinue de cellules CHO 320 cultivées en milieu RPMI avec sérum

Les structures des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides, au cours de la culture discontinue de cellules CHO 320 en milieu RPMI supplémenté par 10% de sérum, ont été analysées par FACE à deux reprises. Malheureusement, pour une quantité de cellules identique à celle prélevée classiquement pour l'analyse, à savoir 3.10^7 cellules, la quantité de glycannes portés par les dol-PP-oligosaccharides est trop faible et le signal associé ne permet pas de réaliser une analyse densitométrique. Ces résultats ne sont donc pas exploitables et il conviendra de réitérer l'expérience avec une quantité de cellules plus importante.

3.2.2.3 Culture discontinue de cellules CHO 320 cultivées en milieu PF-BDM

Les structures des glycannes portés par les dol-PP-oligosaccharides détectées par FACE, au cours de la culture discontinue de cellules CHO 320 en milieu PF-BDM, sont visualisées sur la figure IV.20. Quatre bandes peuvent être distinguées sur le gel de polyacrylamide pour les différents temps de la culture. Par comparaison avec le marqueur de taille, l'espèce glycannique présente majoritairement correspond au $Glc_3Man_9GlcNAc_2$. Les trois bandes suivantes correspondent respectivement au $Glc_2Man_9GlcNAc_2$, au $Glc_1Man_9GlcNAc_2$ et au $Man_9GlcNAc_2$.

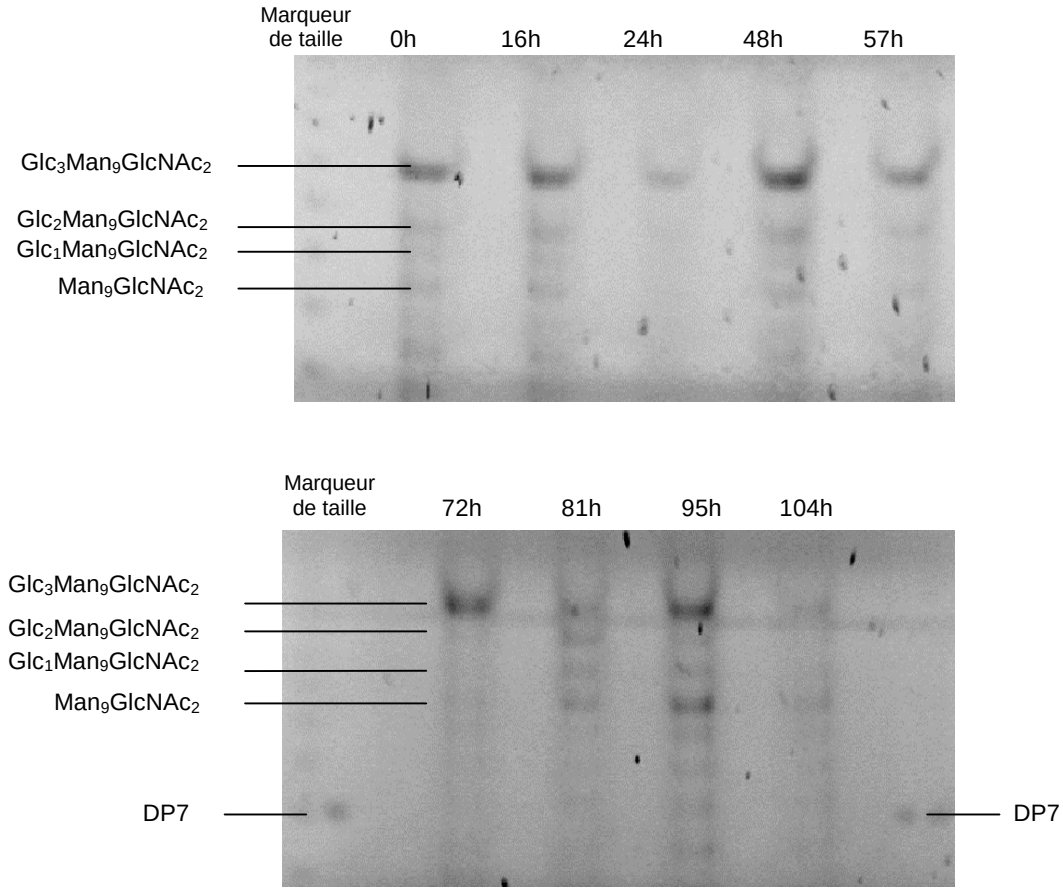


Figure IV.20 : Visualisation par FACE des glycannes associés dol-PP-oligosaccharides au cours d'une culture discontinue de cellules CHO 320 cultivées en milieu PF-BDM (3.10^7 cellules).

En ce qui concerne les cellules CHO 320 cultivées en milieu PF-BDM, en plus de la présence de $Glc_3Man_9GlcNAc_2$, les espèces glycanniques de type $Glc_2Man_9GlcNAc_2$, $Glc_1Man_9GlcNAc_2$, et $Man_9GlcNAc_2$ sont également détectés, à des concentrations comprises entre 4 et 10 ng/3.10^7 cellules. Quant à la quantité de $Glc_3Man_9GlcNAc_2$, elle évolue au cours du temps (figure IV.19). En effet, détecté des concentrations comprises entre 15 et 20 ng/3.10^7 cellules durant les 60 premières heures de culture, la concentration en $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ augmente ensuite pour atteindre environ 80 ng/3.10^7 cellules. Au-delà de 60 heures de culture, la quantité de $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ continue à augmenter progressivement pour atteindre 140 ng/3.10^7 cellules après 100 heures de culture. Il convient de rappeler que la quantité de $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ mesurée est la résultante de l'équilibre qui peut exister entre sa vitesse de synthèse et sa vitesse d'utilisation, c'est-à-dire de transfert sur les protéines. Ainsi, on peut corréler l'évolution en deux phases de la quantité de $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ synthétisé à la courbe de croissance cellulaire : aussi longtemps que les cellules sont en phase de croissance, les dol-PP-oligosaccharides sont synthétisés à une vitesse égale à leur vitesse de transfert sur les protéines en voie de synthèse. En revanche, lorsque la croissance des cellules est ralentie, la synthèse des protéines l'est également. Si les dol-PP-oligosaccharides ont une vitesse de synthèse légèrement supérieure à leur vitesse de transfert, on peut supposer qu'ils vont avoir tendance à s'accumuler dans le RE. Cette évolution en deux phases ne s'observe pas dans le cas de la culture discontinue de cellules CHO C5, suggérant que le $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ est transféré sur les protéines tout au long de la culture et sa concentration dans le RE semble ainsi être trop faible pour observer une accumulation. De plus, la quantité de précurseur de type $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ synthétisé en début de culture, entre 0 heures et 60 heures, est deux fois plus importante dans les cellules CHO 320 que dans les cellules CHO C5.

3.4 Discussion

La caractérisation des structures glycanniques par la méthode FACE a été développée de façon à s'affranchir des contraintes inhérentes à l'utilisation des marquages radioactifs. En effet, comme nous l'avons précisé auparavant, l'incorporation de la radioactivité est directement influencée par les conditions de culture. Pour effectuer l'analyse quantitative des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides par FACE, les cellules sont retirées du bioréacteur, les intermédiaires lipidiques extraits et les glycannes associés aux précurseurs

sont marqués par une molécule fluorescente (l'ANTS dans notre cas), puis directement séparés et analysés par électrophorèse sur gel de polycrylamide. L'«image » des stuctures glycanniques obtenue à l'issue de l'analyse par FACE traduit donc parfaitement l'état physiologique des cellules au moment où a été effectué le prélèvement dans le bioréacteur.

Peu de travaux utilisent la technique FACE pour caractériser les structures glycanniques associées aux dol-PP-oligosaccharides dans les cellules CHO (Gao et Lehrman, 2002; Yang et Butler, 2002). De plus, il est rarement question d'études cinétiques, mais plutôt de caractérisation des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides dans des conditions définies et à un moment précis.

Au cours de la culture réalisée en milieu RPMI sans sérum, la seule espèce glycannique associée aux dol-PP-oligosaccharides des cellules CHO C5 est le $Glc_3Man_9GlcNAc_2$, ce qui corrobore les résultats obtenus par CLHP couplée à un détecteur de radioactivité. Sa concentration intracellulaire demeure constante tout au long de la culture, mais à un niveau relativement faible.

En milieu PF-BDM, plusieurs espèces glycanniques associées aux dol-PP-oligosaccharides synthétisés par les cellules CHO 320 sont détectées. En effet, les intermédiaires $Glc_2Man_9GlcNAc_2$, $Glc_1Man_9GlcNAc_2$, et $Man_9GlcNAc_2$ sont présents, bien que l'espèce majoritaire soit également le $Glc_3Man_9GlcNAc_2$. Une augmentation de la concentration en $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ est observée au cours de la culture discontinue, et ce parallèlement à la croissance cellulaire. Ainsi, pour une même quantité de cellules prélevées (3.10^7 cellules), la quantité de $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ synthétisée est plus importante en milieu PF-BDM qu'en milieu RPMI sans sérum.

Or, le phénomène de sous-glycosylation est observé en milieu RPMI avec et sans sérum, mais ne se produit pas en milieu PF-BDM. Il est possible que la plus faible quantité de dol-PP-oligosaccharides synthétisés en milieu RPMI sans sérum puisse s'avérer limitante pour la glycosylation de l'IFN-γ, en particulier à partir du moment où la production d'IFN-γ débute, c'est-à-dire après environ 20 heures de culture. On peut supposer que la moindre quantité de dol-PP-oligosaccharides synthétisés soit insuffisante pour assurer les réactions de la glycosylation. Le fait que la quantité de précurseurs soit constante au cours du temps peut laisser penser que la vitesse d'utilisation des précurseurs est identique à celle de leur transfert sur les protéines. En revanche, en milieu PF-BDM, les quantités de précurseurs oligosaccharidiques synthétisés augmentent parallèlement à la croissance cellulaire ainsi qu'à la production d'IFN-γ. La quantité de glycannes synthétisés pourrait, dans ce cas, être

suffisante pour réaliser la glycosylation de la glycoprotéine recombinante et éviter ainsi le phénomène de sous-glycosylation observé en milieu RPMI sans sérum. Il est intéressant de noter qu'il existe des cas de maladies dues à des déficiences dans les réactions de la glycosylation dans lesquelles la pathologie se manifeste par une sous-glycosylation des glycoprotéines. Ceci s'applique plus particulièrement aux patients atteints de CDG de type I (Gao *et al*., 2005; Ohkura *et al*., 1997). En effet, la quantité de précurseurs synthétisés est inférieure dans les cellules des patients malades en comparaison avec celles des patients sains et les auteurs expliquent la sous-glycosylation des protéines par une moindre disponibilité des précurseurs oligosaccharidiques.

4. Conclusion du chapitre IV

Les marquages au [2-^{3}H] mannose nous ont permis de suivre l'évolution de la qualité des précurseurs oligosaccharidiques au cours d'une culture discontinue de cellules CHO C5 cultivées en milieu sans sérum. L'analyse par CLHP couplée à un détecteur de radioactivité révèle que la structure des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides demeure constante tout au long du procédé et de type $Glc_3Man_9GlcNAc_2$, structure glycannique classiquement transférée sur les protéines en voie de synthèse dans le RE. Ansi, l'hypothèse d'une modification de la structure des glycannes portés par les dol-PP-oligosaccharides, et en particulier l'apparition de structures glycanniques tronquées au cours de la culture, ne peut être retenue pour expliquer la diminution de la glycosylation de site de l'IFN-γ.

Le suivi de la quantité de glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides synthétisés par la méthode FACE révèle qu'en milieu RPMI sans sérum, la quantité de glycannes reste à niveau relativement faible durant toute la culture. En comparaison, la quantité de précurseurs synthétisés par des cellules CHO 320 cultivées en milieu PF-BDM est deux fois plus importante, et ce dès le début de la culture. Dans ces conditions, la macrohétérogénéité de la glycosylation n'est pas modifiée au cours du temps. La diminution du pourcentage de glycoformes 2N de l'IFN-γ produit par des cellules cultivées en milieu RPMI sans sérum pourrait être le résultat de la quantité insuffisante de dol-PP-oligosaccharides disponibles pour la réaction de transfert sur les protéines en voie de synthèse.

Chapitre V

LES POOLS INTRACELLULAIRES DE NUCLEOTIDES ET NUCLEOTIDES-SUCRES ET LA MACROHETEROGENEITE DE LA GLYCOSYLATION DE L'IFN-γ

CHAPITRE V. LES POOLS INTRACELLULAIRES DE NUCLEOTIDES ET NUCLEOTIDES-SUCRES ET LA MACROHETEROGENEITE DE LA GLYCOSYLATION DE L'IFN-γ

Il est clairement établi que les conditions de culture et l'environnement extracellulaire sont susceptibles d'influencer la macrohétérogénéité de la glycosylation (Cumming, 1991; Goochee et Monica, 1990). L'effet potentiel des paramètres intracellulaires ne doit pas être négligé pour autant car les mécanismes intracellulaires de la glycosylation sont étroitement dépendants de tous les phénomènes susceptibles d'influencer l'état physiologique des cellules. Très peu de travaux ont étudié l'impact des facteurs intracellulaires sur la macrohétérogénéité de la glycosylation, tout particulièrement d'un point de vue cinétique.

Parmi les facteurs intracellulaires susceptibles d'influencer le processus de glycosylation, la disponibilité en nucléotides et nucléotides-sucres intracellulaires peut être envisagée. En effet, les nucléotides-sucres, comme l'UDP-GlcNAc, l'UDP-Glc, le GDP-Man, le GDP-Fuc et le CMP-NeuAc, sont les substrats primordiaux des réactions de la glycosylation car ce sont les donneurs des groupements monosaccharides nécessaires à l'élaboration des structures glycanniques synthétisées dans le RE (cycle des dolichols) puis transférés sur les protéines en voie de synthèse. D'autre part, les nucléotides triphospahtes, comme le CTP et l'UTP, sont directement impliqués dans les voies de biosynthèse des dol-PP-oligosaccharides. En plus de leur rôle dans le processus de glycosylation dans les cellules animales, l'ATP et le GTP constituent également des substrats primordiaux pour le métabolisme énergétique, en tant que pourvoyeurs d'énergie.

Dès lors, compte-tenu de leur fonction capitale dans les réactions de la glycosylation et dans le maintien du métabolisme énergétique cellulaire, il semble pertinent de suivre l'évolution des contenus intracellulaires en nucléotides et nucléotides-sucres au cours de cultures discontinues de cellules CHO, et de déterminer si une relation peut être établie entre la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ et la disponiblité de ces molécules.

1. Développement d'une méthode d'analyse des pools intracellulaires de nucléotides et nucléotides-sucres par CLHP de paire d'ions

Plusieurs méthodes ont été développées pour permettre le dosage des nucléotides et nucléotides-sucres, mais celle qui est la plus couramment utilisée ces dernières années est l'analyse par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

Deux méthodes CLHP sont disponibles pour séparer et quantifier les nucléotides et nucléotides-sucres : la CLHP d'échange d'anions (Tomiya *et al*., 2001; Xu *et al*., 1995) et la CLHP de paire d'ions en phase inverse (Barnabé et Butler, 1994; Pels Rijcken *et al*., 1993; Ryll et Wagner, 1991). La CLHP échangeuse d'anions nécessite en général des temps d'analyse relativement longs, et ne permet pas toujours de séparer les molécules souhaitées. De plus, les colonnes échangeuse d'anions présentent en général une faible stabilité à long terme. C'est pourquoi la CLHP en phase inverse se révèle être une méthode de choix pour l'analyse de nucléotides et nucléotides-sucres, avec ou sans utilisation d'agents d'appariemment, dont le rôle est d'assurer l'interaction entre la phase stationnaire hydrophobe (silice de la colonne chromatographique C18) et les molécules hydrophiles contenues dans la phase mobile (Arnaud *et al*., 2003; Decosterd *et al*., 1999; Meyer *et al*., 1999). Cependant, ce type de méthode ne permet pas la séparation des épimères UDP-Glc/UDP-Gal, et UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc.

Nous avons ainsi développé au laboratoire une méthode d'analyse CLHP de paire d'ions des nucléotides et nucléotides-sucres intracellulaires, établie d'après la méthode de Ryll et Wagner (1991). Celle-ci permet de doser treize molécules, en une seule étape chromatographique : cinq nucléotides-sucres (UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, UDP-Glc, UDP-Gal et GDP-Man) et huit nucléotides (ATP, ADP, AMP, CTP, GTP, GDP, UTP et UDP). De plus, cette méthode offre l'avantage de pouvoir séparer, d'une part, l'UDP-Glc de l'UDP-Gal, et, d'autre part, l'UDP-GlcNAc de l'UDP-GalNAc.

Afin de valider la méthode d'analyse mise au point, nous avons, dans un premier temps, déterminé le pourcentage d'erreur sur la mesure, le seuil de sensibilité, la reproductibilité de la méthode, et ce pour des mélanges standards ainsi que des échantillons cellulaires.

Ces résultats sont présentés en détail, sous forme d'une publication acceptée dans le journal *Analytical Biochemistry* (2005).

Dans un deuxième temps, cette méthode a été appliquée au suivi des pools intracellulaires de nucléotides et nucléotides-sucres au cours de cultures discontinues de cellules CHO cultivées dans différents milieux de culture. Ainsi, l'objectif est de déterminer quelle peut être l'influence de la composition du milieu de culture sur les pools intracellulaires de nucléotides et nucléotides-sucres, et si une relation peut être établie entre l'évolution des concentrations intracellulaires de ces différentes molécules et le phénomène de sous-glycosylation de l'IFN-γ.

INTRACELLULAR NUCLEOTIDE AND NUCLEOTIDE SUGAR CONTENT OF CULTURED CHO CELLS DETERMINED BY A FAST, SENSITIVE AND HIGH RESOLUTION ION-PAIR RP-HPLC

N. Kochanowski[a], F. Blanchard[a], R. Cacan[b], F. Chirat[b], E. Guedon[a], A. Marc[a] and J-L. Goergen[a]*

[a] Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, UPR CNRS 6811, ENSAIA-INPL - 2, avenue de la Forêt de Haye, 54 505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

[b] Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS 8576, 59 655 Villeneuve d'Ascq, France

* Corresponding author: Jean-Louis Goergen, Tel : 33 (0) 3 83 59 58 44, Fax : 33 (0) 3 83 59 58 04, e-mail : Jean-Louis.Goergen@ensaia.inpl-nancy.fr

Subject category : chromatographic techniques

[1] *Abbreviations used*

AMP: adenosine 5'-monophosphate; ADP: adenosine 5'-diphosphate; AEC: adenylate energy charge; ATP: adenosine 5'-triphosphate; AU: arbitrary units; CHO: Chinese hamster ovary cell line; CV: coefficient of variance; CTP: cytidine 5'-triphosphate; FCS: fetal calf serum; GDP: guanosine 5'-diphosphate; GDP-Man: GDP-Mannose; GTP: guanosine 5'-triphosphate; RP-HPLC: reverse-phase high pressure liquid chromatography; SD: standard deviation; UDP: uridine 5'-diphosphate; UDP-Glc: UDP-Glucose; UDP-Gal: UDP-Galactose; UDP-GlcNAc: UDP-*N*-Acetylglucosamine; UDP-GalNAc:UDP-*N*-Acetylgalactosamine; UTP: uridine 5'-triphosphate.

Abstract

Analysis of intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents is essential in studying protein glycosylation of mammalian cells. Nucleotide sugars and nucleotides are the donor substrates of glycosyltransferases, and nucleotides are involved in cellular energy metabolism and its regulation. A sensitive and reproducible ion-pair RP-HPLC method has been developed, allowing the direct and simultaneous detection and quantification of some essential nucleotides and nucleotide sugars. After a perchloric acid extraction, thirteen molecules, eight nucleotides and five nucleotide sugars were separated, including activated sugars such as UDP-Glucose, UDP-Galactose, GDP-Mannose, UDP-*N*-Acetylglucosamine, and UDP-*N*-Acetylgalactosamine. To validate the analytical parameters, the reproducibility, the linearity of calibration curves, the detection limits, and the recovery were evaluated for standard mixtures and cell extracts. The developed method is capable to resolve picomolar quantities of nucleotides and nucleotide sugars in a single chromatographic run. The HPLC method was then applied to quantify intracellular levels of nucleotides and nucleotide sugars of CHO cells cultivated in a bioreactor batch process. Evolutions of the titers of nucleotides and nucleotide sugars during the batch process are discussed.

Key words: HPLC, nucleotides, nucleotide sugars, energy charge, CHO cells, glycosylation,

Introduction

Heterologous gene expression in mammalian cells is the strategy of choice for the production of therapeutic or diagnostic recombinant proteins when post-translational modifications affect the biological activity or the physicochemical properties (such as stability or clearance) of the protein of interest. However, glycosylation of recombinant proteins can be affected by several culture parameters including nutrient limitation [1,2] and accumulation of toxic compounds [3,4,5].

Nucleotides and nucleotide sugars are precursor molecules in biosynthetic pathways of polypeptide glycosylation located in the cytoplasm and the Golgi apparatus [6,7]. Activated nucleotide sugars such as UDP-*N*-Acetylhexosamines[1] (UDP-*N*-Acetylglucosamine and UDP-*N*-Acetygalactosamine), UDP-hexoses (UDP-Glucose and UDP-Galactose) and GDP-Mannose are donor substrates of glycosyltransferases involved in protein glycosylation processus [4]. Therefore, their availability can influence the glycosylation of proteins [8]. Other crucial molecules affecting the glycosylation process are the ribonucleotide triphosphates ATP, GTP, UTP and CTP; they represent the driving forces for cell growth and energy metabolism [9] are involved in numerous cellular processes and have a widespread regulatory potential [10].

Several analytical methods have been proposed to assay nucleotides and nucleotide sugars, and the use of HPLC has proven to be one of the most simple and rapid method for measuring these metabolites at the same time. In contrast, anion-exchange chromatography allowing the separation of nucleotides that differ in their degree of phosphorylation is of limited use for analysis of sugar nucleotides and only few applications have been reported [11,12,13,14]. Major concerns reported in the literature regarding such columns are long separation times, poor long-term stability and defect in separation of all compounds. Indeed,

co-elutions of UDP-Gal with AMP or of ATP with CTP have been observed [15,16]. Generally, more than one analytical step is required to separate molecules of interest. For instance, UDP-Glc/UDP-Gal and UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc were separated using anion exchange and ion-pair RP HPLC [17]; in other studies, GDP-Man was measured by a combination of concanavalin-A-Sepharose column chromatography and anion exchange HPLC [18,19].

It is now well admitted that nucleotides and nucleotide sugars can commonly be quantified by RP-HPLC [20,21,22] with or without ion-pairing agent [23,24,25,26]. However, several studies using ion-pair RP-HPLC method showed that nucleotide sugars such as UDP-GalNAc and UDP-GlcNAc, UDP-Gal and UDP-Glc or UDP-Glc and GDP-Man are co-eluted and therefore cannot be individually quantified [27, 28, 20, 29, 2]. The same phenomenon was observed with UDP-GlcNAc and UDP-GalNAc, GDP and AMP, ADP and GTP [30].

In this report, we describe an improved ion-pair RP-HPLC procedure, based on the method of Ryll and Wagner [20], that allows to measure thirteen nucleotides and sugar nucleotides, and to separate UDP-GalNAc from UDP-GlcNAc and UDP-Gal from UDP-Glc, with only one chromatographic run. To validate our present method, reproductibility, linearity, precision, and detection limits of the standards and cellular extracts were evaluated. Its usefulness was demonstrated by its application during a CHO cell batch culture in bioreactor where small variations in intracellular nucleotides and nucleotide sugars contents as well as adenylate energy charge were measured simultaneously throughout the culture.

Materials and methods

Chemicals

Unless indicated otherwise, all chemicals were supplied by Sigma (France) and were of highest-purity analytical grade.

Cell line and culture medium

CHO-K1 cells have been adapted to grow in suspension. Cultures were performed with a medium based on α-MEM (GibcoBRL) containing 10% fetal calf serum (FCS) (Biological Industries) and 4mM glutamine (GibcoBRL). The medium used for the bioreactor batch culture was supplemented with 10mM glucose, so that the final glucose concentration at the beginning of the culture was 20mM.

Batch CHO cell culture conditions

CHO cells initially amplified in 250ml spinner flasks incubated at 37°C and an atmosphere of 5% CO_2, were harvested in mid-exponential growth phase before their inoculation in a 4-l stirred-tank bioreactor (SGI, France). CHO cells were inoculated in the reactor at 2×10^5 cells/ml in a volume of 3.7 l. Cultures were run under controlled conditions in term of pH (7.2), pO_2 (50% of air saturation), agitation speed (50 rpm) and temperature (37°C). These parameters were monitored on line using a biocontroller (ADI1030, Applikon) and the BioXpert Software (Applikon). The supernatants were collected and stored at -20°C until required.

Cell counting

Cell density was determined in samples, using an haematocytometer twice a day. Cell viability was estimated according to the trypan blue exclusion method.

HPLC analysis of nucleotides and nucleotide sugars

Analyses of nucleotides and nucleotide sugars were performed based upon the method of Ryll and Wagner [20]. Cells were extracted with perchloric acid (PCA) and neutralized extracts were analyzed by ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC).

Extraction of intracellular nucleotides and nucleotide sugars

An average of 2-4×10^6 cells were removed from the bioreactor and immediately centrifugated (0°C, 1,300g, 5min). The supernatant was then discarded and 185µl of a cold 0.5M perchloric acid solution (Labosi, France) was added to the pellet and mixed vigorously. Samples were incubated 2min on ice and then centrifuged (4°C, 10,000*g*, 5min). The supernatants containing the soluble molecules were neutralized with 42µl of cold 2.5M KOH (Fluka, France) in 1.5M K_2HPO_4 (Fluka, France) and incubated 2min on ice. In order to remove potassium perchlorate precipitate, the neutralized samples were centrifugated (4°C, 10,000g, 5 min) and filtered with 0.2µm filters (Millipore). The samples were stored at -70°C prior to analysis. The extraction protocol time last approximately 30min.

Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography analysis

Analyses were carried out on a Waters HPLC system, composed of an autosampler (Wisp 712), a low pressure gradient pump (Module 600E) and an UV detector (Lambda-Max 481). Separation of nucleotides and nucleotide sugars were performed at 40°C on an Alltima C18 column (3µ particle size, 150mm x 4.6mm, Alltech), in combination with a guard column cartridge (3µ particle size, 7.5mm x 4.6mm, Alltech). Two buffers were used for HPLC analysis. Buffer A was 100mM potassium phosphate buffer (Fluka) + 8mM tetrabutylammonium bisulfate hydrogen sulfate, used as pairing reagent, pH 6.5. Buffer B was 70% buffer A plus 30% methanol (Carlo-Erba), pH 6.5. Buffers were filtered on 0.2µm filters (Millipore) and sparged with helium before use. As pH of the mobile phases will not only affect the resolution but also the separation of molecules, to get reproducible retention data, great care was taken in the preparation of the mobile phases, in particular regarding pH value adjustment. The solutions were prepared freshly and stored at +4°C before use. The elution gradient was as follows: 100% A for 5min, 0-77% B linearly for 27min, 77% B for 5min, 0-100% A for 1min and 100% A for 10min. The flow rate was kept at 1ml/min. Subtances were detected by UV detector, at wavelength 254nm. The complete analysis of one sample required 47min.

Peak identification and peak areas integration were performed using a mixture of standards injected before each analysis. The standard solution contained UDP-Galactose, UDP-Glucose, GDP-Mannose, UDP-*N*-Acetylgalactosamine, UDP-*N*-Acetylglucosamine, AMP, ADP, GDP, UDP, ATP, CTP, GTP, and UTP (20µM of each molecule). Integrated peak areas were quantified using the Maxima Software (Waters).

When not in use, the column was stored in 50% (v/v) methanol at 40°C or at room temperature, depending on the frequency of analyses.

Kinetic data analysis

Specific growth rate of cells (μ) was calculated all over the batch culture. This rate was evaluated from smoothed values of viable (Xv) and total (Xt = dead + viable) cell densities according to the following equation: $$\mu = \frac{1}{Xv} \cdot \frac{dXt}{dt}$$

Results and discussion

Ion-pair RP-HPLC analysis method development

Ion pair RP-HPLC analysis of a standard solution

In order to set up the method, standard solutions of nucleotides and nucleotide sugars were analyzed by RP-HPLC.

Ion-pair RP-HPLC is one of the most common method used to separate nucleotides and nucleotide sugars [20]. The substances are directly detected by the UV detector (254nm) of the chromatographic apparatus. The method developed in this study allows to separate and quantify eight nucleotides (AMP, ADP, ATP, GDP, GTP, CTP, UDP, UTP) and five nucleotide sugars (UDP-Galactose, UDP-Glucose, GDP-Mannose, UDP-*N*-Acetylgalactosamine, UDP-*N*-Acetylglucosamine). A typical HPLC-chromatogram of a standard solution (30µl of a standard solution containing 20µM of each selected molecule, *i.e.* 600 pmol/injection) is represented in Fig.1. An efficient separation of all the molecules tested was achieved, especially for UDP-Gal and UDP-Glc on one side, and UDP-GalNAc and UDP-GlcNAc on the other side. Contrary to most of the methods described in the literature using ion-pair RP-HPLC [21, 22, 28, 30, 2] no co-elution was observed and all the molecules tested were separated within a single chromatographic run.

Linearity

The linear relationship between the injected amount of nucleotides and nucleotide sugars (from 7.5 to 6000 pmol/injection) and the peak area monitored at 254nm was tested. The linearity of the calibration curves performed for six different molecules (ADP, AMP, CTP, UDP-GlcNAc, GDP-Man and GTP) is shown in Fig.2. For all these compounds, peak areas

increased linearly with an increase of the loaded amount. A similar linear relationship between the injected amounts and the peak areas was obtained for the seven other nucleotides and nucleotide sugars (data not shown). The values of the correlation coefficients (r^2) of the linear regression lanes were all close to 0.99.

Sensitivity

The previously established calibration curves allowed us to determine the sensitivity of the HPLC method. Taking into account the ratio signal/noise, the quantification limit corresponded to the lowest concentration capable to give a linear relation between the amounts of injected products and their corresponding peak areas.

The quantification limit of the nucleotides and nucleotide sugars tested was dependent on the molecule. For the defined chromatographic conditions, the detection limits (pmol/injection) were: 7.5 (AMP), 15 (ATP, GDP, UDP-Gal, UDP-GalNAc, UDP-GlcNAc), 37.5 (ADP, CTP, GDP-Man, UDP, UDP-Glc), 75 (GTP), 150 (UTP).

Reproducibility

Experiments operated over extended periods of time are subject to significant variations. Therefore, results of five analyses realized over five months were compared. The variations of retention times and peak areas of the corresponding experiments are shown in Table 1. Both retention time and peak areas of the tested molecules were very reproducible over the five experiments with our method. The separation profiles were almost identical, with a coefficient variation (CV) for the retention time comprised between 0.4% (ATP, CTP, GTP and UTP) and 1.8% (UDP). The CVs of the relative peak areas of the analyzed molecules were also excellent, ranging from 1% (UDP) to 13% (UDP-GalNAc). Therefore, the method

appears to be highly accurate for the determination of minute modifications of nucleotide and nucleotide sugar titers in standard solutions.

Stability of the column

Prior to run analysis, the passage of a somewhat large volume of the mobile phase is required for the equilibration of the column. Thus, the reversed-phase column was equilibrated with the passage of approximately 200ml of the eluent at a flow-rate of 1ml/min.

After each gradient elution, the phase system was regenerated by flushing the column with the mobile phase A for 10min at a flow-rate of 1ml/min. To avoid salts precipitation in the HPLC pump valves, the system was washed with bidistilled water at a flow-rate of 0.2 ml/min for approximately 30min. Finally, in order to remove strongly adsorbed matrix components, the column was washed with a mixture of water/methanol (50:50, v/v) with a flow-rate of 0.2 ml/min for approximately 30min.

Ion pair RP-HPLC analysis of cellular extracts

In order to validate the method for intracellular determination of nucleotides and nucleotide sugars, cell extracts of exponentially growing CHO cells (48 h-old) grown in serum-free α-MEM have been analyzed.

In Fig.3, a typical HPLC chromatogram of a 40µl neutralized perchloric acid cell extract (4×10^6 cells) is presented. As previously shown with standard solutions, the thirteen nucleotides and nucleotide sugars were detected in cellular extracts with an effective separation, including the two nucleotide sugars UDP-GalNAC and UDP-GlcNAc

Recovery of standard nucleotides and nucleotide sugars from perchloric acid treated CHO cell extracts

To measure the sensitivity and recovery of nucleotides and nucleotide sugars extracted from CHO cells with perchloric acid, standard nucleotides and nucleotide sugars, in measurable quantity, were added to pellets of CHO cells (4×10^6 cells) before extraction; the recovery of those added nucleotides and nucleotide sugars was determined by comparing peak areas of the standards, peak areas of cellular extracts without standard addition, and the peak areas of cellular extracts containing the standard molecules. Data reported in table 2 indicate that the percentage of recovery is at least 90%. To verify that a possible degradation of nucleotides and nucleotide sugars could occur during the perchloric acid extraction, the same procedure was performed with standard solutions only (20 µM). Extracts were separated by HPLC and chromatograms were compared with those obtained with unextracted standard solutions. Our results indicated that perchloric acid does not cause any degradative effect on nucleotides and nucleotide sugars contained in standard solutions suggesting that the material lost during the procedure might be due to a co-precipitation with potassium perchlorate (data not shown).

In addition, the concentration of each compound in the same extracted standard solutions was not significantly modified after a storage of 5 months at -80°C(data not shown).

Linearity and sensitivity

Fig.4 represents the relationship between the injected volume (2µl to 60µl) of cellular extracts (4×10^6 cells) and the corresponding peak area detected. The curves are linear for all the six compounds presented, with correlation coefficients values (r^2) close to 0.99 for all of them. Similar results have been obtained with the seven other molecules (data not shown).

When the extraction is performed with 4×10^6 cells, all the nucleotides and nucleotide sugars are quantifiable with an injected volume ranging from 2µl to 60µl. Therefore, an injection volume of 30µl-40µl seems to be a good compromise for the molecules assayed.

Reproducibility

Table 3 reports the day-to-day variations of retention time and peak area for nucleotides and nucleotide sugars extracted from CHO cells (4×10^6 cells). Five analyses were performed over 2 months: as for standard mixture solutions, separations were very reproducible for nucleotides and nucleotide sugars extracted from CHO cells. The CVs of the retention times (0.04%-0.36%) and relative peak areas (0.7%-5.6%) indicated a good run-to-run precision of the method upon perchloric acid extraction of cell samples.

Therefore, this fast, sensitive and high resolution ion-pair RP-HPLC method appears to be an excellent tool for resolving picomolar quantities of mixtures of nucleotides and nucleotide sugars. With a single chromatographic run, a complete pattern of metabolites which are known to be involved in energy metabolism and N-glycosylation processus can be obtained. All the molecules are well separated, and the assay is able to separate the glucose-galactose epimers of UDP-hexosamines and UDP-hexoses.

Bioreactor batch culture of CHO cells

The developed RP-HPLC method was applied to investigate intracellular pools of nucleotides and nucleotide sugars of CHO cells cultivated in bioreactor in batch process.

Cell growth kinetic

In bioreactor batch culture, CHO-K1 cells were inoculated at 2×10^5 cells/ml into α-MEM medium, containing 10% fetal calf serum, 20mM glucose and 4mM glutamine. Evolution of viable cell density and viability during the batch process is presented in Fig.5. The maximal cell density was reached after about 100h of culture (9.85×10^5 cells/ml); this growing phase was followed by a decline phase, where nutrient limitation (neither glucose nor glutamine) or inhibition by a specific compound occurred, resulting in a strong cell viability decrease down to 25% after 140h of culture.

Nucleotide and nucleotide sugar intracellular concentrations of CHO cells cultivated in batch process

Intracellular levels of nucleotides and nucleotide sugars were analyzed during the time course of a CHO-K1 cells batch culture. Extracts of perchloric acid-treated cells were collected and analyzed according to the ion-pair RP-HPLC method, described previously. Time course of intracellular concentrations of nucleotides and nucleotide sugars are presented in Fig.6. None of the profiles of intracellular pools of triphosphate nucleotides stabilized during the 140h culture; ATP, CTP, GTP and UTP slightly increased during the first 40h of the culture, until the maximal specific growth rate was reached: maximal concentrations of CTP, GTP ATP and UTP were 1.45±0.1, 2.5±0.2, 15±1.2 and 5±0.4 fmol/viable cell respectively. This increase was followed by a continuous decline phase with a strong decrease in ATP content (77%) between 40h and 140h of culture. The same phenomenon was observed for CTP (65%), GTP (90%) and UTP (80%) as those nucleotides require ATP for their biosynthesis.

Over the time course of the culture, the total intracellular concentration of adenylate nucleotides (AMP+ADP+ATP) remained relatively constant, at a mean value of 14.4±2.5

fmol/viable cell, though the adenylate energy charge ratio (AEC), defined as (ATP+0.5ADP) / (AMP+ADP+ATP) [10], varied during the course of the culture (Table 4). This parameter is an index of the capacity of cells to promote high energy level phosphorylation and therefore constitutes an indicator of the metabolic and physiological status of the cells. Generally, AEC tends to a high value, around 0.9, in exponentially growing cells whereas it falls to 0.6 during the stationary phase. In this study, the AEC ratio was high at the start of the culture (0.9) and began to decrease to a value of 0.82 after 40h of culture. As the culture time progressed, this parameter decreased to reach final values around 0.5-0.6. The AEC ratio decline can be linked to a worsening cellular physiological status [31, 32] and is correlated with the decrease in the triphosphate nucleotides. This pattern is in agreement with the decrease in cell viability at the end of the culture.

As for the triphosphate nucleotides, UDP-Glc and UDP-Gal intracellular pools (linked by an epimerisation mechanism) increased during the first 40h of the culture. In fact, as expected from the literature [17], *apart* from the first 40h (exponential growth phase) of the process, the UDP-Gal:UDP-Glc ratio was maintained at approximately 1:4 over the duration of the culture. UDP-Glc content reached a maximal value of 6.2±0.6 fmol/viable cell after around 40h, whereas UDP-Gal concentration increased only to 1.25±0.1 fmol/viable cell after 80h of cultivation. Then, both UDP-glc and UDP-gal concentrations continuously decreased to reach 2.8±0.3 and 0.8±0.06 fmol/viable cell respectively after 140h of culture. Such a decline in UDP-Glc was also observed in antibody producing NSO cells cultivated in batch process [17], when the specific growth rate declined. In our study, this phenomenon may be caused by a decrease in intracellular UTP on the one hand and by an increase in UDP up to 3.4±0.2 fmol/viable cell on the other hand. Though UMP was not measured it can be assumed that the uridylate homeostasis was maintained.

In contrast, UDP-GlcNAc and UDP-GalNAc titers continuously increased to reach a peak value of 8.8±1 and 2.5±0.3 fmol/viable cell respectively after 40h of culture, as the specific growth rate started to decrease. In fact, it is well established that an increase in intracellular contents of UDP-GlcNAc and UDP-GalNAc during the late exponential phase is a consequence of ammonia accumulation [3, 33] of which concentration reached *ca.* 3 mM in the culture medium. Besides, accumulation of UDP-GlcNAc and UDP-GalNAc may explain the simultaneous decrease in intracellular UTP in parallel to an accumulation of UDP. Similar results were obtained for glucose limited batch and fed-batch experiments showing a correlation between UDP-GNAc concentrations and the UTP pool [2].

GDP-Man, an important intermediate specifically involved in glycosylation, remained at a relatively low but constant concentration of 0.7±0.04 fmol / viable cell during the first 40h of culture. Then GDP-Man increased progressively to reach 3.2±0.2 fmol/viable cell upon 140h of cultivation. GDP-Man accumulated though GTP intracellular titer decreased, suggesting that GTP is not a limiting factor for the synthesis of GDP-Man.

Conclusion

A rapid, sensitive, reproducible and high resolution ion-pair RP-HPLC method was developed to resolve and quantify picomolar quantities of nucleotides and nucleotide sugars extracted from CHO mammalian cells. With a single chromatographic run, a complete set of metabolites which are known to be involved in energy metabolism and N-glycosylation processus were analyzed. Contrary to most of the ion-pair RP-HPLC methods described so far, all metabolites assayed were well separated and in particular the glucose-galactose epimers of UDP-*N*-Acetylhexosamines and UDP-hexoses. The method is sensitive enough to measure, during the course of a batch culture, variations of aforementioned cellular substance concentrations. This ion-pair RP-HPLC method presents great advantages in studies in which variations of nucleotides and nucleotide sugars, which are critical parameters for cell energy and protein glycosylation, would be assessed.

Acknowledgments

This work has been performed in the frame of the french CNRS network “G3” (GDR n°2590) and was supported by grants from MENRT and CNRS (Program PGP).

References

[1] J.I. Rearick, A. Chapman, S. J. Kornfeld, Glucose starvation alters lipid-linked oligosaccharide biosynthesis in Chinese hamster ovary cells, Biol. Chem. 256 (1981) 6255-6261.

[2] G.B. Nyberg, R.R. Balcarcel, B.D. Follstad, G. Stephanopoulos, D.I.C. Wang, Metabolic effects on recombinant interferon-γ glycosylation in continuous culture of chinese hamster ovary cells, Biotechnol. Bioeng. 62 (1999) 336-347.

[3] T. Ryll, U. Valley, and R. Wagner, Biochemistry of growth inhibition by ammonium in mammalian cells, Biotechnol. Bioeng. 44 (1994) 934-946.

[4] S.I. Grammatikos, U. Valley, M. Nimtz, H.S. Conradt, R. Wagner, Intracellular UDP-*N*-acetylhexosamine pool affects N-glycan complexity: a mechanism of ammonia action on protein glycosylation, Biotechnol. Prog. 14 (1998) 410-419.

[5] M. Yang, M. Butler, Effect of ammonia on the glycosylation of human recombinant erythropoietin in culture 16 (2000) 751-759.

[6] R. Kornfeld, S. Kornfeld, Assembly of asparagine-linked oligosaccharides, Ann. Rev. Biochem. 54 (1985) 631-640.

[7] C. Abeijon, C.B. Hirschberg, Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum, Trends Biotechnol. Sci. 17 (1992) 32-36.

[8] W.R. Pels Rijcken, B. Overdijk, D.H. Van den Eijnden, W. Ferwerda, Influence of D-galactosamine on the synthesis of sugar nucleotides and glycoconjugates in rat hepatocytes, Biochem. J. 305 (1995) 865-870.

[9] W. Engström, A. Zetterberg, The relationship between purines, pyrimidines, nucleosides, and glutamine for fibroblast cell proliferation, J. Biol. Chem. 256 (1984) 7812-7819.

[10] D.A. Atkinson, Cellular energy metabolism and its regulation, Academic Press, New York, 1977.

[11] L.B. Rodriguez-Aparicio, J.M. Luengo, C. Gonzalez-Clemente, A. J. Reglero, Purification and characterization of the nuclear cytidine 5'-monophosphate *N*-Acetylneuraminic synthetase from rat liver, Biol. Chem. 267 (1992) 9257-9263.

[12] Y. Shimma, A. Nishikawa, B. Bin Kassim, A. Eto, Y. Jigami, A defect in GTP synthesis affects mannose outer chain elongation in *Saccharomyces cerevisiae*, Mol. Gen. Genet. 256 (1997) 469-480.

[13] R. Köplin, J.R. Brisson, C. Whitfiled, UDP-galactofuranose precursor required for formation of the lipopolysaccharide 0 Antigen of *Klebsiella pneumoniae* serotype O1 is synthesized by the product of the *rfb*D_{KPO1} gene, J. Biol. Chem. 272 (1997) 4121-4128.

[14] R.J. Stern, T.-Y. Lee, W. Tan, M.S. Scherman, V.D. Vissa, S.-K. Kim, B.L. Wanner, M.R. McNeil, Conversion of dTDP-4-keto-6-deoxyglucose to free dTDP-4-keto-rhamnose by the rmIC gene products of *Escherichia coli* ans *Mycobacterium tuberculosis*, Microbiology 145 (1999) 663-671.

[15] Y.-K. Xu, F.R. Kaufman, G.N. Donnell, T. Giudici, O. Alfi, G. Ng. Won, HPLC analysis of uridine diphosphate sugars: decreased concentrations of uridine diphosphate galactose in erythrocytes and cultured skin fibroblasts from classical galactosemia patients, Clin. Chim. Acta 240 (1995) 21-33.

[16] N. Tomiya, E. Ailor, S.M. Lawrence, M.J. Betenbaugh, Y.C. Lee, Determination of nucleotides and sugar nucleotides involved in protein glycosylation by high-performance anion-exchange chromatography: sugar nucleotide contents in cultured insect cells and mammalian cells, Anal. Biochem. 293 (2001) 129-137.

[17] A.E. Hills, A. Patel, P. Boyd, D.C. James, Metabolic control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation in GS-NSO cells, Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 229-251.

[18] J.S. Rush, C.J. Waechter, Method for the determination of cellular levels of guanosine-5'-diphophate-mannose based on a weak interaction with concanavalin A at low pH, Anal. Biochem. 224 (1995) 494-501.

[19] J. O'Rear, J.R. Scocca, B.K. Walker, A. Kaiden, S.S. Krag, Chinese hamster ovary cells with reduced hexokinase activity maitain normall GDP-mannose levels, J. Cell. Biochem. 72 (1999) 56-66.

[20] T. Ryll, R. Wagner, Improved ion-pair high-performance liquid chromatographic method for the quantification of a wide variety of nucleotides and sugar-nucleotides in animal cells, J. Chromatograph. 570 (1991) 77-88.

[21] W.R. Pels Rijcken, B. Overdijk, D.H. Van den Eijnden, W. Ferwerda, Pyrimidine nucleotide metabolism in rat hepatocytes: evidence for compartmentation of nucleotide pools, Biochem. J. 293 (1993) 207-213.

[22] N. Barnabé, M. Butler, The effect of glucose and glutamine on the intracellular nucleotide pool and oxygen uptake rate of a murine hybridoma, Biotechnol. Bioeng. 44 (1994) 1235-1245.

[23] L.A. Decosterd, E. Cottin, X. Chen, F. Lejeune, R.O. Mirimanoff, J. Biollaz, P.A. Coucke, Simutaneous determination of deoxyribonucleoside in the presence of ribonucleoside triphosphates in human carcinoma cells by high-performance liquid chromatography, Anal. Biochem. 270 (1999) 59-68.

[24] S. Meyer, N. Noisommit-Rizzi, M. Reuss, P. Neubauer, Optimized analysis of intracellular adenosine and guanosine phosphates in *Escherichia coli*, Anal. Biochem. 271 (1999) 43-52.

[25] A. Arnaud, L. Fontana, A.J. Angulo, A. Gil, J.M. Lopez-Pedrosa, Exogenous nucleosides alter the intracellular nucleotide pool in hepatic cells cultures. Implications in cell proliferation and function, Clin.Nutr. 22 (2003) 391-399.

[26] M. Cichna, M. Raab, H. Daxecker, A. Griesmacher, M.M. Müller, P. Markl, Determination of fifteen nucleotides in cultured human mononuclear blood and umbilical vein endothelial cells by solvent generated ion-pair chromatography, J. Chromatograph. B 787 (2003) 381-391.

[27] J. Räbina, M. Mäki, E.M. Savilahti, N. Järvinen, L. Penttilä, R. Renkonen, Analysis of nucleotide sugars from cell lysates by ion-pair solid-phase extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatography, Glycoconjugate J. 18 (2001) 799-805.

[28] X. Gu, D.IC Wang, Improvement of IFN-γ sialylation in CHO cell culture by feeding of N-acetylmannosamine, Biotechnol. Bioeng. 58 (1998) 642-648.

[29] C. Sweeney, D. Mackintosh, R.M. Mason, UDP-sugar metabolism in Swarm rat chondrosarcoma chondrocytes, Biochem. J. 290 (1993) 563-570.

[30] M. Yang, M. Butler, Effects of ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms, Biotechnol. Prog. 18 (2002) 129-138.

[31] F. Grummt, D. Paul, I. Grummt, Regulation of ATP pools, rRNA and DNA synthesis in 3T3 cells in response to serum or hypoxanthine, Eur. J. Biochem. 76 (1977) 7-12.

[32] E. Rapaport, M.A.Garcia-Blancho, P.C. Zamecnik, Regulation of DNA replication in S phase nuclei by ATP and ADP pools, Proc. Natl. Acad. USA 76 (1979) 1643-1647.

[33] A. Cayli, F. Hirschmann, M. Wirth, H. Hauser, R. Wagner, cell lines with reduced UDP-N-acetylhexosamine pool in the presence of ammonium, Biotechnol. Bioeng. 65 (1999) 192-200.

Table 1: Reproducibility of the retention times and the peak areas of a 30 µl of a nucleotide and nucleotide sugar standard mixture (20µM of each molecule) in mutiple runs.

	Retention time (min)			Peak area (UA)		
	Mean	SD[a]	CV[b] (%)	Mean	SD[a]	CV[b] (%)
UDP	10.9	0.2	1.8	46500	500	1
UDP-Gal	12.9	0.1	0.7	49700	600	1.2
UDP-Glc	13.7	0.1	0.7	29650	450	1.5
GDP-Man	14.6	0.1	0.6	45660	5000	11
UDP-GalNAc	15.1	0.1	0.6	25800	3300	13
UDP-GlcNAc	15.6	0.2	1.3	50200	2300	4.6
AMP	16.1	0.2	1.2	136900	2600	1.9
GDP	17.7	0.2	1.1	74700	2100	2.8
CTP	22.4	0.1	0.4	36000	1000	2.8
ADP	25.3	0.1	0.4	48000	2000	4.1
UTP	26	0.1	0.4	18500	800	4.3
GTP	26.5	0.1	0.4	25200	700	2.8
ATP	31.8	0.1	0.3	90000	1000	1.1

Note : The data were collected from 5 HPLC runs realized over 2 months.

[a] SD, standard deviation.

[b] CV, coefficient of variance.

Table 2: Standard nucleotide and nucleotide sugar recoveries (%) after perchloric acid extraction of CHO cells.

	Cellular extract	Internal standard		
	Amount in cellular extract (pmol)	Injected amount (pmol)	Measured amount in cell extract (pmol)	Recovery (%) [a]
UDP	576	2000	1897	95
UDP-Gal	81	200	176	88
UDP-Glc	625	2000	1901	95
GDP-Man	258	800	723	90.4
UDP-GalNAc	1077	3000	2725	90.8
UDP-GlcNAc	335	1000	972	91.2
AMP	347	1000	990	99
GDP	282	800	752	94
CTP	839	2000	1728	86
ADP	2448	7000	6824	97.5
UTP	6423	20000	18872	94.4
GTP	4415	10000	9320	93.2
ATP	5528	15000	14520	96.8

Note: The experiments were performed in duplicate.

[a] Recovery : experimental/theoretical

Table 3: Reproducibility of the retention times and peak areas of nucleotides and nucleotide sugars contained in 40µl of a neutralized perchloric acid CHO cells extract (4×10^6 cells, 48 h-old). The data were collected from 5 HPLC runs performed within 2 months.

	Retention time (min)			Peak area (AU)		
	Mean	SD[a]	CV[b] (%)	Mean	SD[a]	CV[b] (%)
UDP	10.9	0.04	0.36	30600	450	1.5
UDP-Gal	12.6	0.02	0.15	8130	100	1.2
UDP-Glc	13.3	0.02	0.15	39500	500	1.25
GDP-Man	14.6	0.03	0.20	27600	1540	5.6
UDP-GalNAc	15	0.04	0.26	15200	660	4.3
UDP-GlcNAc	15.6	0.03	0.16	39500	1040	2.6
AMP	15.9	0.02	0.20	99500	1070	1
GDP	17.7	0.04	0.22	43000	820	1.9
CTP	22.3	0.02	0.09	56000	1020	1.8
ADP	25.2	0.01	0.04	248000	8220	3.3
UTP	25.8	0.02	0.07	197500	3350	1.7
GTP	26.3	0.04	0.15	210400	4820	2.3
ATP	31.5	0.03	0.09	997140	7300	0.7

Note: The data were collected from 5 HPLC runs realized over 2 months.

[a] SD, standard deviation.

[b] CV, coefficient of variance.

AU: arbitrary units

Table 4: Evolution of the total intracellular concentration of adenylate nucleotides (AN=AMP+ADP+ATP) expressed in fmol/viable cell, and adenylate energy charge ratio (AEC) during the course of the CHO cell batch culture.

	Before 40h	54h	80h	130h
AN	13.7	16	17	16.9
AEC	0.87	0.82	0.65	0.5

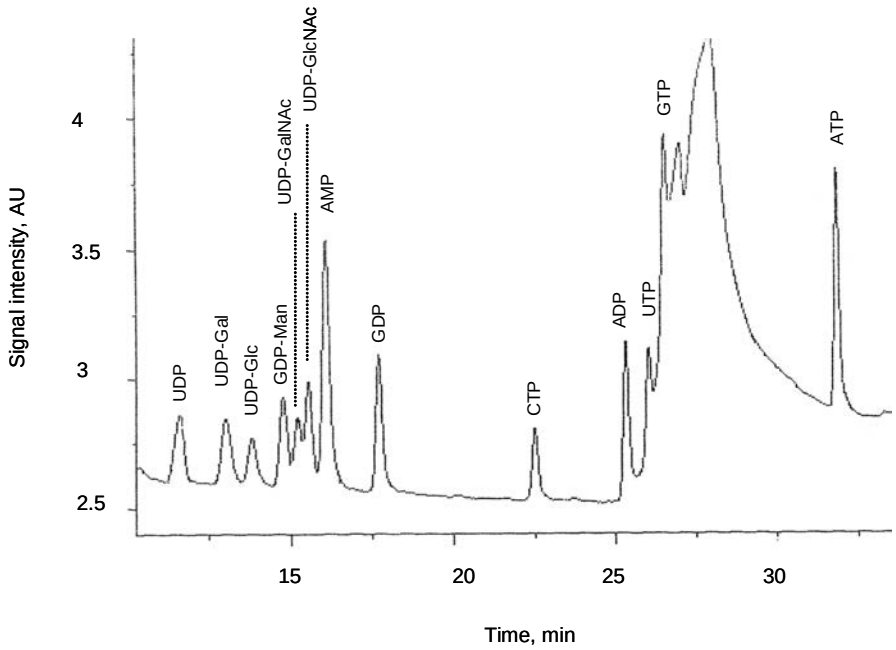
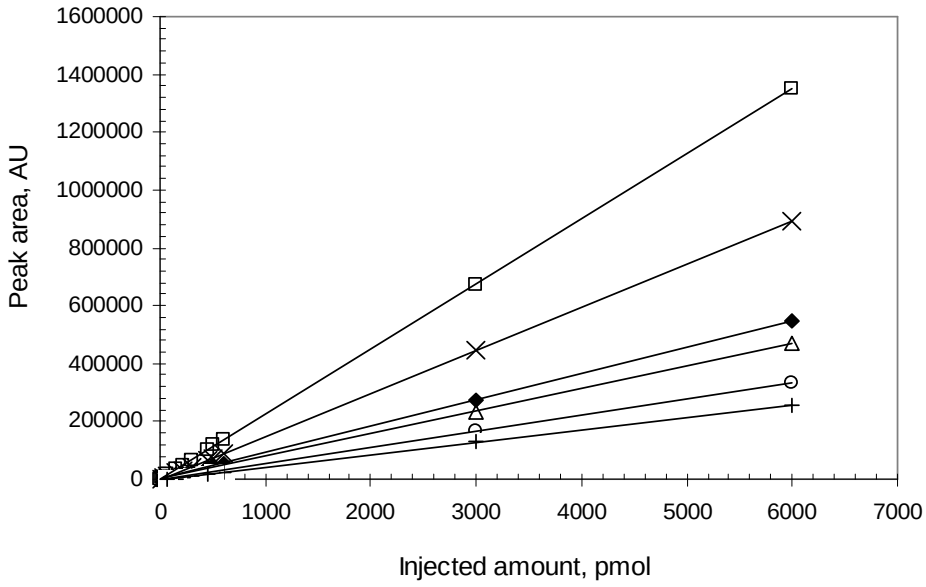


Fig.1: Ion-pair RP-HLPC chromatogram of 30µl of a standard solution of 13 nucleotides and nucleotide sugars. The concentration of each compound was 20µM (600 pmol injected). Separations were performed with a reverse phase column, the wavelength of UV detection was 254 nm, and column temperature was set à 40°C. Details about elution conditions are provided in Materials and Methods.

A



B

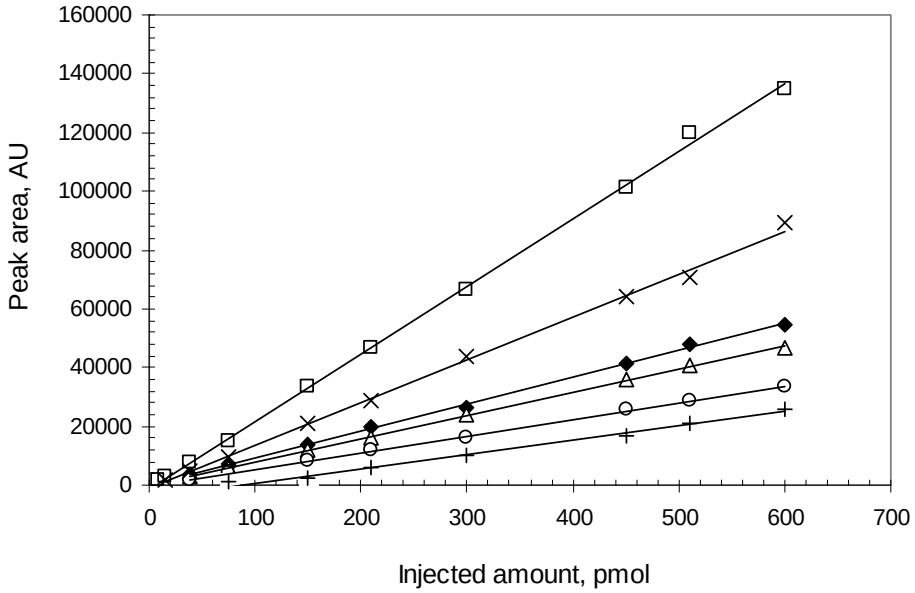


Fig. 2: Calibration curves of standard solution (**A**) Injected amount ranging from 6000 pmol to 7.5 pmol. (**B**) Detail, Injected amount ranging from 600 pmol to 7.5 pmol. ATP (×), CTP (○), GTP (+), UDP-GlcNAc (◆), GDP-Man (Δ), AMP (□).

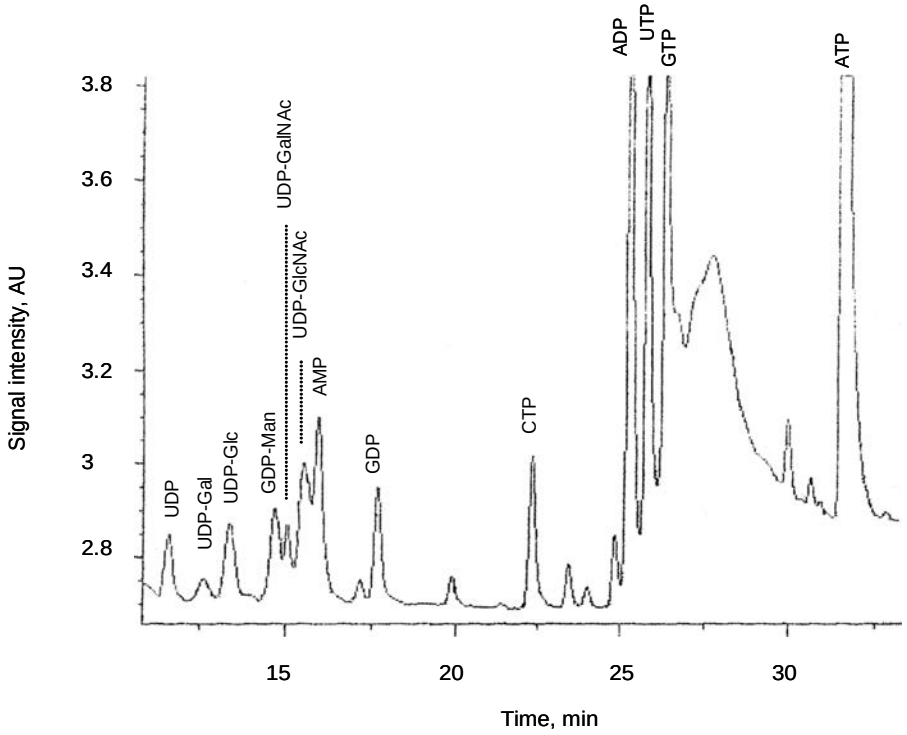
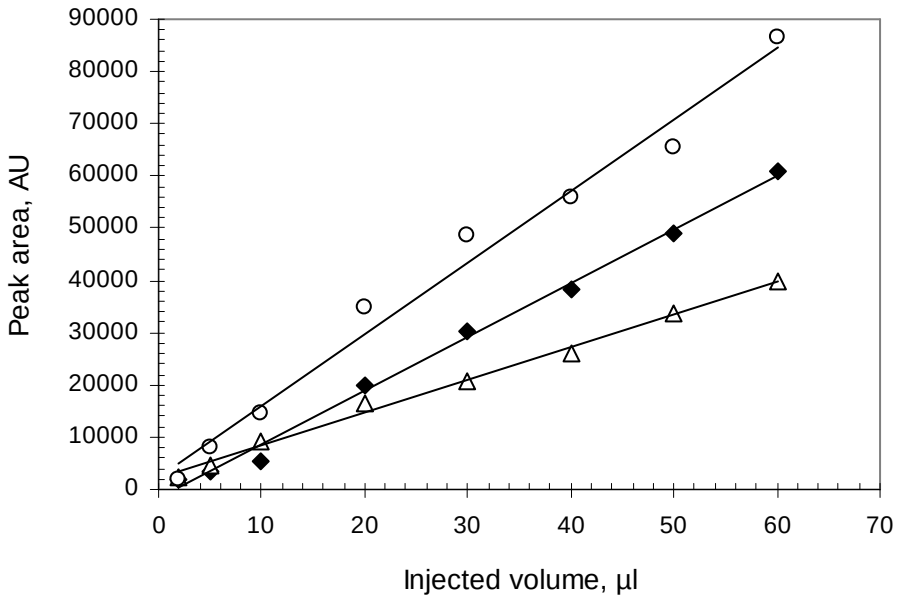


Fig.3: Ion-pair RP-HLPC separation of a 40µl perchloric acid CHO cell extract (4×10^6 cells, 48h-old). Briefly, the cellular pellet was submitted to perchloric acid extraction. After a neutralization step, soluble nucleotides and nucleotide sugars were then analyzed by ion-pair RP-HPLC.

A



B

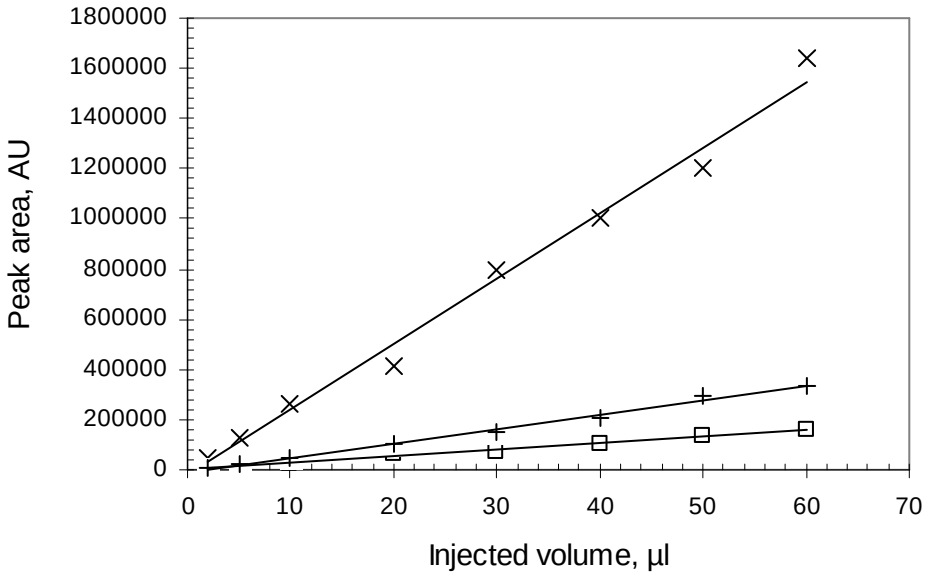


Fig. 4: Linearity between injected volumes and peak areas for perchloric acid cellular extracts (4×10^6 CHO cells, volume injected ranging from 2 µL to 60 µL). ATP (×), CTP (○), GTP (+), UDP-GlcNAc (◆), GDP-Man (Δ), AMP (□).

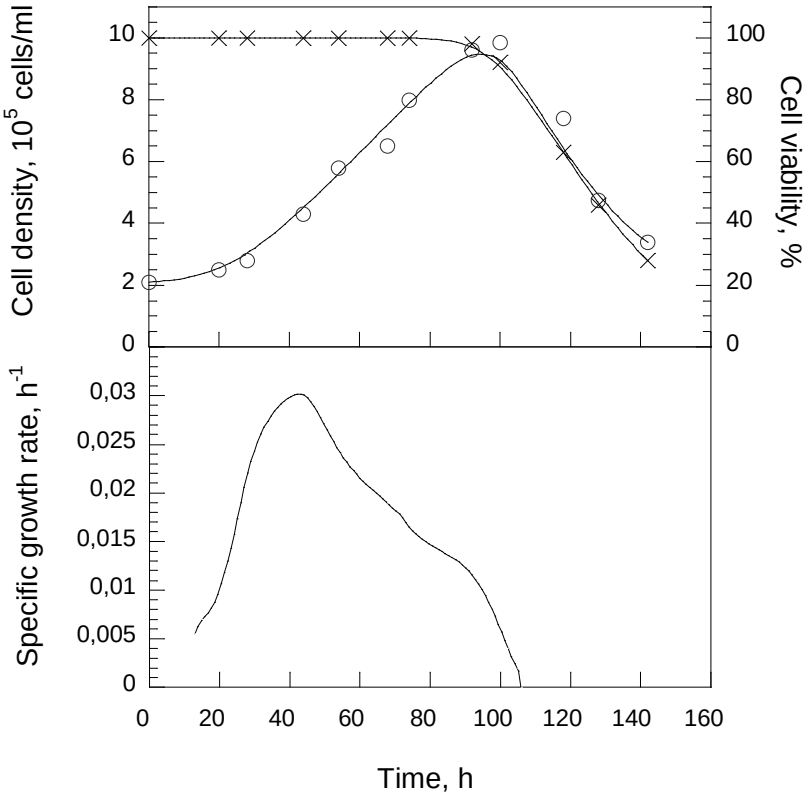


Fig.5: Kinetics of viable cell density (A,○), viability (A, ×), and specific growth rate (B), during a batch culture of CHO cells.

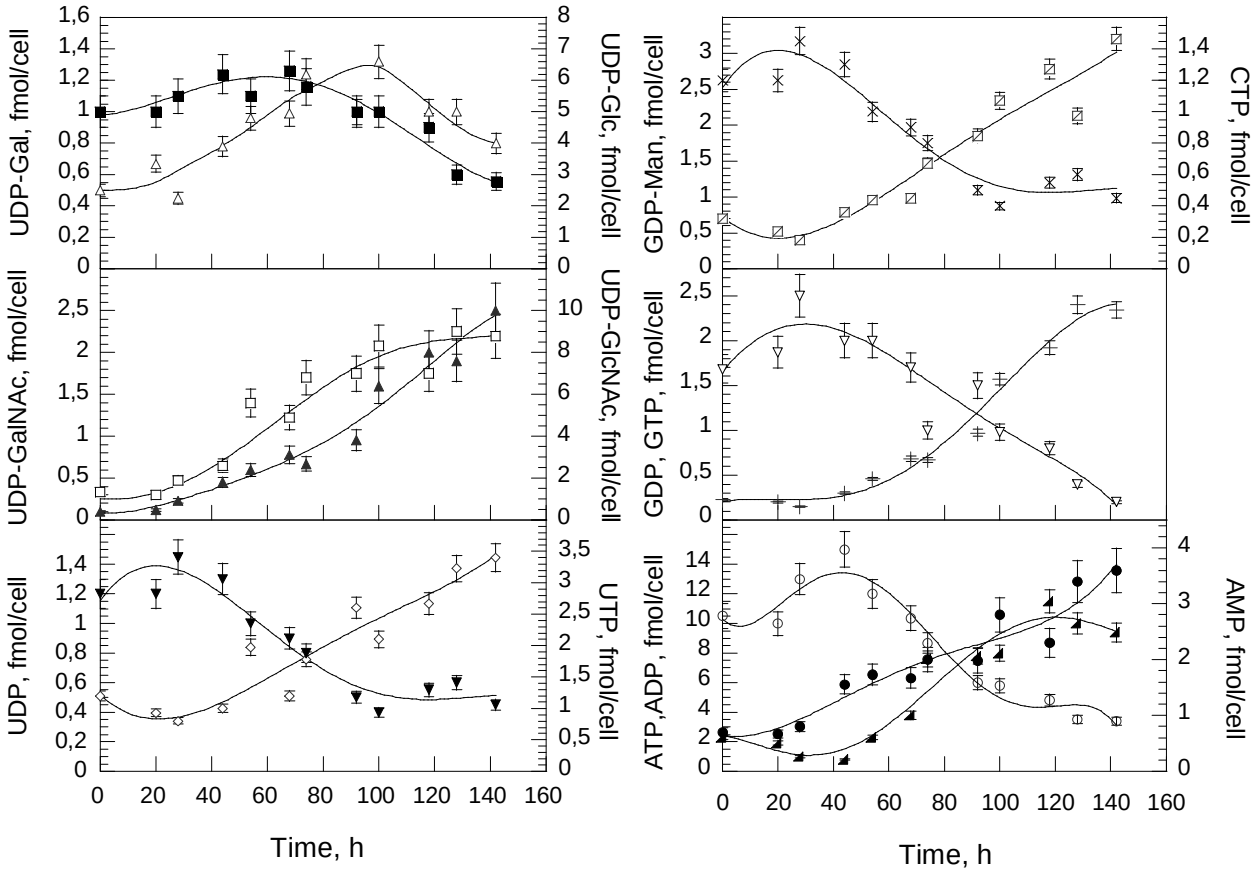


Fig. 6: Time course of nucleotide and nucleotide sugar intracellular contents (fmol/viable cell) during a CHO cell batch culture. ATP (○), CTP (×), GTP (∇), UTP (▼), UDP-Gal (Δ), UDP-GalNAc (▲), UDP-Glc (■), UDP-GlcNAc (□), AMP (◢), GDP (+), GDP-Man (▨), UDP (◊), ADP (●).

Résumé des résultats présentés dans la publication

La méthode d'analyse par CLHP de paire d'ions en phase inverse développée au laboratoire permet la séparation et la quantification de treize nucléotides et nucléotides-sucres en une seule étape chromatographique (UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, UDP-Glc, UDP-Gal et GDP-Man, ATP, ADP, AMP, CTP, GTP, GDP, UTP et UDP). La détection est réalisée en UV, à 254 nm. Les treize molécules sont bien séparées et aucune coélution, susceptible de perturber la quantification, n'est obtenue. De plus, contrairement à la majorité des méthodes CLHP de paire d'ions, nos conditions d'analyse permettent la séparation, d'une part, de l'UDP-Glc et de l'UDP-Gal, et d'autre part, de l'UDP-GalNAc et de l'UDP-GlcNAc. Pour les mélanges standards, le pourcentage d'erreur sur la mesure est compris entre 1% et 13% pour l'UDP et l'UDP-GalNAc respectivement. Les seuils de sensibilité varient en fonction de la molécule considérée, et sont compris entre 7,5 et 150 pmol/injection pour l'AMP et l'UTP respectivement.

En ce qui concerne les échantillons cellulaires, les nucléotides et nucléotides-sucres intracellulaires sont extraits à l'aide d'acide perchlorique, qui n'a pas d'effet notoire sur les molécules dosées. Une quantité de cellules raisonnable, comprise entre 2.10^6 cellules et 4.10^6 cellules, permet de réaliser une analyse CLHP des nucléotides et nucléotides-sucres intracellulaires. Tout comme pour les mélanges standards, on n'observe pas de co-élution susceptible de gêner la quantification. Les seuils de sensibilité déterminés sont de l'ordre de la fmol/cellule pour les échantillons cellulaires.

Afin de confirmer la validité de la méthode, elle a été appliquée au suivi de l'évolution des concentrations intracellulaires des nucléotides et nucléotides-sucres, au cours d'une culture discontinue de cellules CHO-K1, cultivées en milieu α-MEM supplémenté par 10% de sérum. Ainsi, la méthode d'analyse développée au laboratoire permet de suivre l'évolution des concentrations intracellulaires des treize molécules et de les quantifier tout au long de la culture discontinue. L'UDP-Glc et l'UDP-Gal et l'UDP-GalNAc et l'UDP-GlcNAc sont également séparés et quantifiables dans les extraits cellulaires. Compte tenu de sa résolution, cette méthode nous permet en outre de suivre, au cours du temps, l'évolution de la charge énergétique des cellules.

2. Suivi des pools intracellulaires de nucléotides et nucléotides-sucres au cours de cultures discontinues de cellules CHO productrices d'IFN-γ dans différents milieux de culture

Les nucléotides-sucres constituent des intermédiaires essentiels à la synthèse des précurseurs oligosaccharidiques, car ces molécules sont donneuses de groupements monosaccharidiques. Ces groupements sont issus de nucléotides-sucres activés (UDP-Galactose, UDP-Glucose, UDP-N-Acétylgalactosamine UDP-N-Acétylglucosamine, GDP-Mannose, …) et constituent les substrats des glycosyltransférases intervenant dans l'élaboration des structures glycanniques, ensuite transférées sur les protéines en voie de synthèse ou participant au processus de maturation débutant dans le RE et se poursuivant dans l'appareil de Golgi. Les nucléotides (ATP, GDP, GTP, CTP, UDP, UTP, AMP, ADP) et leurs dérivés sont impliqués de façon indirecte dans le processus de N-glycosylation mais jouent également un rôle essentiel dans le maintien du métabolisme énergétique cellulaire. Ces nucléotides et nucléotides-sucres étant impliqués dans la biosynthèse des précurseurs oligosaccharidiques, nous avons suivi l'évolution de leurs concentrations intracellulaires au cours de cultures de cellules CHO réalisées dans différentes conditions, et établir une relation potentielle avec l'évolution de la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ.

Des cultures discontinues de cellules CHO en bioréacteurs ont été mises en œuvre dans différents milieux de culture. En raison de leur composition différente, les milieux de culture suivants ont été utilisés : le milieu RPMI avec et sans sérum et le milieu PF-BDM. Au regard de la composition en terme de diversité des composants ainsi qu'en terme de quantité des éléments présents dans chaque milieu, un classement dans la richesse de composition des milieux utilisés peut être établi. Ainsi, le milieu RPMI sans sérum peut être considéré comme relativement pauvre. En présence de sérum, le milieu RPMI présente une composition un peu plus riche, mais néanmoins inférieure à celle retrouvée dans le milieu PF-BDM (tableau II.1 du chapitre II). En effet, bien que ce dernier soit un milieu sans sérum et sans protéines, il possède une variété de molécules qui le composent tout à fait intéressante. Les acides aminés et les éléments minéraux sont présents en quantité supérieure, en comparaison avec le milieu RPMI sans sérum. Des molécules comme les vitamines, les cofacteurs ou les précurseurs nucléotidiques n'entrent pas du tout dans la composition du milieu RPMI, alors qu'ils sont retrouvés en quantité non négligeable dans le milieu PF-BDM. Les concentrations

de nombreuses de ces molécules sont supérieures à celles présentes dans le milieu de base RPMI mais également à celles présentes dans le sérum. Des cultures ont donc été réalisées en milieu RPMI avec et sans sérum ainsi qu'en milieu PF-BDM et les concentrations en nucléotides et nucléotides-sucres intracellulaires ainsi que l'évolution de la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ ont été suivies au cours du temps.

Les deux lignées cellulaires utilisées pour ces cultures discontinues sont les lignées CHO 320 et C5. La lignée C5 résulte de la transfection de la lignée 320 par un gène codant une α2,6-sialyltransférase. Les travaux de Lamotte (1997) ont montré que la transfection avec l'ADNc codant une α2,6-sialyltransférase ne modifiait pas la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ.

2.1 Les nucléotides puriques et pyrimidiques

L'évolution des concentrations intracellulaires en ATP, CTP, GTP et UTP, au cours des cultures discontinues dans les différents milieux de culture, est présentée sur les figures V.1 et V.2.

En milieu RPMI avec ou sans sérum, les concentrations en ATP, CTP, GTP et UTP suivent des évolutions tout à fait comparables : de façon générale, on peut observer une augmentation de la concentration de chacun des nucléotides triphosphates jusqu'à atteindre un maximum, coïncidant avec la phase exponentielle de croissance, après quoi ces concentrations intracellulaires diminuent progressivement jusqu'en fin de culture (figure V.1 et V.2). Les concentrations maximales en ATP, CTP, GTP et UTP sont respectivement de l'ordre de 11±0,9, 1,2±0,06, 2,5±0,2 et 4±0,3 fmol/cellule. En fin de culture, elles sont voisines de 2±0,2 fmol/cellule pour l'ATP, 0,4±0,03 fmol/cellule pour l'UTP et le GTP alors que la concentration en CTP est pratiquement nulle. Le pool de nucléotides adényliques (ATP+ADP+AMP) reste relativement constant tout au long de la culture puisqu'il est voisin d'une valeur de 12±2 fmol/cellule. Ceci témoigne du maintien, d'une part, de l'homéostase et, d'autre part, valide la fiabilité des résultats obtenus par la méthode d'analyse CLHP de paire d'ions développée pour notre étude.

En présence de sérum, les concentrations maximales en ATP, CTP, GTP et UTP sont voisines de celles mesurées en milieu sans sérum, et sont respectivement de 10,6±0,9, 1,4±0,08, 2,7±0,25 et 5±0,4 fmol/cellule. En fin de culture, la concentration intracellulaire en

ATP est de l'ordre de 2±0,2, de 0,5±0,05 pour le GTP, et de 0,9± 0,1 fmol/cellule pour l'UTP. Quant au CTP, il est quasiment consommé dans sa totalité.

Les évolutions des contenus intracellulaires en nucléotides triphosphates au cours des deux cultures réalisées en milieu PF-BDM sont relativement similaires pour les cellules CHO C5 et CHO 320, c'est pourquoi ne seront décrits, dans les lignes qui suivent, seuls les résultats relatifs à la culture des cellules CHO C5 en milieu PF-BDM. Les concentrations maximales en nucléotides triphosphates sont plus élevées qu'en milieu RPMI avec ou sans sérum, et sont égales à 13±1, 1,7±0,1, 3,5±0,35 et 5,1±0,4 fmol/cellule pour l'ATP, le CTP, le GTP et l'UTP respectivement ; en fin de culture, elles sont respectivement de 1±0,1, 0,2±0,02, 0,6±0,06 et 0,6±0,05 fmol/cellule. On peut également remarquer que les décroissances de chacun des nucléotides triphosphates sont moins brutales. En effet, à titre de comparaison, les concentrations intracellulaires en ATP, CTP, GTP et UTP dans les cellules CHO C5 chutent respectivement d'environ 75%, 88%, 60% et 70% entre 25 et 70 heures en milieu RPMI sans sérum, alors qu'elles ne diminuent que de 40%, 55%, 35% et 55% pour le même laps de temps dans les cellules CHO C5 cultivées en milieu PF-BDM (Figure V.2). Comme attendu, le pool de nucléotides adényliques (ATP+ADP+AMP) en milieu PF-BDM n'est pas plus élevé qu'en milieu RPMI avec ou sans sérum, et reste relativement constant tout au long de la culture (valeur moyenne de 12±2 fmol/cellule).

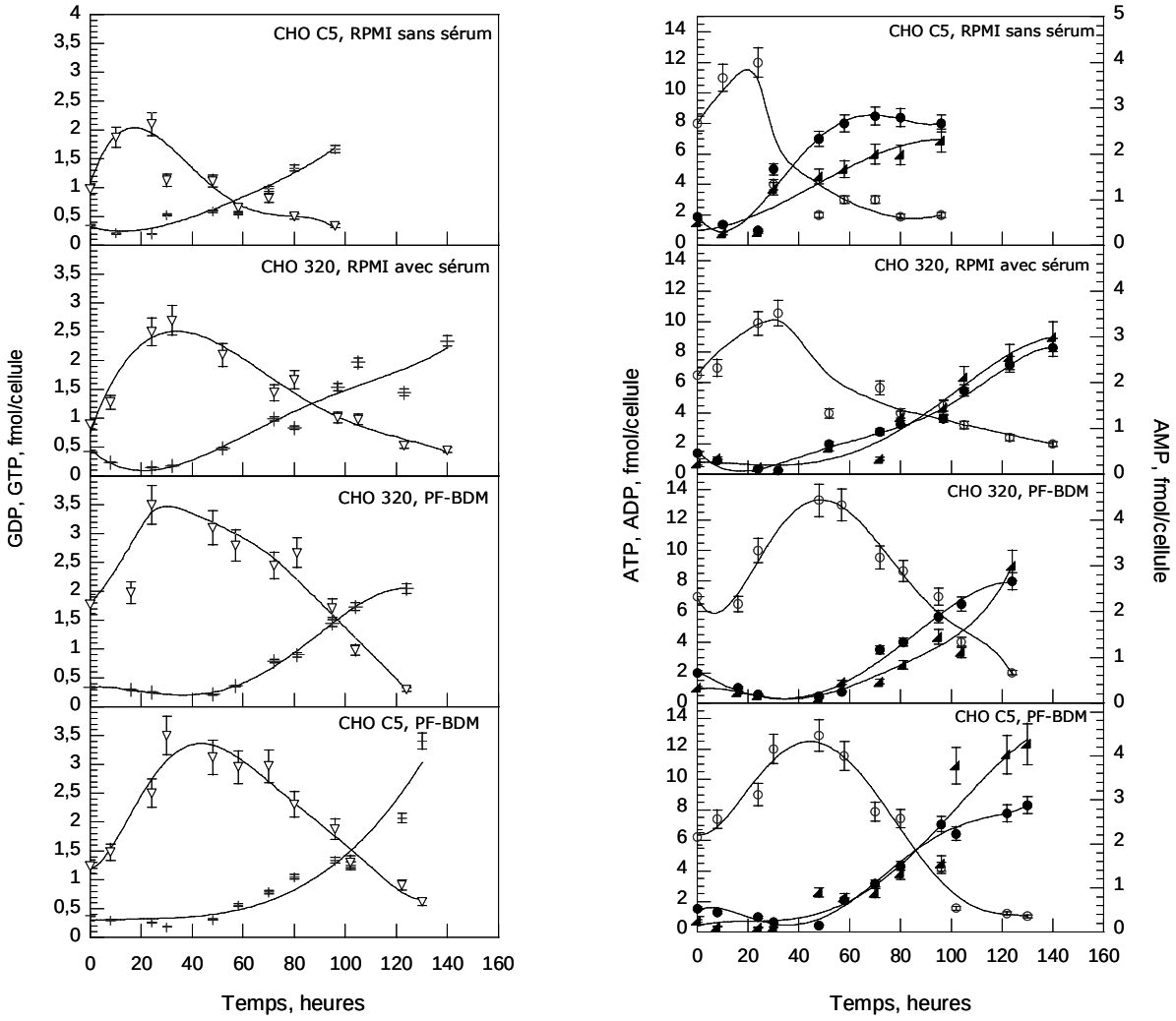


Figure V.1 : Evolution des concentrations intracellulaires en GDP (+), GTP (▽), AMP (◢), ADP (●) et ATP (○) au cours de cultures discontinues de cellules CHO C5 et 320, cultivées en milieu RPMI avec et sans sérum, et en milieu PF-BDM.

2.2 Les nucléotides-sucres

2.2.1 Le GDP-Mannose

Dans les quatre conditions de culture, le GDP-Man suit une évolution comparable : son contenu intracellulaire reste constant et à des valeurs relativement faibles en début de culture (0,5±0,05 fmol/cellule) (figure V.2). Dans une deuxième phase, la concentration en GDP-Man augmente progressivement au cours du temps pour atteindre, en fin de culture, des concentrations comparables quel que soit le milieu de culture utilisé, à savoir 2,5±0,25 fmol/cellule.

On peut supposer que le GDP-Man est utilisé de façon relativement importante en début de culture, d'où une certaine stabilité de sa concentration, à des valeurs relativement basses. En revanche, son augmentation dans une deuxième phase peut s'expliquer par une utilisation moindre de ce précurseur dans les différentes réactions dans lesquelles il est impliqué et aboutirait à son accumulation. En milieu PF-BDM, sa concentration reste faible plus longtemps, durant envion 60 heures.

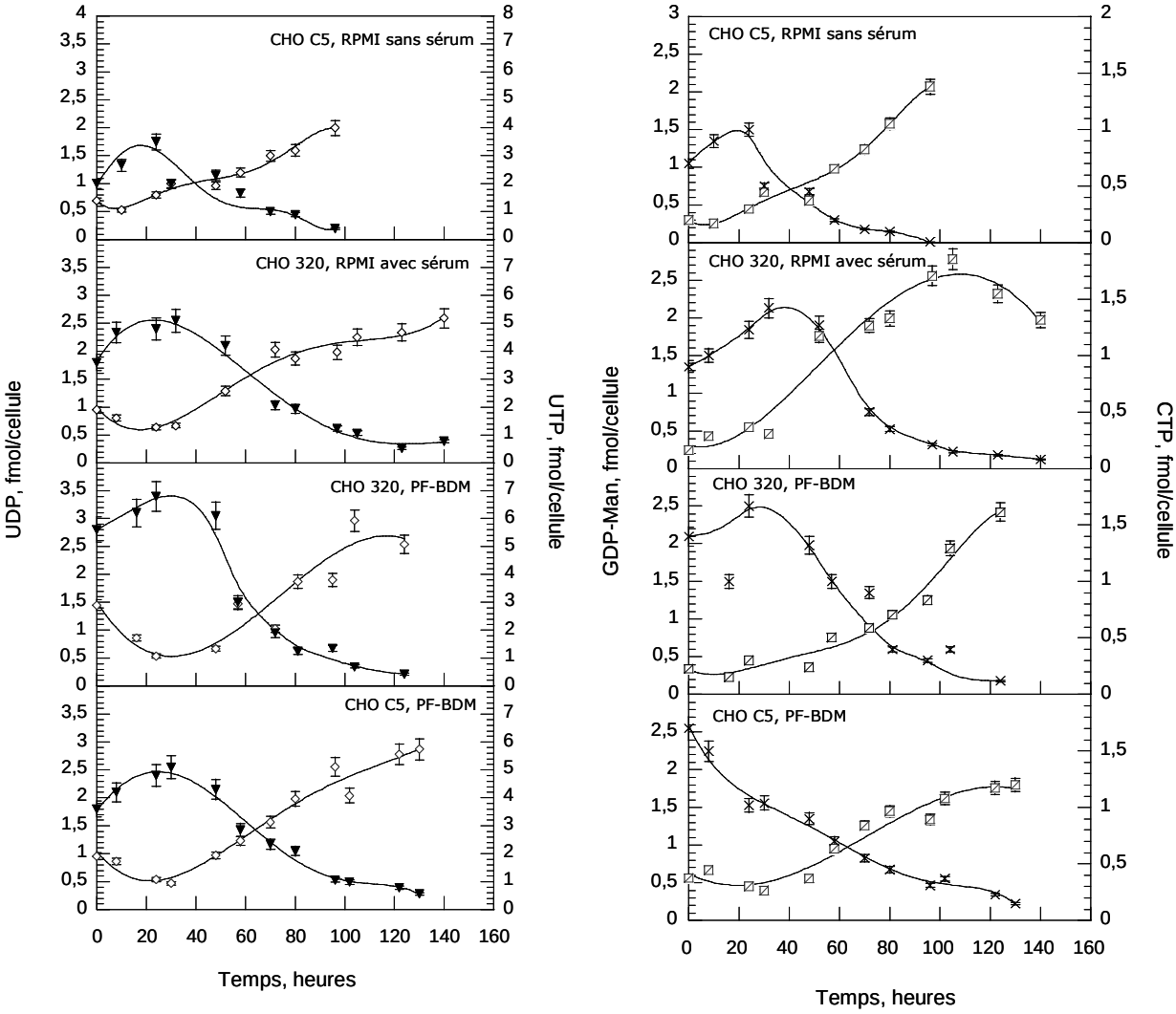


Figure V.2 : Evolution des concentrations intracellulaires en UDP (◇), UTP (▼), GDP-Man (▨) et CTP (×) au cours de cultures discontinues de cellules CHO C5 et 320 en milieu RPMI, avec et sans sérum, et en milieu PF-BDM.

2.2.2 L'UDP-Glucose et l'UDP-Galactose

En milieu RPMI avec ou sans sérum, on observe une augmentation de la concentration en UDP-Glc pour atteindre des concentrations maximales de l'ordre de 5±0,5 fmol/cellule (figure V.3). Cette valeur maximale coïncide avec celle de la vitesse spécifique de croissance. Ensuite, les concentrations en UDP-Glc vont chuter pour atteindre environ 1±0,1 fmol/cellule en fin de culture.

En milieu PF-BDM, les concentrations en UDP-Glc augmentent progressivement pour atteindre des concentrations maximales de l'ordre de 6±0,6 fmol/cellule lors des cultures des deux lignées, au moment où les cellules atteignent leur vitesse spécifique maximale de croissance, ce qui montre que les deux lignées cellulaires possèdent des concentrations intracellulaires en nucléotides-sucres similaires. En fin de culture, les concentrations en UDP-Glc sont voisines de 2±0,2 fmol/cellule. Néanmoins, en comparaison avec le milieu RPMI sans sérum, les concentrations maximales sont un peu plus élevées et la diminution de la concentration de l'UDP-Glc chute moins brutalement et un peu plus tardivement : une diminution de 60% de la concentration intracellulaire en UDP-Glc est mesurée dans les cellules CHO C5, entre 24 et 70 heures en milieu RPMI sans sérum, alors qu'elle n'est que d'environ 20% pour les mêmes cellules, durant ce même laps de temps, en milieu PF-BDM. En revanche, en milieu RPMI avec sérum, la diminution de la concentration en UDP-Glc est équivalente à celle observée en milieu PF-BDM. Une telle diminution des concentrations intracellulaires en UDP-Glc est également observée au cours de cultures discontinues de cellules NSO productrices d'un anticorps monoclonal sans que les auteurs n'expliquent cette évolution (Hills *et al*., 2001).

En ce qui concerne la concentration en UDP-Gal, celle-ci reste à un niveau constant et relativement faible (0,4±0,04 fmol/cellule) dans les cultures avec le milieu RPMI, en présence ou non de sérum. En milieu PF-BDM, la concentration en UDP-Gal suit une évolution différente : on peut observer une augmentation avec le temps de la concentration en UDP-Gal pour atteindre des valeurs maximales de l'ordre de 1,5±0,1 fmol/cellule pour les deux lignées étudiées. Il est également intéressant de remarquer que les concentrations initiales en UDP-Gal sont deux à trois fois plus importantes dans les cellules cultivées en milieu PF-BDM.

En milieu PF-BDM, le ratio UDP-Glc/UDP-Gal est proche de 4-5, ce qui est en accord avec ce qui est présenté dans la littérature (Hills *et al*., 2001). En revanche, en milieu RPMI avec et sans sérum, ce ratio est plus élevé et compris en moyenne entre 10 et 15, en raison d'une concentration en UDP-Gal faible. En effet, en milieu RPMI avec et sans sérum, alors que l'évolution de la concentration en UDP-Glc est comparable à celle mesurée dans le milieu PF-BDM, la concentration en UDP-Gal reste constante et à un niveau que l'on pourrait qualifier de basal, contrairement à ce qui a été mesuré en milieu PF-BDM. Les concentrations intracellulaires des métabolites mesurées sont la résultante de leur vitesse de consommation et de leur vitesse de production. Dans les 40 premières heures de culture, quel que soit le milieu utilisé, on peut mesurer une concentration en UDP-Gal constante et basale. L'accumulation en UDP-Gal ensuite observée, pour les cultures réalisées en milieu PF-BDM, peut être due à une synthèse accrue ou une moindre utilisation de ce nucléotide-sucre. Sachant que les vitesses spécifiques maximales de croissance sont nulles après 60 à 80 heures, quelle que soit la culture considérée (figure III.2), on peut privilégier l'hypothèse d'une synthèse favorisée d'UDP-Gal dans les cultures effectuées dans le milieu PF-BDM. Ainsi, en milieu RPMI avec sérum, bien que la concentration en UDP-Glc soit plus élevée, l'UDP-Gal ne s'accumule pas suggérant que sa vitesse de synthèse est égale à sa vitesse d'utilisation.

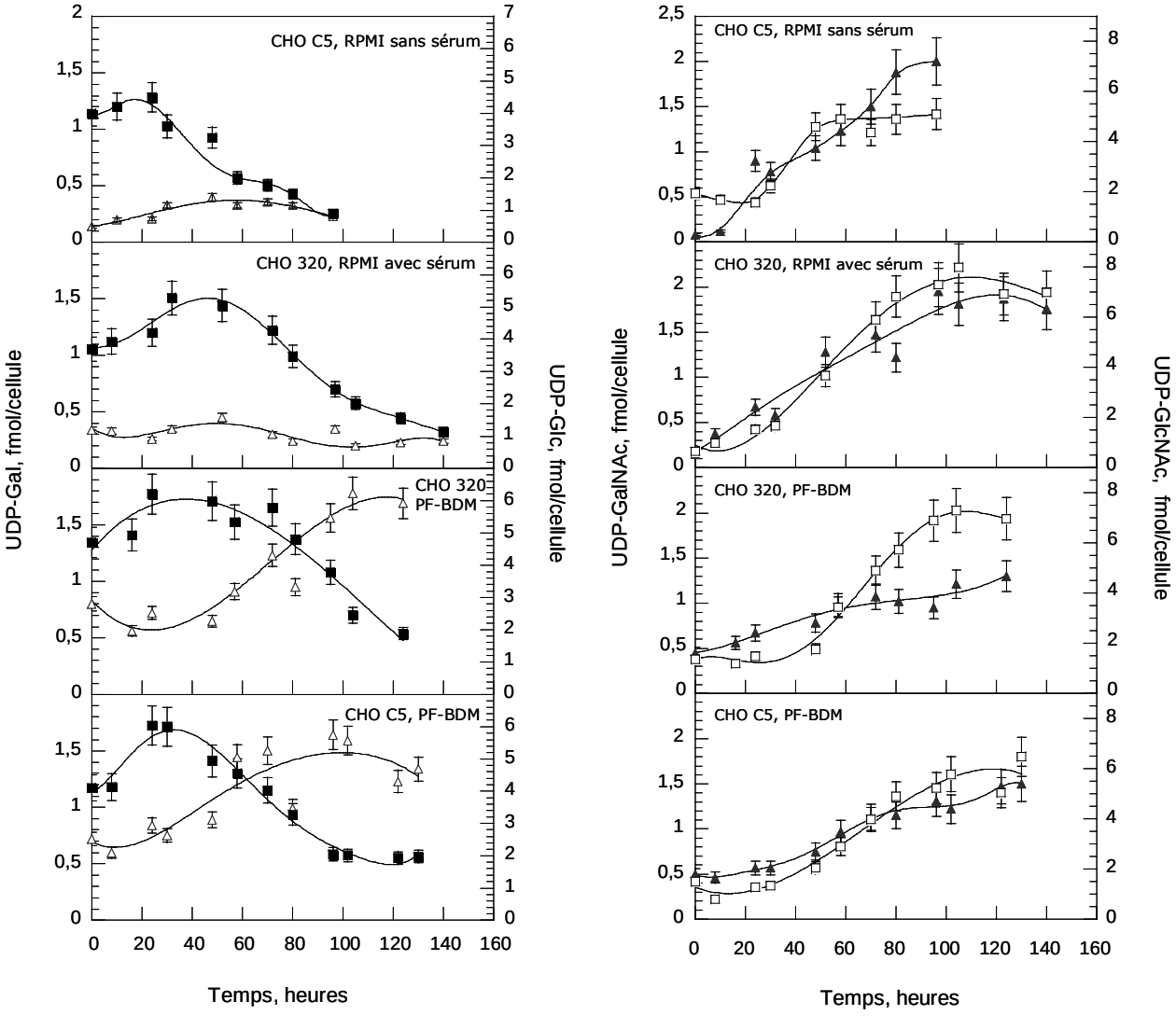


Figure V.3 : Evolution des concentrations intracellulaires en UDP-Galactose (△), UDP-Glucose (■), UDP-GalNAc (▲) et UDP-GlcNAc (□) au cours des cultures discontinues de cellules CHO C5 et 320 cultivées en milieu RPMI avec et sans sérum, et en milieu PF-BDM.

2.2.3 L'UDP-GlcNAc et l'UDP-GalNAc

L'évolution des concentrations intracellulaires en UDP-GalNAc et UDP-GlcNAc est présentée sur la figure V.3. Quelles que soient les conditions de culture considérées, on observe une augmentation des concentrations en UDP-GlcNAc et UDP-GalNAc au cours du temps. Les concentrations maximales en UDP-GlcNAc sont voisines de 6±0,7 fmol/cellule en fin de culture. Dans les quatre conditions de culture étudiées, les concentrations maximales en UDP-GalNAc sont de l'ordre de 1,8±0,2 fmol/cellule. Le ratio UDPGlcNAc/UDP-GalNAc

est en moyenne égal à 3,5 pour les quatre cultures. Ces valeurs sont en accord avec celles retrouvées dans la littérature (Span *et al*., 2001).

L'augmentation de la concentration en UDP-GlcNAc+UDP-GalNAc a fait l'objet de nombreux travaux et il est clairement établi que cette augmentation est reliée à l'augmentation de la concentration en ions ammonium (Grammatikos *et al*., 1998; Ryll *et al*., 1994). Ceci se vérifie également dans notre cas pour les quatre cultures. A titre d'exemple, la relation entre le contenu intracellulaire en UDP-GlcNAc+UDP-GalNAc et la concentration en ions ammonium pour les cultures discontinues de cellules CHO C5 est présentée sur la figure V.4.

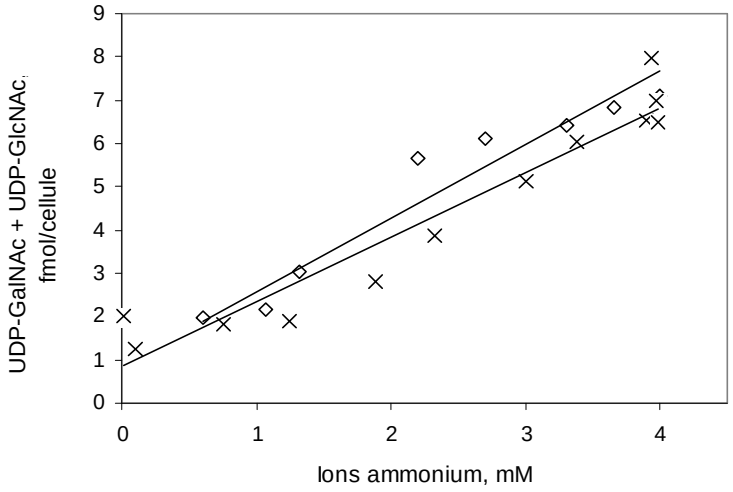


Figure V.4 : Relation entre la concentration en ions ammonium et le contenu intracellulaire en UDP-GalNAc+UDP-GlcNAc au cours des cultures discontinues de cellules CHO C5 cultivées en milieu RPMI sans sérum (◇) et en milieu PF-BDM (×).

Les ions ammonium constituent un précurseur impliqué dans la voie de biosynthèse de l'UDP-GlcNAc. Une des premières étapes de la voie de synthèse de l'UDP-GlcNAc consiste en une réaction d'amination du fructose-6-phosphate (Fru-6-P) en glucosamine-6-phosphate (GlcN-6-P), qui utilise la glutamine comme donneuse de groupement amine. Cette réaction est catalysée par la glucosamine-6-phosphate synthase (GPS). Une deuxième enzyme a été mise en évidence, la glucosamine-6-P isomérase (GPI), qui catalyse la réaction réversible Fru-6-P ↔GlcN-6-P (Cayli *et al*., 1998). Dans ce cas, le groupement amine est apporté par les ions ammonium et non la glutamine. Ces deux enzymes sont considérées comme essentielles à la régulation de la synthèse du pool d'UDP-GlcNAc. La synthèse d'UDP-GlcNAc est régulée de la façon suivante : dans les cellules, la GlcN-6-P est produite à partir de Fru-6-P et de glutamine, cette réaction est catalysée par la GPS. La GPI joue un rôle de régulateur, qui empêche l'accumulation de GlcN-6-P. Bien que la GPI catalyse la réaction dans les deux

sens, elle fonctionne préférentiellement dans le sens de la dégradation de la GlcN-6-P en Fru-6-P et en ions ammonium. Mais lorsque la concentration en ammonium augmente, la réaction catalysée par la GPI est significativement orientée vers la formation de GlcN-6-P (Valley *et al*. 1999). Ainsi, les deux enzymes synthétisent la GlcN-6-P, conduisant à l'augmentation globale du pool d'UDP-GNAc (figure V.5).

Les concentrations en UDP-GlcNAc et UDP-GalNAc augmentant au cours des quatre cultures discontinues, on peut ainsi penser que le pool d'UDP-GlcNAc ne constitue pas un facteur limitant pour la glycosylation de l'IFN-γ.

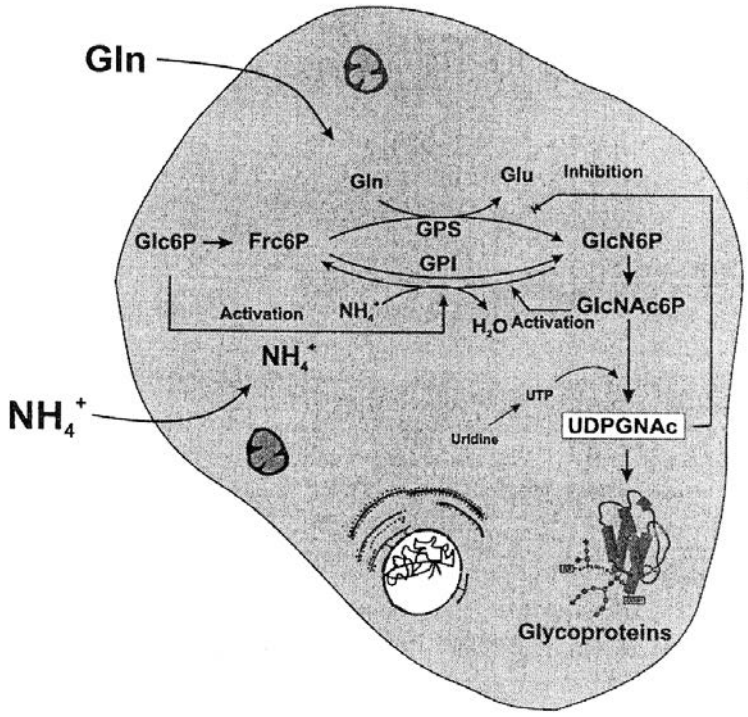


Figure V.5 : Réactions catalysées par la glucosamine-6-phosphate synthase (GPS) et la glucosamine-6-P isomérase (GPI) dans la voie de biosynthèse de l'UDP-GNAc (d'après Cayli *et al*., 1999).

D'autre part, la biosynthèse des nucléotides-sucres tels l'UDP-Glc, l'UDP-Gal, l'UDP-GlcNAc et l'UDP-GalNAc, nécessite de l'UTP. Des relations inverses ont pu être établies entre la concentration en UTP et celles de ces nucléotides-sucres. En effet, ont peut penser que lorsque l'UTP est fortement utilisé pour la synthèse des nucléotides-sucres correspondants, sa concentration intracellulaire va diminuer. A titre d'exemple, la relation entre la concentration intracellulaire en UTP et la concentration en UDP-Glc+UDP-Gal au

cours des cultures discontinues de cellules CHO C5 cultivées en milieu RPMI sans sérum et en milieu PF-BDM est présentée sur la figure V.6.

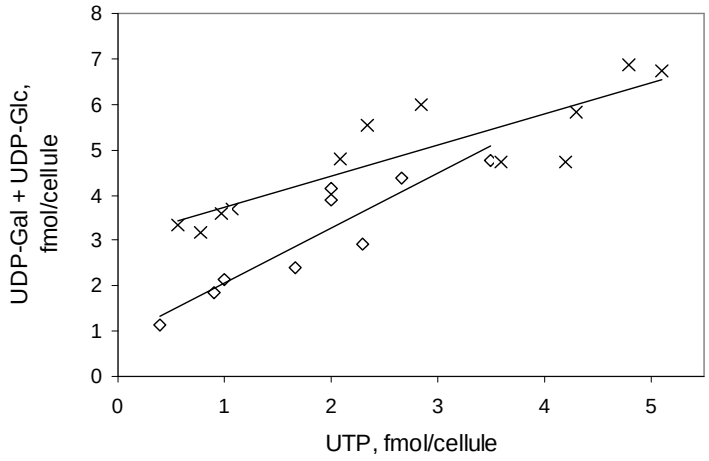


Figure V.6 : Relation entre la concentration intracellulaire en UTP et en UDP-Gal+UDP-Glc au cours des cultures discontinues de cellules CHO C5, cultivées en milieu RPMI sans sérum (◇) et en milieu PF-BDM (×).

Une relation similaire peut être établie entre la concentration intracellulaire en UTP et les concentrations en UDP-GlcNAc+UDP-GalNAc (figure V.7).

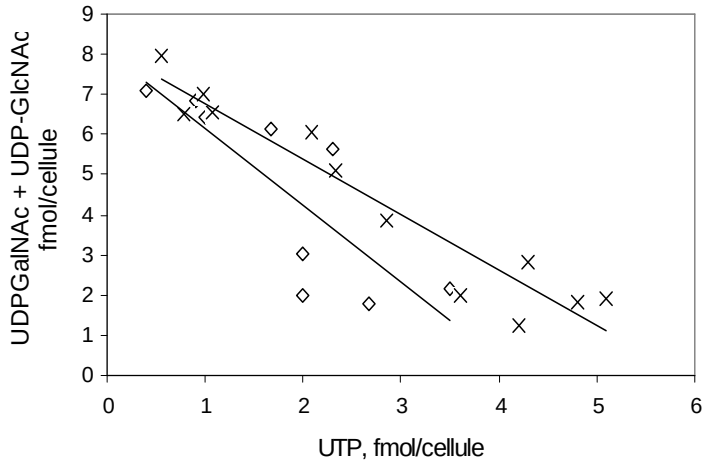


Figure V.7 : Relation entre la concentration intracellulaire en UTP et en UDP-GalNAc+UDP-GlcNAc au cours des cultures discontinues de cellules CHO C5, cultivées en milieu RPMI sans sérum (◇) et en milieu PF-BDM (×).

2.3 La charge énergétique

A partir du dosage des trois nucléotides AMP, ADP et ATP, la charge énergétique cellulaire, correspondant au ratio (ATP + 0,5ADP) / (ATP + ADP + AMP) peut être déterminée (Atkinson, 1977). La charge énergétique est le reflet de l'état physiologique des cellules et ce ratio est généralement élevé puisqu'il est compris entre 0,9 et 1 dans les cellules CHO en phase de croissance (Moore *et al*., 1997). L'évolution de la charge énergétique des cellules au cours des cultures discontinues de cellules CHO C5 et 320 cultivées dans les différents milieux de culture est présentée sur la figure V.8.

Dans les quatre cultures, la charge énergétique est élevée et proche de 0,9 en début de culture. Alors qu'en milieu RPMI sans sérum, la charge énergétique commence à chuter assez brutalement après 25 heures de culture, la présence de sérum retarde ce déclin jusqu'à environ 40 heures de culture. En revanche, en milieu PF-BDM, que ce soit pour les cellules CHO 320 ou C5, la charge énergétique est maintenue à des valeurs plus élevées (supérieures à 0,95) durant une période plus longue (environ 60 heures). Après 60 heures de culture, une diminution de la charge énergétique est néanmoins observée dans ces conditions de culture mais la décroissance est beaucoup plus lente. Il est intéressant de noter que dans ce dernier milieu de culture, la charge énergétique est élevée tant que l'IFN-γ recombinant est produit par les cellules CHO.

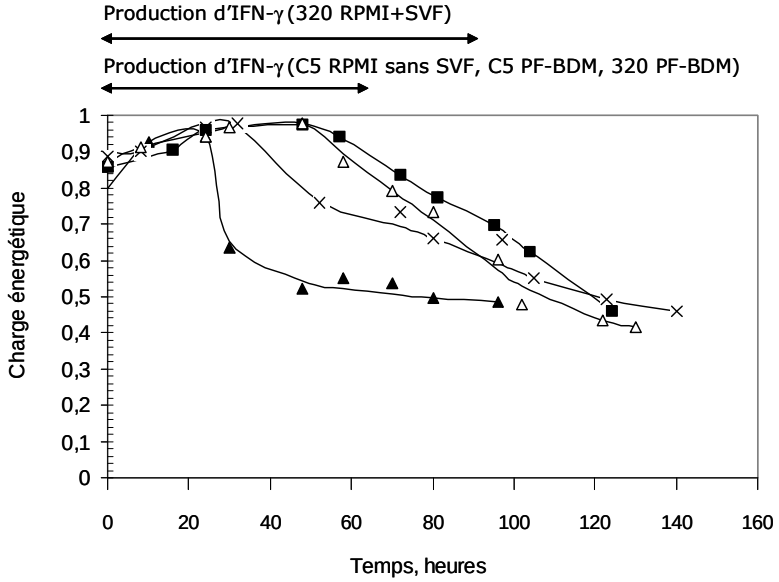


Figure V.8 : Evolution de la charge énergétique (ATP+0,5ADP/ATP+ADP+AMP) au cours des cultures discontinues de cellules CHO, cultivées en milieu RPMI, avec et sans sérum, et en milieu PF-BDM. Cellules CHO C5 en milieu RPMI sans sérum (▲), cellules CHO 320 en milieu RPMI avec sérum (×), cellules CHO 320 en milieu PF-BDM (■), cellules CHO C5 en milieu PF-BDM (△).

2.4 Discussion

Pool de GDP-Man

Le GDP-Man est un nucléotide-sucre essentiel pour les réactions de la glycosylation car c'est un donneur de groupement mannose pour les cinq premières réactions du cycle des dolichols se déroulant dans le cytoplasme. Il est également impliqué dans la synthèse de dol-P-Man, lui-même donneur de groupements mannose pour les quatre réactions suivantes, qui se déroulent dans la lumière du RE. Le GDP-Man joue donc un rôle central dans le processus de N-glycosylation. Au cours de notre étude, la concentration intracellulaire en GDP-Man est relativement faible et constante en début de culture, et ce dans les quatre conditions de culture testées. Au moment où chute le pourcentage d'IFN-γ glycosylé sur deux sites en milieu RPMI avec et sans sérum, les concentrations en GDP-Man sont voisines de celles mesurées dans les cultures réalisées en milieu PF-BDM. On peut ainsi supposer que si ce nucléotide-sucre n'est pas limitant pour la glycosylation de l'IFN-γ en milieu PF-BDM, il ne l'est pas dans les cultures effectuées en milieu RPMI avec et sans sérum. O'Rear *et al*. (1999) ont montré que le pool de GDP-Man est maintenu chez des cellules CHO, déficientes en hexokinase, ce qui semble indiquer que le maintien de ce pool est primordial pour les cellules. Dans ces travaux, la glycoprotéine modèle, la protéine G, possédant deux sites de glycosylation, présente une glycosylation de site identique dans les lignées parentale et mutée.

Pools d'UDP-GlcNAc et d'UDP-GalNAc

Le pool d'UDP-GNAc augmente au fur et à mesure de la progression de la culture, quel que soit le milieu de culture utilisé, même si l'augmentation des concentrations semble être plus prononcée lorsque les cellules sont en milieu de phase exponentielle de croissance. Il est clairement établi que cette augmentation est une conséquence de l'augmentation de la concentration en ions ammonium, ces derniers étant un substrat de la voie de biosynthèse de l'UDP-GNAc (Ryll *et al*., 1994; Ryll et Wagner, 1992). En effet, les ions ammonium sont impliqués dans la synthèse du fructose-6-phosphate (Fru-6-P) aboutissant à la production de glucosamine-6-phosphate (GlcN-6-P), précurseur direct de la synthèse du pool d'UDP-GNAc. Ceci implique ainsi une glycolyse efficace et la présence de glucose dans le milieu de culture pour la synthèse d'UDP-GNAc. Dans nos conditions de culture, le glucose n'est jamais

limitant, puisqu'il est présent dans le milieu de culture à raison d'environ 10 mM au moment où survient la chute la glycosylation de l'IFN-γ. Dans les quatre cultures réalisées, les concentrations en UDP-GNAc suivent une évolution similaire. En effet, avec des contenus intracellulaires initiaux en UDP-GalNAc et UDP-GlcNAc comparables quel que soit le milieu de culture, leurs concentrations restent relativement constantes durant environ 25 à 40 heures, avant d'augmenter progressivement. En milieu PF-BDM, le profil de glycosylation de l'IFN-γ demeure constant au cours du temps. Comme dans le cas du GDP-Man, on peut donc supposer que si l'UDP-GlcNAc et l'UDP-GalNAc ne sont pas limitants pour la glycosylation de l'IFN-γ produit par des cellules CHO cultivées en milieu PF-BDM, ils ne devraient pas l'être pour les cellules cultivées en milieu RPMI, avec ou sans sérum. Par ailleurs, les travaux de Nyberg *et al*. (1999) ont montré que les pools d'UDP-GNAc ne semblaient avoir qu'une faible influence sur la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ. En effet, pour une réduction de 40% du pool d'UDP-GNAc, ces auteurs n'observent qu'une faible diminution de 70 à 62% de la proportion d'IFN-γ glycosylé sur deux sites dans des conditions de limitation en glutamine. Ceci laisse penser que ces nucléotides-sucres ne seraient pas responsables de la diminution du pourcentage de glycoformes 2N de l'IFN-γ. En revanche, de nombreux travaux établissent une relation entre les pools d'UDP-GNAc et la microhétérogénéité de la glycosylation (Gawlitzek *et al*., 1998; Grammatikos *et al*., 1998; Pels Rijcken *et al*., 1995). L'antennarité des glycannes, en particulier la sialylation, est modifiée en présence de fortes concentrations en ions ammonium. Pels Rijcken *et al*. (1995) ont pu expliquer la relation existant entre le pool intracellulaire d'UDP-GNAc et la sialylation dans des hépatocytes de rat, en montrant que le pool d'UDP-GNAc pouvait inhiber le transport de CMP-NeuAc dans l'appareil de Golgi et ainsi diminuer la sialylation.

Des études réalisées dans des conditions de limitation en glutamine ont montré que le pool d'UTP était réduit (Nyberg *et al*., 1999). Une déplétion en UTP est également observée lorsque le milieu de culture est supplémenté par de la glucosamine. En effet, ce sucre aminé est un précurseur de la synthèse de l'UDP-GNAc. Ainsi, un ajout en glucosamine stimule la synthèse d'UDP-GNAc (Gawlitzek *et al*., 1998; Grammatikos *et al*., 1998; Zhanghi *et al*., 1998) et diminue le pool d'UTP (Grammatikos *et al*., 1998). L'UTP semble jouer un rôle clé dans la croissance cellulaire : une relation a pu être établie entre la diminution du contenu intracellulaire en UTP et le pourcentage de cellules CHO en phase S (Grammatikos *et al*., 1999; Moore *et al*., 1997; Ryll et Wagner, 1992).

Pools d'UDP-Glucose et d'UDP-Galactose

Contrairement aux pools d'UDP-GNAc, une diminution du pool d'UDP-Glc est observée dès que les cellules ont atteint la vitesse spécifique maximale de croissance. L'UTP est utilisé d'une part pour la synthèse du pool d'UDP-GlcNAc, et d'autre part pour la synthèse d'UDP-Glc (figure V.9). La synthèse d'UDP-GNAc étant stimulée par la production d'ions ammonium, on peut supposer que l'UTP est utilisé davantage pour la synthèse d'UDP-GNAc, et est en conséquence moins disponible pour la synthèse d'UDP-Glc, d'où une diminution de sa concentration.

L'UDP-Gal est synthétisé à partir d'UDP-Glc par une réaction d'épimérisation. En milieu RPMI avec et sans sérum, la concentration en UDP-Gal reste à un niveau relativement faible tout au long de la culture. En revanche, en milieu PF-BDM, la concentration en UDP-Gal augmente progressivement au cours de la culture. Si l'on garde à l'esprit que la concentration en UDP-Gal mesurée est le résultat d'un équilibre entre sa vitesse de synthèse et sa vitesse d'utilisation, une concentration stable s'explique par une vitesse de synthèse de l'UDP-Gal égale à sa vitesse d'utilisation. En milieu PF-BDM, l'augmentation de la concentration en UDP-Gal peut suggérer que l'UDP-Glc est disponible en quantité suffisante pour les réactions autres que la synthèse d'UDP-Gal et que l'UDP-Glc disponible est alors converti en UDP-Gal.

De plus, l'UDP-Glc intervient dans de nombreuses réactions du métabolisme, en particulier la synthèse du glycogène, mais également la synthèse des acides guloniques et glucuroniques (Banhegyi *et al*., 1997). A partir de l'acide gulonique est synthétisé l'acide ascorbique (figure V.9). Or, cette vitamine n'est pas apportée par le milieu RPMI de base, et elle est présente en très faible quantité dans le sérum (moins de 0,5 mg/L). Au contraire, le milieu PF-BDM contient une forte concentration en acide ascorbique (4,5 mg/L), les cellules n'ont ainsi pas besoin de synthétiser cette vitamine puisqu'elle est apportée directement dans le milieu de culture. L'UDP-Glc nécessaire à la synthèse d'acide d'ascorbique peut alors être utilisé pour d'autres synthèses, comme par exemple le cycle des dolichols générant les précurseurs oligosaccharidiques.

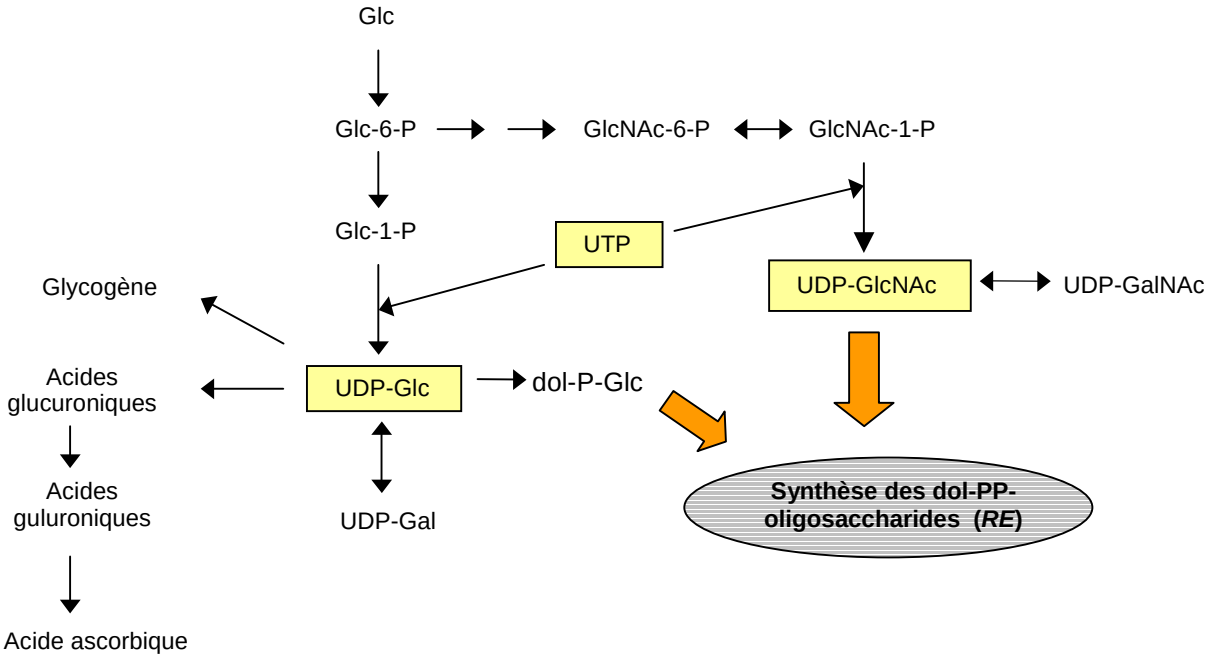


Figure V.9 : Implication de l'UTP, l'UDP-Glc et l'UDP-GlcNAc dans la biosynthèse des dol-PP-oligosaccharides se déroulant dans le reticulum endoplasmique.

Pools de nucléotides triphosphates

Molécules biologiques ubiquitaires, les nucléotides sont essentiels pour le métabolisme énergétique cellulaire. Ils participent à de nombreux processus biochimiques cellulaires et peuvent exercer un large potentiel de régulation. Ils participent à de nombreuses réactions en tant que substrats, produits, effecteurs ou donneurs d'énergie. De plus, les fluctuations au niveau des pools peuvent altérer les transports, les synthèses et la croissance cellulaire. Constituants principaux des acides nucléiques, précurseurs impliqués dans la synthèse de l'ARN et de l'ADN, les concentrations en nucléotides vont évoluer avec le cycle de croissance. Le rôle majeur de l'UTP dans les voies de biosynthèse de l'UDP-GlcNAc et l'UDP-Glc a déjà été abordé précédemment. Le CTP est un nucléotide impliqué dans les voies de biosynthèse des lipides, en particulier dans la synthèse du dolichol, groupement lipidique d'attache des structures N-glycanniques. Enfin, le GTP est un précurseur nécessaire à l'élaboration du GDP-Man.

Il va de soi que l'ATP s'avère être un nucléotide triphosphate capital pour le métabolisme des cellules. En effet, l'ATP joue un rôle majeur dans les réactions du métabolisme énergétique, constitue un substrat pour les réactions de phosphorylation des

protéines et sa concentration intracellulaire est reliée à de nombreuses synthèses cellulaires. De ce fait, l'ATP va réguler, du moins en partie, la plupart des voies métaboliques. Les concentrations en ATP sont maximales quand les fibroblastes de souris sont en phase S, lorsque la division cellulaire est maximale. La concentration intracellulaire en ATP est reliée à la disponibilité en glucose et en glutamine. Barnabé et Butler (2000) ont estimé que le métabolisme de la glutamine était responsable pour 17 à 28% de la production d'ATP dans les hybridomes, alors que le reste est fourni par le glucose.

En milieu RPMI sans sérum, on peut observer une diminution des concentrations intracellulaires en ATP, CTP, GTP et UTP très tôt en début de culture, après que les cellules aient atteint leur vitesse spécifique maximale de croissance. Cette diminution n'est pas empêchée par la présence de sérum. En revanche, en milieu PF-BDM, la chute des concentrations intracellulaires en nucléotides triphosphates est moins prononcée et plus tardive, et dans ces conditions de culture, le profil de glycosylation de l'IFN-γ demeure constant tout au long du procédé. Ces résultats suggèrent qu'un maintien des pools en nucléotides triphosphates à un niveau élevé, pourrait avoir une influence sur la variation d'occupation des sites de glycosylation de l'IFN-γ synthétisé par les cellules CHO.

Charge énergétique

La charge énergétique varie avec le milieu de culture utilisé. En effet, en milieu RPMI sans sérum, on peut observer une chute de la charge énergétique dès que les cellules ont atteint leur vitesse spécifique maximale de croissance. Le phénomène est similaire en présence de sérum, bien qu'il semble que le sérum prolonge légèrement la durée pendant laquelle la charge énergétique est à des valeurs élevées.

En milieu PF-BDM, la charge énergétique est maintenue à des valeurs élevées (supérieures à 0,95) durant une durée plus longue (60 heures environ). Une diminution de la charge énergétique se produit néanmoins en milieu PF-BDM, alors que la production d'IFN-γ n'a plus lieu. On peut ainsi supposer qu'un maintien d'une charge énergétique cellulaire permet de maintenir un profil de glycosylation constant. En effet, les cellules cultivées en milieu RPMI, avec et sans sérum, utiliseraient les nucléotides triphosphates disponibles pour le maintien de leur métabolisme énergétique, et ce au détriment des synthèses *de novo* et des réactions de la glycosylation. Une synthèse et une disponibilité moindre des précurseurs impliqués dans les réactions de la glycosylation pourraient expliquer la sous-glycosylation de

l'IFN-γ, en particulier lorsque sa production est maximale, en début de phase exponentielle de croissance.

Profil de glycosylation constant de l'IFN-γ en milieu PF-BDM

Comment expliquer le maintien d'une glycosylation constante lorsque les cellules CHO sont cultivées en milieu PF-BDM ? Ce milieu de culture est particulièrement riche de par la diversité des molécules qui entrent dans sa composition et de par leur concentration. Il s'agit d'un milieu dont la composition a été optimisée pour la croissance d'hybridomes (Schneider, 1989).

Milieu sans sérum, il ne contient pas non plus de protéines, mais de nombreux éléments minéraux. En ce qui concerne les acides aminés, certains sont présents à des concentrations supérieures à celles retrouvées dans le milieu RPMI (acide glutamique, histidine, lysine, phénylalanine, proline, thréonine, tyrosine et valine). D'autres acides aminés, comme l'alanine et la cystéine, sont même totalement absents dans le milieu RPMI. Le milieu PF-BDM contient également de nombreuses vitamines, qui sont pratiquement toutes absentes de la composition du milieu de culture RPMI. Enfin, on va retrouver dans le milieu PF-BDM une large gamme de cofacteurs et précurseurs nucléotidiques, qui sont également absents de la composition du milieu RPMI. Même s'il est difficile d'obtenir la composition précise du sérum, celui-ci apporte des lipides en quantité plus importante (cholestérol, HDL, LDL, phospholipides et triglycérides) que dans le milieu PF-BDM, qui ne contient que les acides linoléique et thiotactique. En revanche, si l'on se réferre à la composition du sérum de veau fœtal indiquée par le fournisseur, les concentrations en vitamines mesurées dans le sérum sont nettement inférieures à celles retrouvées dans le milieu PF-BDM (tableau II.1 du chapitre II).

On peut ainsi supposer que la présence additionnelle de ces éléments dans le milieu PF-BDM va permettre aux cellules de pallier des limitations nutritionnelles. Les acides aminés participent aux voies de biosynthèse des nucléotides puriques et pyrimidiques, induisant ainsi un état énergétique cellulaire favorable. Des précurseurs nucléotidiques sont même directement apportés aux cellules, évitant ainsi leur synthèse *de novo*. Ces « économies de synthèse » sont susceptibles d'améliorer le métabolisme énergétique et d'augmenter l'efficacité de la glycosylation de l'IFN-γ par les cellules.

3. Suivi des pools intracellulaires de nucléotides et nucléotides-sucres au cours d'une culture semi-continue de cellules CHO productrices d'IFN-γ cultivées en milieu RPMI avec sérum

Si l'on suppose que le métabolisme énergétique est susceptible d'avoir une influence sur les pools de nucléotides et nucléotides-sucres, des concentrations intracellulaires plus importantes pourraient permettre de maintenir le profil de glycosylation de l'IFN-γ constant au cours du temps.

La stratégie utilisée pour maintenir une charge énergétique élevée a consisté à réaliser une culture semi-continue de cellules CHO 320, cultivées en milieu RPMI supplémenté par 10% de sérum. En effet, une culture discontinue réalisée en milieu RPMI avec sérum présentait une diminution de la glycosylation de l'IFN-γ. Dans un premier temps, le procédé a été mis en œuvre en mode discontinu, puis après environ 60 heures de culture, afin de procéder au mode semi-continu, l'alimentation continue en milieu neuf a débuté. Le moment de l'alimentation en milieu de culture a été choisi judicieusement : en effet, on se place dans des conditions où les cellules CHO sont en phase exponentielle de croissance, la vitesse spécifique de croissance cellulaire est en phase ascendante et la proportion d'IFN-γ glycosylé sur deux sites est normalement proche de 70%. L'objectif majeur est ainsi de maintenir une proportion constante de molécules d'IFN-γ biglycosylées sur une période prolongée, et ce par l'alimentation en milieu de culture RPMI avec sérum. Outre les paramètres physiologiques classiquement étudiés (viabilité cellulaire, consommation des substrats et production de métabolites), nous avons également suivi l'évolution des pools de nucléotides et nucléotides-sucres ainsi que la charge énergétique, de façon à déterminer si le maintien d'une charge énergétique élevée permet de maintenir un profil de glycosylation constant de l'IFN-γ.

3.1 Etude macrocinétique de la culture semi-continue

3.1.1 Croissance cellulaire

En mode discontinu, la densité cellulaire en cellules viables augmente jusqu'à atteindre $3{,}5.10^5$ cellules/mL. Au bout de 60 heures de culture, lorsque l'alimentation en milieu de culture frais débute, la vitesse spécifique de croissance est de 0,02 h^{-1} (figure V.10).

Le débit d'alimentation est fixé à 48 mL/h de façon à se placer dans des conditions où le taux de dilution D est égal à 0,02 h^{-1}. Il s'agit ainsi ne pas trop diluer les cellules par l'ajout de milieu de culture neuf mais de l'ajouter néanmoins en quantité suffisante pour apporter les éléments nutritifs nécessaires. Tout au long du procédé, le débit d'alimentation du milieu de culture neuf ne varie pas et reste fixé à 48 mL/h. Le taux de dilution va donc diminuer de 0,02 à 0,013 h^{-1} jusqu'à environ 85 heures de culture. A ce moment, le taux de dilution augmente brusquement en raison du soutirage de 2 L de milieu de culture, ce soutirage étant nécessaire compte-tenu de la capacité volumique du bioréacteur. Ensuite, le taux de dilution diminue à nouveau progressivement en raison de l'augmentation du volume de milieu dans le bioréacteur. Le milieu de culture neuf est du milieu RPMI contenant 10% de sérum, 20 mM de glucose et 4 mM de glutamine, il a donc la même composition que le milieu de culture utilisé pour démarrer la culture en mode discontinu.

Lorsque le mode semi-continu est mis en place, la densité en cellules viables diminue au début de l'alimentation, puis celle-ci se stabilise à $2{,}6.10^5$ cellules/mL. Quant à la vitesse spécifique de croissance cellulaire, elle est initialement de 0,02 h^{-1} puis évolue en fonction du taux de dilution. Elle se maintient à une valeur moyenne de 0,012 h^{-1}. Il est important de noter que cette valeur de μ est supérieure à celle que l'on observe au moment où chute la glycosylation de l'IFN-γ produit par les cellules CHO, dans le même milieu de culture, mais en mode discontinu.

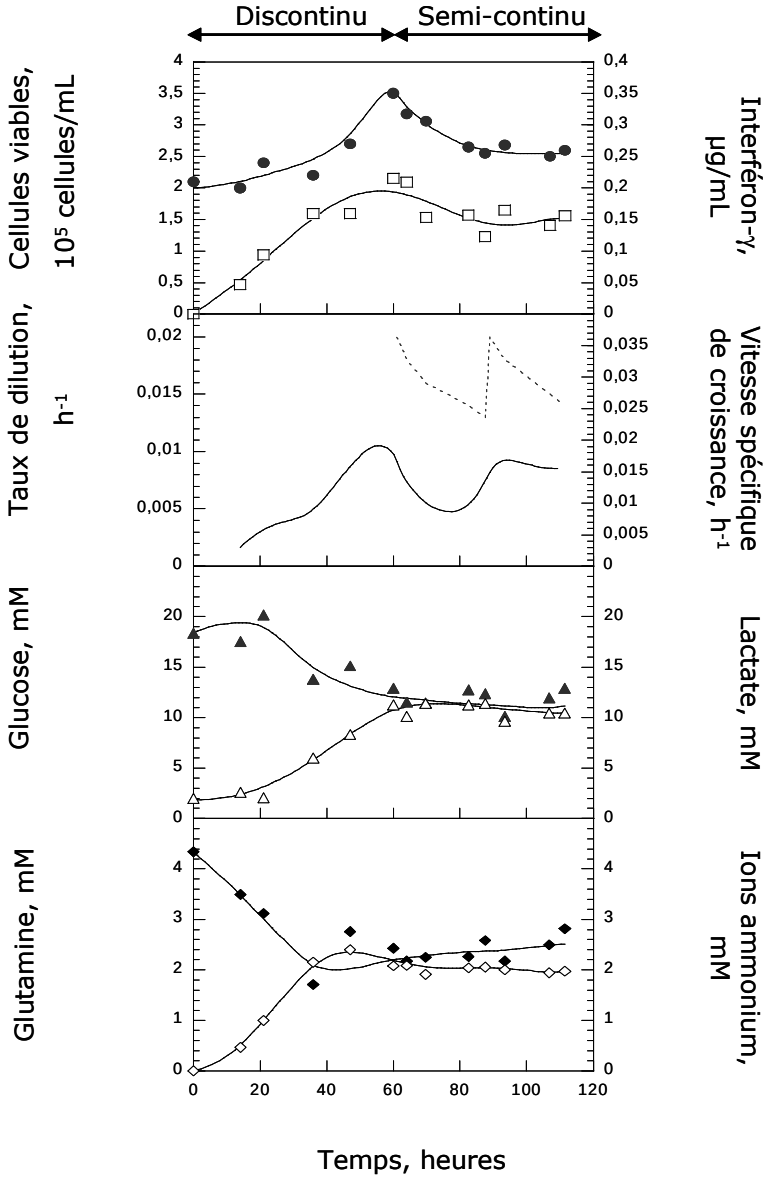


Figure V.10 : Evolution de la concentration en cellules viables (●), de la production d'IFN-γ (□), du taux de dilution (·····), de la vitesse spécifique de croissance (–), de la consommation de glucose (▲) et de glutamine (◆), et de la production de lactate (△) et d'ions ammonium (◇) au cours de la culture de cellules CHO 320, cultivées en milieu RPMI avec sérum, en mode semi-continu.

3.1.2 Production et macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ

En mode discontinu, la production en IFN-γ suit la croissance cellulaire pour atteindre une concentration d'environ 0,2 µg/mL (figure V.10). En mode semi-continu, la concentration en IFN-γ diminue en début de culture, avant de se stabiliser à une valeur moyenne de 0,14 µg/mL. La vitesse spécifique de production de l'IFN-γ demeure égale à une valeur moyenne de 0,01 µg/10^5 cellules/h (données non montrées).

L'évolution de la macrohétérogénéité de la glycosylation est présentée sur la figure V.11. Lorsque les cellules CHO 320 sont cultivées en mode discontinu, les proportions de chacune des trois glycoformes sont maintenues à des valeurs constantes. Les glycoformes 2N, 1N et 0N sont présentes respectivement à raison de 65%, 15% et 20%. On constate que l'alimentation en milieu de culture neuf permet de maintenir un profil de glycosylation de l'IFN-γ stable et maximum tout au long de la culture, contrairement aux procédés discontinus effectués danns ce milieu de culture.

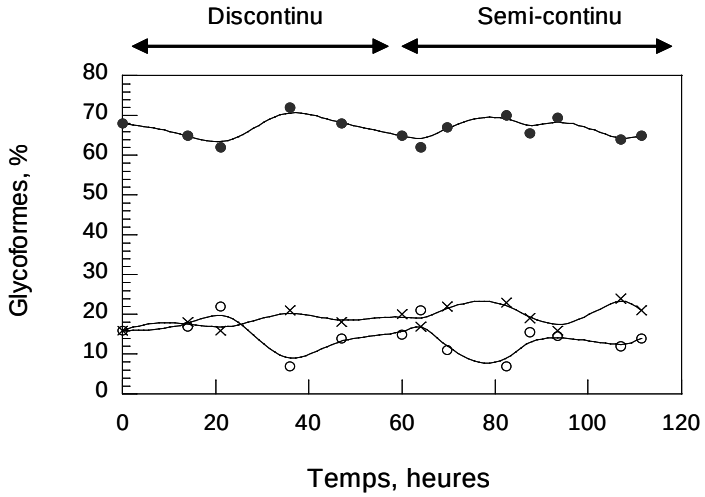


Figure V.11 : Evolution de la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ au cours de la culture semi-continue de cellules CHO 320, cultivées en milieu RPMI avec sérum. IFN-γ 2N : ● ; IFN-γ 1N : ○; IFN-γ 0N : × .

3.1.3 Consommation du glucose et de la glutamine

La concentration initiale en glucose est de 20 mM ; en fin de culture discontinue, elle est de 13 mM. Lorsque la culture en mode semi-continu débute, la concentration en glucose extracellulaire reste relativement constante et non limitante, à une valeur moyenne de 13 mM (figure V.10).

En mode discontinu, la vitesse spécifique de consommation du glucose augmente pour atteindre de 0,016 µmol/10^5 cellules/h au bout de 32 heures puis diminue progressivement (figure V.12). Cette évolution est classique et similaire à celle observée lors de cultures réalisées en bioréacteur avec ces mêmes cellules, dans les mêmes conditions. Lorsque l'alimentation en milieu frais débute, la vitesse spécifique de consommation du glucose demeure stable, à des valeurs proches de 0,045 µmol/10^5 cellules/h.

Tout comme le glucose, la concentration en glutamine diminue en mode discontinu puis se stabilise en mode semi-continu (figure V.10). Sa concentration initiale est de 4 mM; sa concentration résiduelle est d'environ 2,2 mM en fin de culture discontinue et 2,8 mM en fin de culture semi-continue.

En ce qui concerne la vitesse spécifique de consommation de la glutamine, elle suit une évolution similaire à celle observée pour le glucose. Elle est maximale après 24 heures de culture pour atteindre une valeur de 0,03 µmol/10^5 cellules/h, puis diminue pour se stabiliser en mode semi-continu à une valeur approximative de 0,011µmol/10^5 cellules/h (figure V.12).

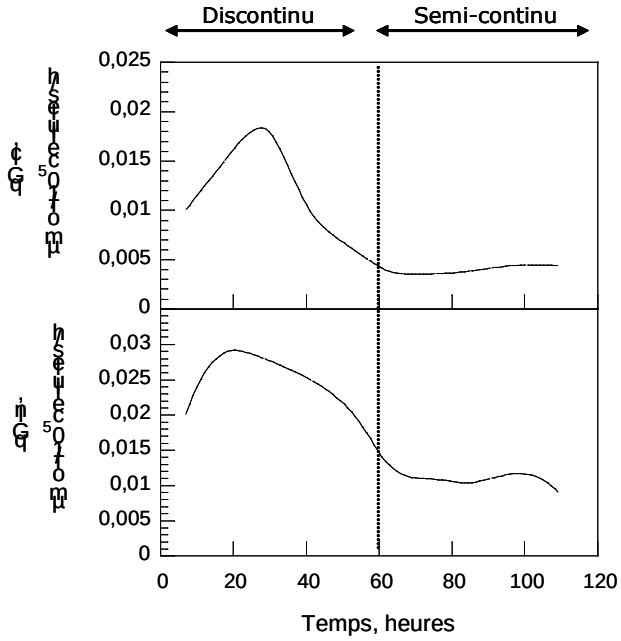


Figure V.12 : Evolution des vitesses spécifiques de consommation du glucose (q glc) et de glutamine (q gln) au cours de la culture de cellules CHO 320, cultivées en milieu RPMI avec sérum, en mode semi-continu.

3.1.4 Production de lactate et d'ions ammonium

Au fur et à mesure que le glucose est consommé, on observe une augmentation de la concentration en lactate. En fin de culture discontinue, la concentration en lactate est voisine de 11 mM (figure V.10). En mode semi-continu, en conséquence d'une stabilisation du rendement $Y_{lac/glc}$, cette concentration maintient aux environs de 10 mM.

Parallèlement à la consommation de glutamine, on peut observer une augmentation de la concentration en ions ammonium, qui atteint 2 mM en fin de culture discontinue (figure

V.10). Cette concentration est identique au cours du procédé en mode semi-continu et le rendement $Y_{NH4+/gln}$ demeure constant.

3.2 Evolution des pools intracellulaires de nucléotides et nucléotides-sucres et de la charge énergétique au cours de la culture semi-continue de cellules CHO productrices d'IFN-γ

Les contenus intracellulaires en nucléotides et nucléotides-sucres mesurés tout au long d'une culture discontinue puis semi-continue de cellules CHO 320, cultivées en milieu RPMI avec sérum, sont présentés sur la figure V.13.

En mode discontinu, les pools de nucléotides et nucléotides-sucres suivent des évolutions comparables à celles observées lors des cultures discontinues précédentes. Après 60 heures de culture, les concentrations intracellulaires en nucléotides et nucléotides-sucres sont voisines de celles mesurées lors de la culture discontinue présentée dans le paragraphe 2 du chapitre V. L'alimentation en milieu de culture neuf permet de maintenir des concentrations en nucléotides et nucléotides-sucres, à des niveaux équivalents à ceux atteints juste avant que ne commence l'alimentation.

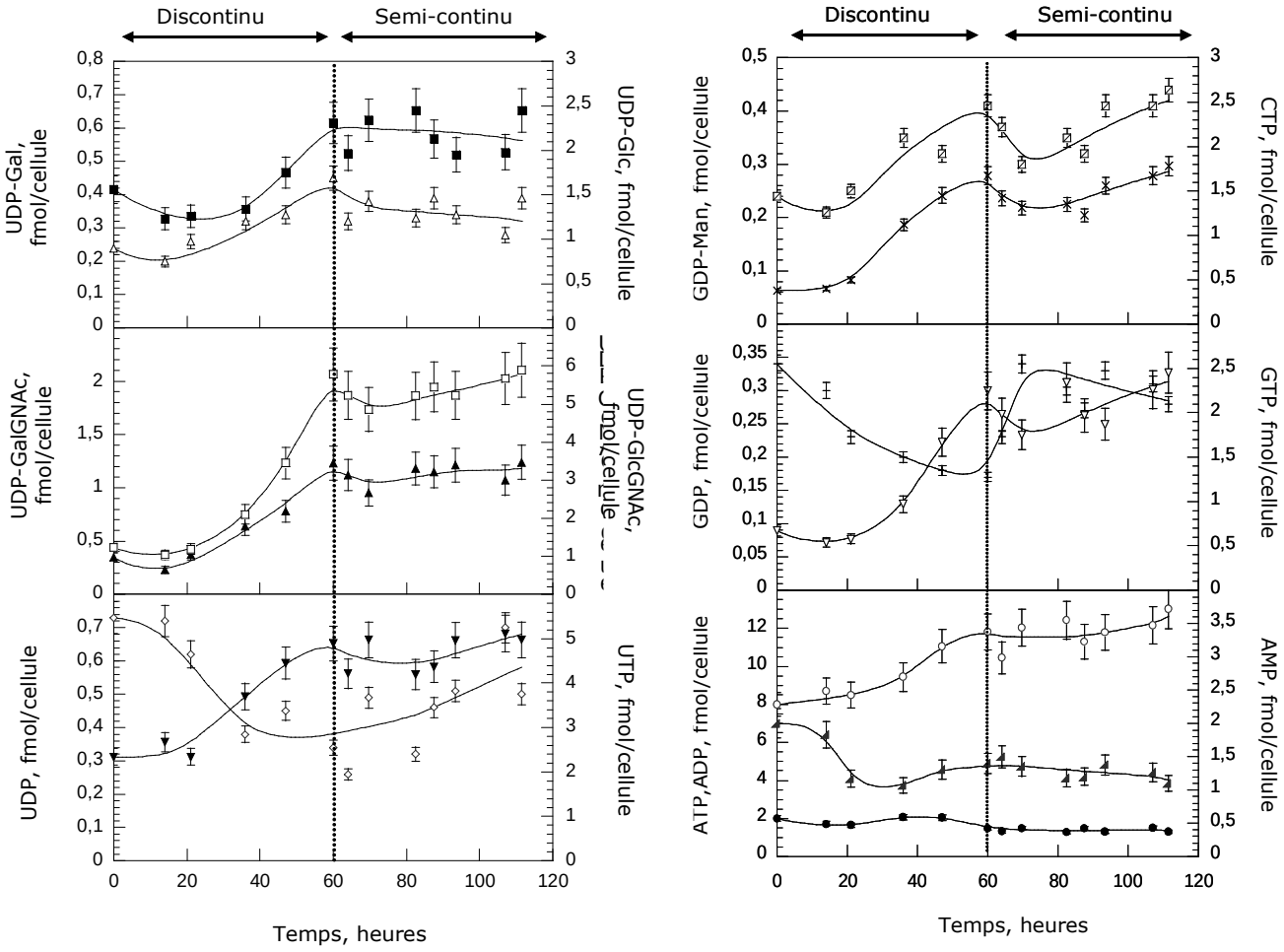


Figure V.13 : Evolution des concentrations intracellulaires en nucléotides et nucléotides-sucres au cours de la culture de cellules CHO 320, cultivées en milieu RPMI avec sérum en mode semi-continu. UDP-Gal : △ , UDP-Glc : ■ , UDP-GalNAc : ▲ , UDP-GlcNAc : □ , UDP : ▼, UTP : ◇ , GDP-Man : ⧄ , CTP : × , GDP : +; GTP : ▽, ATP : ○ , ADP : ● , AMP : ◢.

L'évolution de la charge énergétique au cours de la culture discontinue est présentée sur la figure V.14. En mode discontinu, elle est maintenue à des valeurs relativement élevées, de l'ordre de 0,8, ce qui correspond aux valeurs attendues. En mode semi-continu, il semble que l'alimentation en milieu de culture neuf permette de maintenir une charge énergétique élevée, et ceci contrairement à ce qui a été observé en mode discontinu, où une chute de la charge énergétique se produisait après environ 40 heures de culture.

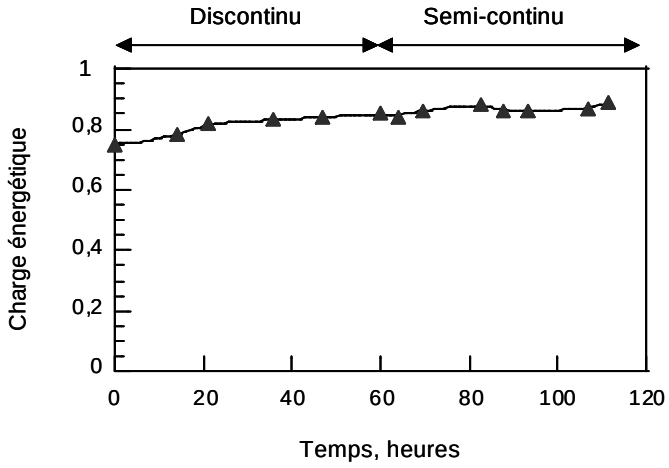


Figure V.14 : Evolution de la charge énergétique au cours de la culture semi-continue de cellules CHO 320, cultivées en milieu RPMI avec sérum.

3.3 Discussion

La mise en œuvre en mode semi-continu avec une alimentation en milieu frais (milieu RPMI supplémenté par 10% de sérum) permet de maintenir un profil de glycosylation de l'IFN-γ constant : la proportion de chacune des trois glycoformes de l'IFN-γ n'évolue pas au cours du temps. Tout au long du procédé semi-continu, les proportions d'IFN-γ 2N, 1N et 0N sont respectivement de 65%, 15% et 25%.

Pour empêcher la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ observée au cours de cultures discontinues, la stratégie d'un mode de culture en semi-continu a déjà été évoquée dans la littérature. En effet, Xie *et al*. (1997) ont réalisé des cultures semi-continues de cellules CHO productrices d'IFN-γ en milieu sans sérum. Contrairement aux cultures discontinues où une diminution de la glycosylation de l'IFN-γ a été observée, la proportion d'IFN-γ glycosylé sur deux sites est maintenue constante à 80%, alors que la proportion d'IFN-γ glycosylé sur un site et aucun site est maintenue à 20%. Cependant, si les cellules sont placées dans des conditions de limitation en glucose pendant une courte période, la proportion de molécules d'IFN-γ glycosylées sur deux sites diminue. Ces auteurs expliquent ainsi le maintien de la qualité de l'IFN-γ en mode semi-continu par l'apport continu de glucose.

Des résultats similaires ont été obtenus par Goldman *et al*. (1998). Une culture de cellules CHO productrices d'IFN-γ effectuée en mode perfusé permet de maintenir les proportions de chacune des glycoformes de l'IFN-γ constantes tout au long du procédé. Un apport constant d'éléments nutritifs nécessaires à la croissance cellulaire, des contraintes de cisaillement moindres et l'élimination de métabolites toxiques en cultures perfusées sont les hypothèses proposées par ces auteurs pour expliquer le profil de glycosylation constant de l'IFN-γ. Plus récemment, Wong *et al*. (2004) ont réalisé des cultures semi-continues avec pilotage de la glutamine résiduelle. De cette façon, une concentration relativement constante a pu être maintenue tout au long du procédé. Dans ces conditions, la qualité de l'IFN-γ produit demeure constante, suggérant que l'alimentation en continu permet d'éviter des limitations nutritionnelles.

Au regard de l'ensemble de ces résultats, il paraît donc évident que l'alimentation continue en milieu de culture frais permet de maintenir un profil de glycosylation de l'IFN-γ inchangé au cours du temps, en empêchant probablement des phénomènes de limitation nutritionnelle. Néanmoins, toutes les explications proposées par les différents auteurs en reste au stade des hypothèses.

Afin de mieux comprendre pourquoi la glycosylation de l'IFN-γ est favorisée dans des conditions de culture semi-continues, nous avons suivi l'évolution des pools intracellulaires de nucléotides et nucléotides-sucres au cours du procédé. Les concentrations en nucléotides et nucléotides-sucres sont plus ou moins constantes tout au long de la culture semi-continue, et ce en dépit de la variation du taux de dilution et de la vitesse spécifique de croissance cellulaire. Quant à la charge énergétique, elle est également constante et maintenue à des valeurs proches de 0,9 tout le long du procédé, contrairement à ce qui était observé lors des cultures discontinues. Ces résultats proposent ainsi d'établir une relation entre la glycosylation et le métabolisme énergétique cellulaire. En effet, au cours des cultures discontinues de cellules CHO cultivées en milieu RPMI avec ou sans sérum, on observe une diminution significative des concentrations intracellulaires en nucléotides triphosphates accompagnée par une diminution de la charge énergétique. On peut supposer que si les cellules ont une charge énergétique moindre, elles utilisent préférentiellement les sources de carbone disponibles pour le maintien du métabolisme énergétique, au détriment des synthèses *de novo*, des précurseurs de la glycosylation. En milieu RPMI avec et sans sérum, la charge

énergétique chute rapidement et relativement brutalement en début de culture. La synthèse des dol-PP-oligosaccharides nécessite l'utilisation de nucléotides triphosphates et de nucléotides-sucres et les voies de biosynthèse des nucléotides-sucres nécessitent elles–aussi l'utilisation de nucléotides triphosphates. Ainsi, si les cellules ont une charge énergétique faible, on peut supposer que les nucléotides triphosphates disponibles seront détournés préférentiellemnt pour le maintien du métabolisme énergétique et ce au détriment des synthèses des nucléotides-sucres nécessaires à l'élaboration des dol-PP-oligosaccharides, ensuite transférés sur les protéines en voie de synthèse. Lorsque les cellules CHO 320 sont cultivées en milieu PF-BDM, le phénomène de sous- glycosylation n'est pas observé et la quantité de dol-PP-oligosaccharides synthétisée est plus importante que dans le cas de la culture discontinue de cellules CHO C5 en milieu RPMI sans sérum. Or, c'est dans ce dernier milieu que se produit la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ. Ainsi, en milieu RPMI sans sérum, une disponibilité en précurseur oligosaccharidique moindre pourrait engendrer une diminution de la glycosylation des protéines.

4. Conclusion du chapitre V

Le processus de glycosylation est un processus complexe qui s'effectue par l'action successive de glycosyltransférases spécifiques, catalysant le transfert d'un monosaccharide apporté par un nucléotide-sucre sur un accepteur. La méthode CLHP de paire d'ions développée pour notre étude nous a permis d'analyser, tout au long d'une culture de cellules CHO, l'évolution des concentrations en UDP-Gal, UDP-Glc, UDP-GalNAc, UDP-GlcNAc et GDP-Man, impliqués dans les réactions de synthèse des dol-PP-oligosaccharides se déroulant dans le RE, ainsi que les concentrations en nucléotides comme l'ATP, l'ADP, l'AMP, le CTP, le GDP, le GTP, l'UDP et l'UTP.

Au moment où chute la proportion de molécules d'IFN-γ glycosylées sur deux sites dans les cultures discontinues réalisées en milieu RPMI avec et sans sérum, c'est-à-dire après 40 à 50 heures de culture, les concentrations en GDP-Man sont voisines de celles mesurées dans les cultures réalisées en milieu PF-BDM. On peut ainsi supposer que si ce nucléotide-sucre n'est pas limitant pour la glycosylation de l'IFN-γ en milieu PF-BDM, il ne devrait pas l'être dans les cultures effectuées en milieu RPMI avec et sans sérum. Les concentrations en

UDP-GlcNAc et UDP-GalNAc augmentent au cours des quatre cultures discontinues, ce qui suggère que l'UDP-GlcNAc ne semble pas être limitant pour la glycosylation de l'IFN-γ.

L'implication de l'UDP-Glc dans la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ s'avère moins évidente. Bien que l'UDP-Glc puisse être potentiellement limitant lorsque les cellules CHO sont cultivées en milieu RPMI sans sérum, la présence de sérum dans le milieu de culture semble ralentir la diminution de la concentration en UDP-Glc. En revanche, dans ces deux conditions de culture, la concentration en UDP-Gal est maintenue à un niveau basal. Au regard de ces résultats, il paraît ainsi difficile de conclure définitivement quant la limitation potentielle en UDP-Glc pour la glycosylation de l'IFN-γ.

En ce qui concerne les nucléotides triphosphates, les concentrations intracellulaires en ATP, CTP, GTP et UTP chutent précocemment en début de culture, en milieu RPMI sans sérum, après que les cellules aient atteint leur vitesse spécifique maximale de croissance. Cette diminution n'est pas empêchée par la présence de sérum. En revanche, en milieu PF-BDM, la chute des concentrations intracellulaires en nucléotides triphosphates est moins prononcée et plus tardive, et dans ces conditions de culture, le profil de glycosylation de l'IFN-γ demeure inchangé tout au long du procédé. Ces résultats suggèrent qu'un maintien des pools intracellulaires de nucléotides triphosphates, à un niveau élevé, pourrait avoir une influence sur la variation d'occupation des sites de glycosylation de l'IFN-γ produit par les cellules CHO.

Enfin, la charge énergétique est maintenue à des valeurs plus élevées pendant une période plus longue en milieu PF-BDM, par comparaison avec les cultures effectuées en milieu RPMI avec et sans sérum. La diminution de la charge énergétique se produit également dans les cultures réalisées en milieu PF-BDM, mais lorsque la production d'IFN-γ a cessé. L'influence de la charge énergétique et des pools intracellulaires de nucléotides triphosphates et de nucléotides-sucres sur la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ semble être confirmée par la mise en œuvre de la culture réalisée en mode semi-continu en milieu RPMI avec sérum. En effet, l'alimentation en milieu de culture frais permet de maintenir, d'une part, une charge énergétique élevée et, d'autre part, qu'un profil de glycosylation constant de l'IFN-γ au cours du temps.

CONCLUSION GENERALE

ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE

Ce travail s'intègre dans l'objectif général d'une meilleure maîtrise de la glycosylation des protéines recombinantes produites au cours de procédés de culture en masse de cellules animales.

De façon plus précise, l'approche développée vise à l'amélioration de la compréhension des mécanismes biochimiques intracellulaires régissant la N-glycosylation et la détermination d'étapes potentiellement limitantes pour ce processus.

La démarche expérimentale s'est focalisée, en particulier, sur l'analyse et le suivi de multiples composés intracellulaires susceptibles d'influencer la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ produit au cours de cultures discontinues de cellules CHO. Ainsi, nos travaux se distinguent de ceux apportés par la littérature, qui considèrent généralement des analyses de composés individuels, à un moment précis d'une culture sans contrôle précis de l'état physiologique des cellules. Dans un premier temps, l'influence de la composition de milieux de culture sur la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ et sur la quantité et la qualité de précurseurs intracellulaires de la glycosylation a été déterminée, dont, en particulier, les glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides. Par ailleurs, la mise au point d'une méthode d'analyse par CLHP nous a permis d'analyser simultanément treize nucléotides et nucléotides-sucres, précurseurs impliqués dans les réactions de la glycosylation. Cette méthode a ensuite été appliquée au suivi de l'évolution des concentrations intracellulaires de nucléotides et nucléotides-sucres au cours des cultures en bioréacteurs.

Les principales contributions se dégageant de nos résultats seront tout d'abord résumées, puis nous proposerons des perspectives visant à compléter, confirmer ou élargir notre étude.

Influence du milieu de culture sur la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ

L'influence du milieu de culture sur la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ humain recombinant est clairement établie par la mise en œuvre des cultures discontinues de cellules CHO en milieu RPMI sans sérum, en milieu RPMI avec sérum et en milieu PF-BDM. Les proportions de chacune des trois glycoformes de l'IFN-γ évoluent au cours des cultures discontinues de cellules CHO cultivées dans le milieu RPMI sans sérum. Ceci se traduit par une diminution du pourcentage de molécules d'IFN-γ glycosylées sur deux sites au profit des molécules d'IFN-γ non glycosylées. La présence de sérum (10%) dans le milieu de culture n'empêche pas la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ. En revanche, une culture discontinue de cellules CHO réalisée en milieu PF-BDM permet la production d'IFN-γ possédant un profil de glycosylation constant tout au long du procédé. Au regard de la composition particulièrement riche du milieu PF-BDM par comparaison avec celle du milieu RPMI sans sérum ou supplémenté par 10% de sérum de veau foetal, il est probable que les constituants de ce milieu contribuent à un meilleur déroulement du processus de glycosylation de l'IFN-γ en levant les effets potentiellement limitants observés dans les autres milieux de culture.

Suivi des paramètres macrocinétiques (consommation des substrats et production de métabolites)

Lorsque les cellules CHO C5 sont cultivées en mode discontinu dans le milieu RPMI sans sérum, ni le glucose, ni la glutamine ne sont limitants pour la croissance cellulaire au moment où chute la glycosylation de l'IFN-γ, suggérant que ces deux substrats ne le sont pas non plus pour les réactions de glycosylation. Ainsi, contrairement à la majorité des travaux relatifs à l'étude de la glycosylation des protéines recombinantes, nos résultats montrent que le phénomène de sous-glycosylation observé dans le cas de l'IFN-γ se produit en absence de limitation en glucose. De plus, les métabolites toxiques comme le lactate ou les ions ammonium ne semblent pas être présents à des concentrations susceptibles d'influencer la variation d'occupation des sites de glycosylation de l'IFN-γ.

Supplémentation en IFN-γ

La supplémentation en IFN-γ augmente la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines, sans pour autant augmenter de façon aussi significative les vitesses spécifiques de synthèse des dol-PP-oligosaccharides et du dol-P-Man. L'influence de la supplémentation en IFN-γ sur la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines a été confirmée par l'utilisation de deux lignées CHO différentes, une lignée productrice d'IFN-γ et une lignée non productrice d'une protéine recombinante. La supplémentation en IFN-γ n'a un effet sur la vitesse spécifique de synthèse des glycoprotéines qu'après 13 heures d'incubation des cellules en présence d'IFN-γ. De plus, son influence ne se manifeste qu'à partir d'une concentration voisine de 100 ng/mL. Ainsi, l'effet inhibiteur de l'IFN-γ sur sa propre glycosylation, souvent proposé dans la littérature pour expliquer la diminution du pourcentage de molécules d'IFN-γ glycosylés sur deux sites, ne semble pas être démontré par nos expériences.

Structure et quantité de glycannes portés par les dol-PP-oligosaccharides

L'utilisation de marquages radioactifs au [2-^{3}H] mannose a permis la caractérisation, au cours du temps, de la structure des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides. Au cours d'une culture discontinue de cellules CHO cultivées en milieu RPMI sans sérum, la structure des glycannes portés par les dol-PP-oligosaccharides demeure inchangée et de type $Glc_3Man_9GlcNAc_2$, structure classiquement transférée sur les protéines en voie de synthèse dans les cellules CHO. Ainsi, l'évolution de la structure des glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides n'est pas responsable de la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ.

La quantité de précurseurs oligosaccharidiques synthétisés par les cellules CHO C5, cultivées en milieu RPMI sans sérum, reste constante et relativement faible au cours d'une culture discontinue. De plus, la présence d'une seule structure de type $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ est détectée par FACE, confirmant ainsi les résultats obtenus à l'aide des marquages radioactifs au [2-^{3}H] mannose. En comparaison, l'évolution de la quantité de glycannes associés aux dol-PP-oligosaccharides synthétisés par des cellules CHO 320 en milieu PF-BDM est constante en début de culture, puis augmente lorsque les cellules ralentissent leur croissance. En début de culture, la quantité de glycannes associés aux précurseurs est deux fois plus importante en

milieu PF-BDM qu'en milieu RPMI sans sérum, laissant suggérer qu'une moindre disponibilité des dol-PP-oligosaccharides, en milieu RPMI sans sérum, pourrait être impliquée dans la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ.

Mise au point d'une méthode d'analyse par CLHP de paire d'ions des nucléotides et nucléotides-sucres intracellulaires

Le développement d'une méthode d'analyse par CLHP de paire d'ions a rendu possible l'analyse simultanée, en une seule étape chromatographique, de treize nucléotides et nucléotides-sucres, à savoir huit nucléotides (AMP, ADP, ATP, CTP, GDP, GTP, UDP et UTP) et cinq nucléotides-sucres (GDP-Man, UDP-Gal, UDP-Glc, UDP-GalNAc et UDP-GlcNAc. De plus, contrairement à la majorité des méthodes CLHP de paire d'ions, la méthode d'analyse mise au point pour notre étude offre l'avantage de pouvoir séparer et quantifier, l'UDP-Glc et l'UDP-Gal d'une part, et l'UDP-GalNAc et l'UDP-GlcNAc d'autre part. Pour des mélanges standards, le pourcentage d'erreur sur la mesure est compris entre 1% et 13% pour l'UDP et l'UDP-GalNAc respectivement. Les seuils de sensibilité varient en fonction de la molécule considérée, et sont compris entre 7,5 et 150 pmol/injection pour l'AMP et l'UTP respectivement. Par ailleurs, la résolution et la sensibilité de la méthode autorisent également la mesure de faibles variations des concentrations de ces molécules issues d'extraits cellulaires tout au long d'un procédé de culture.

Suivi des pools intracellulaires de nucléotides et nucléotides-sucres au cours des cultures discontinues de cellules CHO

Le suivi de l'évolution des concentrations intracellulaires en nucléotides et nucléotides-sucres au cours de cultures discontinues de cellules CHO productrices d'IFN-γ révèle que les nucléotides-sucres comme le GDP-Man, l'UDP-GlcNAc, et l'UDP-GalNAc semblent ne pas être limitants pour la glycosylation de l'IFN-γ en milieu RPMI avec et sans sérum. Une limitation en UDP-Glc ne peut être exclue totalement. En revanche, les pools intracellulaires de nucléotides triphosphates chutent rapidement en début de culture, suggérant qu'ils peuvent être limitants le métabolisme cellulaire et le processus de glycosylation. Lorsque les cellules sont cultivées en mode discontinu dans le milieu PF-BDM, les pools de nucléotides triphosphates sont maintenus à des concentrations plus élevées durant une période

prolongée. Quant à la charge énergétique, elle est influencée par le milieu de culture utilisé. Elle est maintenue à des valeurs élevées, tant que l'IFN-γ est synthétisé, en milieu PF-BDM, alors qu'elle chute précocément en milieu RPMI avec et sans sérum. Le métabolisme énergétique des cellules semble être défavorable tôt en début de culture en milieu RPMI, avec et sans sérum, ce qui peut laisser penser que les précurseurs nucléotidiques disponibles seront utilisés préférentiellement pour le maintien du métabolisme énergétique, au détriment de la synthèse de la glycoprotéine recombinante et du processus de glycosylation.

Influence du mode de culture semi-continu sur la glycosylation de l'IFN-γ

La mise en œuvre d'une culture de cellules CHO en mode semi-continu a permis de maintenir un profil de glycosylation constant de l'IFN-γ. Nos résultats ont également mis en évidence le maintien des pools intracellulaires de nucléotides et nucléotides-sucres à des concentrations proches de celles mesurées avant l'alimentation en milieu de culture frais. De plus, la charge énergétique est maintenue à des valeurs élevées tout au long de la culture semi-continue. Ainsi, ces résultats semblent confirmer la relation existant entre la glycosylation de l'IFN-γ et le métabolisme énergétique cellulaire. Ainsi, notre étude illustre clairement que la production d'une glycoprotéine recombinante de qualité constante exige, non seulement la maîtrise de l'environnement extracellulaire, mais également le contrôle de l'évolution des nombreux précurseurs intracellulaires de la glycosylation tout au long du procédé.

PERSPECTIVES

L'approche expérimentale adoptée au cours de notre étude nous a permis de progresser dans la compréhension des mécanismes biochimiques et des facteurs intracellulaires impliqués dans la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ produit par des cellules CHO cultivées en modes discontinu et semi-continu. En effet, les différentes méthodes mises en œuvre pour la caractérisation des précurseurs intracellulaires de la glycosylation nous ont permis de démontrer l'importance de la prise en compte de ces paramètres pour une meilleure maîtrise de la qualité des glycoprotéines produites au cours de procédés de culture de cellules CHO en bioréacteurs. Cependant, les résultats obtenus suscitent, à leur tour, de nombreuses interrogations, qui nécessiteront des études complémentaires.

En premier lieu, il conviendrait d'identifier les molécules ou les familles de molécules, présentes dans la composition du milieu PF-BDM, autorisant le maintien du profil de glycosylation de l'IFN-γ tout au long d'un procédé discontinu. La supplémentation du milieu de culture RPMI par ces différentes familles de molécules (vitamines, nucléotides, acides aminés, cofacteurs) devrait permettre de déterminer quels constituants sont responsables de la production constante de molécules d'IFN-γ doublement glycosylées. Il sera également particulièrement intéressant de suivre la quantité de dol-PP-oligosaccharides synthétisés ainsi que l'évolution des pools intracellulaires de nucléotides et nucléotides-sucres dans ces milieux de cultures supplémentés.

Afin de clarifier le rôle de l'UDP-Glc dans la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ au cours des cultures discontinues de cellules CHO cultivées dans le milieu RPMI avec et sans sérum, il serait pertinent de suivre l'évolution de la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ tout au long de cultures discontinues ou continues supplémentées par de l'UDP-Glc.

L'étude des précurseurs de la glycosylation pourrait être approfondie par le suivi de l'évolution des concentrations intracellulaires en Man-6-P, en Glc-6-P et en Glc-1-P au cours de cultures discontinues en milieu RPMI avec et sans sérum. Les travaux récents de Gao *et al*. (2005) ont montré que le Man-6-P était susceptible d'induire le transfert sur l'eau des dol-PP-oligosaccharides au détriment de leur transfert sur les protéines. Quant au Glc-6-P, il s'agit

d'un intermédiaire commun aux voies de biosynthèse de l'UDP-GlcNAc et de l'UDP-Glc. Le suivi des concentrations en Glc-1-P, précurseur de la synthèse de l'UDP-Glc, devrait également permettre de déterminer s'il est limitant pour la biosynthèse d'UDP-Glc et d'éclaircir ainsi le rôle potentiellement limitant de l'UDP-Glc dans les cultures de cellules CHO en milieu RPMI avec et sans sérum.

D'autre part, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie de l'influence de la charge énergétique sur la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ et de déterminer, par exemple, s'il existe une charge énergétique « seuil » en deçà de laquelle se produit la diminution de la glycosylation de l'IFN-γ. La supplémentation du milieu de culture RPMI avec et sans sérum par un mélange des quatre nucléotides, ou des bases puriques et pyrimidiques qui leur sont associées, devrait vraisemblablement permettre le maintien des pools intracellulaires de nucléotides triphosphates ainsi que la charge énergétique à des valeurs élevées.

Par ailleurs, l'état énergétique défavorable observé en début de culture dans les cellules cultivées en milieu RPMI avec et sans sérum, est susceptible de conduire à la mise en place de réponses spécifiques destinées à lutter contre ce stress. Compte-tenu de l'étroite relation existant la glycosylation et l'UPR, il pourrait être envisagé de suivre l'évolution de la réponse UPR au cours des cultures discontinues de cellules CHO cultivées en milieux RPMI avec et sans sérum, et de la comparer avec la réponse UPR mesurée lorsque les cellules sont cultivées en milieu PF-BDM.

L'étude de l'influence de la supplémentation en IFN-γ sur sa propre glycosylation mériterait également d'être poursuivie et approfondie. En effet, il conviendrait de tester l'influence de la supplémentation en IFN-γ sur la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN-γ produit par des cellules CHO. En outre, l'influence de la supplémentation en IFN-γ pourrait être testée sur d'autres glycoprotéines recombinantes.

Afin de confirmer ou infirmer l'effet potentiel positif de l'IFN-γ sur la réaction de transfert des glycannes catalysée par l'oligosaccharyltransférase, il serait intéressant de mesurer, *in vitro*, l'influence de la supplémentation en IFN-γ sur le transfert des structures glycanniques portées par les dol-PP-oligosaccharides sur les protéines en voie de synthèse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adair, W.L., and Cafmeyer, N. (1987) Cell-cycle dependence of dolichyl phosphate biosynthesis, *Arch. Biochem. Biophys*. 258: 491-497.

Allan, B.B., and Balch, W.E. (1999) Protein sorting by directed maturation of Golgi compartments, *Science* 285: 63-66.

Allen, S., Naim, H.Y., and Bulleid, N.J. (1995) Intracellular folding of tissue-type plasminogen activator, *J. Biol. Chem*. 270: 4797-4507.

Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I.B., and Marz, L. (1999) Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins, *Glycoconj. J*. 16: 109-123.

Andersen, D.C., and Goochee, C.F. (1995) The effect of ammonia on the O-linked glycosylation of granulocyte colony-stimulating factor produced by Chinese hamster ovary cells, *Biotechnol. Bioeng*. 47: 96-105.

Andersen, D.C., Bridges, T., Gawlitzek, M., and Hoy, C. (2000) Multiple cell culture factors can affect the glycosylation of Asn-184 in CHO-produced tissue-type plasminogen activator, *Biotechnol. Bioeng*. 70: 25-31.

Anderson, C.M., and Parkinson, F.E. (1997) Potential signalling roles for UTP and UDP : sources, regulation and release of uracil nucleotides, *TIPS* 18: 387- 392.

Anumula, K.R., and Spiro, R.G. (1983) Release of glucose-containing polymannose oligosaccharides during glycoprotein biosynthesis, *J. Biol. Chem*. 258: 15274-15282.

Arnaud, A., Fontana, L., Angulo, A.J., Gil, A., and Lopez-Pedrosa, J.M. (2003) Exogenous nucleosides alter the intracellular nucleotide pool in hepatic cell cultures. Implications in cell proliferation and function, *Clin. Nutr*. 22: 391-399.

Asami, Y., Nagano, H., Ikematsu, S., and Murasugi, A. (2000) An approach to the removal of yeast-specific O-linked oligo-mannoses from human midkine expressed in *Pichia pastoris* using site-specific mutagenesis, *J. Biochem*. 128: 823-826.

Atkinson, D.A. (1977) Cellular energy metabolism and its regulation, Academic Press, New-York.

Aumiller, J.J., Hollister, J.R., and Jarvis, D.L. (2003) A transgenic insect cell line engineered to produce CMP-sialic acid and sialylated glycoproteins, *Glycobiology* 13: 497-507.

Bakker, H., Bardor, M., Molthoff, J.W., Gomord, V., Elbers, I., Stevens, L.H., (2001) Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 98: 2899-2904.

Baneyx, F., and Mujacic, M. (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*, *Nat. Biotechnol*. 22: 1399-1408.

Banhegyi, G., Csala, M., Szarka, A., Varsanyi, M., Benedetti, A., and Mandl, J. (2003) Role of ascorbate in oxidative protein folding, *Biofactors* 17: 37-46.

Barnabé, N., and Butler, M. (2000) The effect of glucose and glutamine on the intracellular nucleotide pool and oxygen uptake rate of a murine hybridoma, *Cytotechnol*. 34: 47-57.

Barnabé, N., and Butler, M. (1994) The relationship between intracellular UDP-N-acetyl hexosamine nucleotide pool and monoclonal antibody production in a mouse hybridoma, *J. Biotechnol*. 60: 67-80.

Barnes, D., and Sato, G. (1980) Methods for growth of cultured cells in serum-free medium, *Anal*. *Biochem*. 10: 255- 270.

Bause, E. (1984) Model studies on N-glycosylation of proteins, *Biochem. Soc. Trans*. 12: 514-517.

Bebbington, C.R., Renner, G., Thomson, S., King, D., Abrams, D., and Yarranton, G.T. (1992) High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker, *Biotechnology* 10: 169-175.

Becker, D.J., and Lowe, J.B. (2003) Fucose : biosynthesis and biological function in mammals, *Glycobiology* 13: 41R-53R.

Bessette, P.H., Aslund, F., Beckwith, J., and Georgiou, G. (1999) Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 96: 13703-13708.

Bjoern, S., Foster, D.C., Thim, L., Wiberg, F.C., Christensen, M., Komiyama, Y., Pederson, A.H., and Kisiel, W. (1991) Human plasma and recombinant factor VII. Characterisation of O-glycosylation of serine residues 52 and 60, *J. Biol. Chem*. 266: 11051-11057.

Bobrowicz, P., Davidson, R.C., Li, H., Potgieter, T.I., Nett, J.H., Hamilton, S.R., Stadheim, T.A., Miele, R.G., Bobrowicz, B., Mitchell, T., Rausch, S., Renfer, E., and Wildt, S. (2004) Engineering of an artificial glycosylation pathway blocked in core oligosaccharide assembly in the yeast *Pichia pastoris* : production of complexe humanized glycoproteins with terminal galactose, *Glycobiology* 14: 757-766.

Bonifacino, J.S., and Weissman, A.M. (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways, *Annu. Rev. Cell Dev*. 14: 19-57.

Borys, M.C., Linzer, D.I., and Papoutsakis, E.T. (1994) Ammonia affects the glycosylation patterns of recombinant mouse placental lactogen-I by Chinese hamster ovary cells in a pH-dependant manner, *Biotechnol. Bioeng.* 43: 505-514.

Borys, M.C., Linzer, D.I., and Papoutsakis, E.T (1993) Culture pH affects expression rates and glycosylation of recombinant mouse placental lactogen proteins by Chinese hamster ovary (CHO) cells, *Biotechnology* 11: 720-724.

Braakman I., Helenius J., and Helenius A. (1992) Role of ATP and disulphide bonds during protein folding in the endoplasmic reticulum, *Nature* 356: 260-262.

Branza-Nichita, N., Negroiu, G., Petrescu, A.J., Garman, E.F., Platt, F.M., Wormald, M.R., Dwek, R.A., and Petrescu, S.M. (2000) Mutations at critical N-glycosylation sites reduce tyrosinase activity by altering folding and quality control, *J. Biol. Chem*. 275: 8169-8175.

Breuer, W., and Bause, E. (1995) Oligosaccharyltransferase is a constitutive component of an oligomeric protein complex from pig liver endoplasmic reticulum, *Eur. J. Biochem*. 228: 689-696.

Breuer, W., Klein, R.A., Hardt, B., Bartoschek, A., and Bause, E. (2001) Oligosaccharyltransferase is highly specific for the hydroxyamino acid in Asn-Xaa-Thr/Ser, *FEBS Letters* 501: 106-110.

Brotherton, J.D., and Chau, P.C. (1996) Modeling of axial-flow hollow fiber cell culture bioreactors, *Biotechnol. Prog*. 12: 575-590.

Bry, L., Falk, P.G., and Gordon, J.-L. (1996) Genetic engineering of carbohydrate biosynthetic pathways in transgenic mice demonstrates cell cycle-associated regulation of glyconconjugate production in small intestinal epithelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1161-1166.

Burda, P., Jakob, C.A., Beinhauer, J., Hegemann, J.H., and Aebi, M. (1999) Ordered assembly of the asymmetrically branched lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum is ensured by the substrate specificity of the individual glycosyltransferases, *Glycobiology* 9: 617-625.

Butler, M. (2005) Animal cell cultures : recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals, *Appl. Microb. Biotechnol*. 68: 283-291.

Cacan, R., Duvet, S., Labiau, O., Verbert, A., and Krag, S.S. (2001) Monoglucosylated oligomannosides are released during the degradation process of newly synthetized glycoproteins, *J. Biol. Chem*. 276: 22307-22312.

Cacan, R., and Vebert, A. (1999) Free and N-linked oligomannosides as markers of the quality control of newly synthesized glycoproteins, *Biochem. Biophys. Res. Com*. 258: 1-5.

Cacan, R., Dengremont, C., Labiau, O., Kmiecik, D., Mir, A.M., and Verbert, A. (1996) Occurence of a cytosolic neutral chitobiase activity involved in oligomannoside degradation: a study with Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells, *Biochem. J*. 313: 597-602.

Cacan, R., and Verbert, A. (1995) Glycosyltransferases of the phosphodolichol pathways, *In* : *Methods on glycoconjugates, a laboratory manual*. Verbert, A. (Eds.) Harwood Academy Publishers, Switzerland, 191-199.

Cacan, R., Hoflack, B., and Verbert, A. (1980) Fate of oligosaccharide-lipid intermediates synthetized by resting rat-spleen lymphocytes, *Eur. J. Biochem*. 106: 473-479.

Calfon**,** M., Zheng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., and Ron, D. (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP1 mRNA, *Nature* 415: 452-466.

Callewaert, N., Laroy, W., Cadirgi, H., Geysens, S., Saelens, X., Jou, W.M., and Contreras, R. (2001) Use of HDEL-tagged *Trichoderma reesi* mannosyl oligosaccharide 1,2-α-D-mannosidase for N-glycan engineering in *Pichia pastoris*, *FEBS Letters* 503: 174-178.

Carson, D.D., Earles, B.J., and Lennarz, W.J. (1981) Enhancement of protein glycosylation in tissues slices by dolichylphosphate, *J. Biol. Chem.* 22: 11552-11557.

Castro, P.M.L., Ison, A.P., Hayter, P.M., and Bull, A.T. (1996) Cell growth and recombinant interferon-γ production: Effects of BSA, pluronic acid and lipids, *Cytotechnol.* 19: 27-36.

Castro, P.M.L., Ison, A.P., Hayter, P.M., and Bull, A.T. (1995) The macroheterogeneity of recombinant human interferon-gamma produced by Chinese-hamster ovary cells is affected by the protein and lipid content of the culture medium, *Biotechnol. Appl. Biochem*. 21: 87-100.

Castro, P.M.L., Hayter, P.M., Ison, A.P., and Bull, A.T. (1992) Application of a statiscal design to the optimization of culture for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells, *Appl. Microb. Biotechnol*. 38: 84-90.

Cayli, A., Hirschmann, F., Wirth, M., and Hauser, H. (1999) Cell lines with reduced UDP-N-acetylhexosamine pool in the presence of ammonium, *Biotechnol. Bioeng*. 65: 192-200.

Cereghino, G.P.L., Cereghino, J.L, Ilgen, C., and Cregg, J.M. (2002) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *FEMS Microbiology Reviews* 24: 45-66.

Cereghino, G.P.L., and Cregg, J.M. (2000) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*, *Cur. Opin. Biotechnol.* 123: 329-332.

Cha, H.J., Dalal, N.G., Pham, M.-Q., Vakharia, V.N., Rao, G., and Bentley, W.E. (1999) Insect larval expression process is optimized by generating fusions with green fluorescent protein, *Biotechnol. Bioeng*. 65: 316-324.

Chadd, H.E., and Chamow, S.M. (2002) Therapeutic antibody expression technology, *Cur. Opin. Biotechnol.* 12: 188-194.

Chapman, A.E., and Calhoun, J.C. (1988) Effect of glucose starvation and puromycin treatment on lipid-linked oligosaccharide precursors and biosynthetic enzymes in Chinese hamster ovary cells *in vivo* and *in vitro*, *Arch. Biochem. Biophys*. 260: 320-333.

Charley, B., and La Bonnardière, C. (1993) Interféron-gamma, *In* : *Les cytokines*, Cavaillon, J.M. (Eds) Masson, Paris, 131-143.

Chen, P., and Harcum, S.W. (2005) Effects of amino acid addition on ammonium stressed CHO cells, *J. Biotechnol*. 117: 277-286.

Chenu, S., Gregoire, A., Malikh, Y., Visvikis, A., Moncio, L., Shaw, L., Schauer, R., Marc, A., and Goergen, J.L. (2003) Reduction of CMP-N-Acetylneuraminic acid hydroxylase activity in engineered CHO cells using an antisense-RNA strategy, *Biochem. Biophys. Acta* 1622 : 133-144.

Cherlet, M. (1995) De l'intérêt de la cytométrie en flux pour l'étude de cultures d'hybridomes en bioréacteurs : cinétiques de croissance et de décès cellulaires, de production d'anticorps et d'évolution du pH intracellulaire, Thèse de Doctorat INPL, Nancy.

Chevet, E., Cameron, P.H., Pelletier, M.F., Thomas, D.Y., and Bergeron, J.M. (2001) The endoplasmic reticulum : integration of protein folding, quality control, signaling and degradation, *Curr. Opin. Struct. Biol*. 11: 120-124.

Choi, S.K., Chang, H.N., Lee, G.M., Kim, L.H., and Oh, D.J. (1995) High cell density cultures of anchorage-dependant Vero cells in a depth filter perfusion system, *Cytotechnol*. 17: 173-183.

Chotigeat, W., Watanapokasin, Y., Mahler, S., and Gray, P.P. (1994) Role of environmental conditions on the expression levels, glycoform pattern and levels of sialyltransferases for hFSH produced by recombinant CHO cells, *Cytotechnol*. 15: 217-221.

Chou, C.F., Smith, A.J., and Omary, M.B. (1992) Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18, *J. Biol. Chem*. 267: 3901-3906.

Chowdhury, P.S., and Wu, H. (2005) Tailor-made antibody therapeutics, *Methods* 36:11-24.

Chung, B.S., Jeong, Y.T., Chang, K.H., Kim, J.S., and Kim, J.H. (2001) Effect of sodium butyrate on glycosylation of recombinant erythropoietin, *J. Microbiol. Biotechnol*. 11: 1087-1092.

Clark, K. J.-R., Griffiths, J., Bailey, K.M., and Harcum, S.W. (2005) Gene-expression profiles for five key glycosylation genes for galactose-fed CHO cells expressing recombinant IL-4/13 cytokine trap, *Biotechnol. Bioeng*. 90: 568-577.

Clemens, M.J. (2001) Initiation factor eIF2α phosphorylation in stress responses and apoptosis, *Prog. Mol. Subcell. Biol*. 27: 57-89.

Coates, S.W., Gurney, T., Sommers, L.W., Yeh, M., and Hirschberg, C.B. (1980) Subcellular localization of sugar nucleotide synthetases, *J. Biol. Chem*. 255: 9225-9229.

Cole, E.S., Higgins, E., Bernasconi, R., Garone, L., and Edmunds, T. (1994) Glycosylation patterns of human proteins expressed in transgenic goat milk, *J. Cell. Biochem*. 265: S18D.

Colley, K.J., and Baezinger, J.U. (1987) Identification of the post-translational modifications of the core specific lectin, *J. Biol. Chem*. 262: 10290-10295.

Crick, D.C., Scocca, J.R., Rush, J.S., Krag, S.S., and Waechter, C.J. (1994) Induction of dolichyl-saccharide intermediate biosynthesis corresponds to increased long chain cis-isoprenyltransferase activity during the mitogenic response in mouse B cells, *J. Biol. Chem*. 269: 10559-10565.

Cumming, D.A. (1991) Glycosylation of recombinant protein therapeutics : control and functional implications, *Glycobiology* 1:115-130.

Curling, E.M.A., Hayter, P.M., Baines, A.J., Bull, A.T., Gull, K., Strange, P.G., and Jenkins, N. (1990) Recombinant human interferon-γ. Differences in glycosylation and proteolytic processing lead to heterogeneity in batch culture, *Biochem. J*. 272: 333-337.

Daniel, P.F., Winchester, B., and Warren, C.D. (1994) Mammalian alpha-mannosidases: multiple forms but a common purpose? *Glycobiology* 4: 551-566.

Decosterd, L.A., Cottin, E., Chen, X., Lejeune, F., Mirimanoff, R.O., Biollaz, J., and Coucke, P.A. (1999) Simultaneous determination of deoxyribonucleoside in the presence of ribonucleoside triphosphates in human carcinoma cells by high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem*. 270: 59-68.

Deo, Y.M., Mahadevan, M.D., and Fuchs, R. (1996) Practical considerations in operation and scale-up of spin-filter based bioreactors for monoclonal antibody production, *Biotechnol. Prog*. 12:57-64.

Devinoy, E., Thépot, D., Pavirani, A., Stinnakre, M.G., Fontaine, M.L., Grabowski, H., and Houdebine, L.M. (1994) High level production of human growth hormone in the milk of transgenic milk : the upstreamregion of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression of the mammary gland, *Trans. Res*. 3: 79-89.

Devos, R., Cheroutre, H., Taya, Y., Degrave, W., Van Heuverswyn, H., and Fiers, W. (1982) Molecular cloning of human immune interferon cDNA and its expression in eukaryotic cells, *Nucleic Acids Res*. 10: 2487-2501.

Dodet, B. (1990) Production de protéines recombinantes : quel système choisir? *Biofutur* 90: 20-29.

Doerrler, W., and Lerman, M.A. (1999) Regulation of the dolichol pathway in human fibroblasts by the endoplasmic reticulum unfolded protein response, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13050-13055.

Ducommun, P., Ruffieux, P.A., Kadouri, A., Von Stockar, U., and Marison, I.W. (2002) Monitoring of temperature effects on animal cell metabolism in a packed bed process, *Biotechnol. Bioeng*. 77: 838-842.

Duval, D., Demangel, C., Miossec, S., and Geahel, I. (1992) Role of metabolic waste products in the control of cell proliferation and antibody production by mouse hybridoma cells, *Hybridoma* 11: 311-322.

Duvet, S., Chirat, F., Mir, A.M., Verbert, A., Dubuisson, J., and Cacan, R. (2000) Reciprocal relationship between α1,2 mannosidase processing and reglucosylation in the rough endoplasmic reticulum of Man-P-Dol deficient cells, *Eur. J. Biochem*. 267: 1146-1152.

Duvet, S., Labiau, O., Mir, A.M., Kmiecik, D., Krag, S.S., Verbert, A., and Cacan, R. (1998) Cytosolic deglycosylation process of newly synthetized glycoproteins generates oligomannosides possessing one GlcNAc residue at the reducing end, *Biochem. J*. 335: 389-386.

Eagle, H. (1959) Amino acid metabolism in mammalian cell cultures, *Science* 130: 432-437.

Ealick, S.E., Cook, W.J., Vijay-Kumar, S., Carson, M., Nagabhushan, T.L., Trotta, P.P., and Bugg, C.E. (1991) Three-dimensional structure of recombinant human interferon-γ, *Science* 252: 698-702.

Eckart, M.R., and Bussineau, C.M. (1996) Quality and authenticity of heterologous proteins synthetized in yeast, *Cur. Opin. Biotechnol*. 7: 525-530.

Elbein, A.D. (1990) Kifunensine, a potent inhibitor of the glycoprotein processing mannosidase I, *J. Biol. Chem.* 265: 15599-15605.

Ellgaard, L., and Helenius, A. (2001) ER quality control: towards an understanding at the molecular level, *Cur. Opin. Cell Biol*. 13: 431-437.

Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 4:181-194.

Engström, W., and Zetterberg, A. (1984) The relationship between purines, pyrimidines, nucleosides, and glutamine for fibroblast cell proliferation, *J. Cell. Phys*. 120: 233-241.

Fagnani, R. (1994) The immunogenicity of foreign monoclonal antibodies in human disease applications : problems and current approaches, *Immunol.Ser*. 61: 3-22.

Farges-Haddani, B. (2005) Les peptides de colza : une alternative aux protéines animales dans les procédés de cultures de cellules de mammifères ? Thèse de Doctorat INPL, Nancy.

Farrar, M.A., and Schreiber, R.D. (1993) The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor, *Ann. Rev. Immunol*. 11: 571-611.

Faye, L., Boulaflous, A., Benchabane, M., Gomord, V., and Michaud, D. (2005) Protein modification in the plant secretory pathway : current status and practical implications in molecular pharming, *Vaccine* 23: 1770-1778.

Faye, L., Landry, N., Lerouge, P., Gomord, V., and Vézina, L.-P. (2001) La production de protéines à usage biopharmaceutique dans les plantes, *Med./Sci*. 17 :867-877.

Ferrari, J., Gunson, J., Lofgren, J., Krummen, L., and Warner, T.G. (1998) Chinese hamster ovary cells with constitutively expressed sialidase antisense RNA produce recombinant DNase in batch culture with increased sialic acid, *Biotechnol. Bioeng*. 60: 589-595.

Fidler, I.J., Fogler, W.E., Kleinerman, E.S., and Saiki, I. (1985) Abrogation of species specificity for activation of tumoricidal properties in macrophages by recombinant mouse or human interferon-γ encapsulated in liposomes, *J. Immunol*. 135: 4289-4296.

Fischer, R., Twyman, R.M., and Schillberg, S. (2003) Production of antibodies in plants and their use for global health, *Vaccine* 21: 820-825.

Fischer, R., and Emans, N. (2000) Moleculer farming of pharmaceutical proteins, *Transgenic Res*. 9: 279-299.

Fitzpatrick, L., Jenkins, H.A., and Butler, M. (1993) Glucose and metabolism of a murine B-lymphocyte hybridoma grown in batch culture, *Appl. Biochem. Biotech*. 43: 93-116.

Foulquier, F. (2003) Influence des glycannes sur la destinée des N-glycosylprotéines, Thèse de Doctorat USTL, Lille.

Foulquier, F., Harduin-Lepers, A., Duvet, S., Marchal, I., Mir, A.M., and Delannoy, P. (2002) The unfolded protein response in a dolichyl phosphate mannose-deficient Chinese hamster ovary cell line points out the key role of a demmanosylation step in the quality-contol mechanism of N-glycoproteins, *Biochem. J*. 362: 1-8.

Fox, R.S., Patel, U.A., Yap, M.G.S., and Wang, D.I.C. (2004) Maximizing IFN-γ production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling, *Biotechnol. Bioeng*. 85: 177-184.

Fraser, M.J. (1992) The baculovirus-infected insect cell as a eukaryotic gene expression system, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158: 131-72.

Frickel, E.M., Riek, R., Jelesarov, I., Helenius, A., Wuthrich, K., and Ellgaard, L. (2002) TROSY-NMR reveals interaction between Erp57 and the tip of the calreticulin P-domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1954-1959.

Fussenegger, M., and Betenbaugh, M.J. (2002) Metabolic Engineering II. Eukaryotic systems, *Biotechnol. Bioeng*. 79: 509-531.

Fussenegger, M., Bailey, J.E., Hauser, H., and Mueller, P.P. (1999) Genetic optimization of recombinant glycoprotein production by mammalian cells, *Trends Biotechnol*. 17: 35- 42.

Gao, N. (2005) Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis : a sensitive and accurate method for the direct analysis of dolichol pyrophosphate-linked oligosaccharides in cell cultures and tissues, *Methods* 35: 323-327.

Gao, N., Shang, J., and Lehrman, M.A. (2005) Analysis of glycosylation in CDG-IA fibroblasts by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis : implications for extracellular glucose and intracellular mannose-6-phosphate, *J. Biol. Chem*. .280: 17901-17909.

Gao, N., and Lehrman, M.A. (2002) Coupling of the dolichol-P-P-oligosaccharide pathway to translation by perturbation-sensitive regulation of the initiating enzyme, GlcNAc-1-P transferase, *J. Biol. Chem*. 277: 39425-39435.

Gavel, Y., and von Heijne, G. (1990) Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Ser/Thr acceptor sites : implication for protein engineering, *Protein Eng*. 3: 433-442.

Gawlitzek, M., Valley, U., and Wagner, R. (1998) Ammonium ion and glucosamine dependent increases of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells, *Biotechnol. Bioeng*. 57: 518-528.

Gawlitzek, M., Valley, U., Nimtz, M., Wagner, R., and Conradt, H.S. (1995a) Characterization of changes in the glycosylation pattern of recombinant proteins from BHK-21 cells due to different culture conditions, *J. Biotechnol*. 42: 117-131.

Gawlitzek, M., Conradt, H.S., and Wagner, R. (1995b) Effect of different cell culture conditions on the polypeptide integrity and N-glycosylation of recombinant model glycoprotein, *Biotechnol. Bioeng*. 46: 536-544.

Gelvin, S.B. (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool, *Microb. Mol. Biol. Rev*. 67: 16-37.

Gemmill, T.R., and Trimble, R.B. (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species, *Biochem. Biophys. Acta* 1426: 227-237.

Gerngross, T.U. (2004) Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi, *Nat. Biotechnol*. 22: 1409-1414.

Gersham, H., and Robbins, P.W. (1981) Transitory effects of glucose starvation on the synthesis of dolichol-linked oligosaccharides in mammalian cells, *J. Biol. Chem*. 256: 7774-7780.

Giddings, G., Allison, G., Brooks, D., and Carter, A. (2000) Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals, *Nat. Biotechnol*. 18: 1151-1155.

Glacken, M.W. (1988) Catabolic control of mammalian cell culture, *Bio/Technology* 6: 1041-1050.

Goergen, J.L., and Monaco, L. (2004) Generation of high-recombinant-protein-producing Chinese hamster ovary (CHO) cells, *Methods Mol. Biol*. 267: 477-483.

Goergen, J.L., Marc, A., Engasser, J.M., Rabaud, J.N., Pierry, G., Geaugey, V., Geahel, I., and Hache, J. (1994) Development of a new membrane reactor for large scale mammalian cell culture, *In* : *Animal cell Technology: products of today, prospects for tomorrow*, Spier R.E., Griffiths, J.B., et Berthold, W. (Eds.) Butterwort - Heinemann, 287-290.

Goergen, J.-L., Marc, A., and Engasser, J.-M. (1993) Determination of cell lysis and death kinetics in continuous hybridoma cultures from the measurement of lactate dehydrogenase release, *Cytotechnol.* 11: 189-195.

Goergen, J.-L. (1992) Cultures continues d'hybridomes : études cinétiques et modélisation de l'influence de paramètres physico-chimiques sur la croissance, le décès et le métabolisme des cellules, Thèse de doctorat INPL, Nancy.

Goldman, M. (2003) Processing challenges for transgenic milk products, *BioPross Int*. October, 60-63.

Goldman, M.H., James, D.C., Rendall, M., Ison, A.P., Hoare, M. and Bull, A.T. (1998) Monitoring recombinant human interferon-gamma N-glycosylation during perfused fluidized-bed and stirred-tank batch culture of CHO cells, *Biotechnol. Bioeng.* 60: 596-607.

Goldman, M.H., James, D.C., Ison, A.P., and Bull, A.T. (1997) Monitoring proteolysis of recombinant human interferon-γ during batch culture of Chinese hamster ovary cells, *Cytotechnol.* 23: 103-111.

Goochee, C.F., Grammer, M.J., Andersen, Bahr, J.B., and Rasmussen, J.R. (1991) The oligosaccharides of glycoproteins : bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoproteins properties, *Bio/Technology* 9: 1347-1355.

Goochee, C.F., and Monica, T. (1990) Environmental effects on protein glycosylation, *Bio/Technology* 8: 421-426.

Gorenflo, V.M., Angepat, S., Bowen, B.D., and Piret, J.M. (2003) Optimization of an acoustic cell filter with a novel air-backflush system, *Biotechnol. Prog*. 19: 30-36.

Gould, G.W, and Holman, G.D. (1993) The glucose transporter family : structure, function and tissue-specific expression, *Biochem. J*. 295: 329-341.

Gramer, M.J., and Goochee, C.F. (1993) Glycosidase activities in Chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant, *Biotechnol. Prog*. 9: 366-373.

Grammatikos, S.I., Valley, U., Nimtz, M., Conradt, H.S., and Wagner, R. (1998) Intracellular UDP-*N*-Acetylhexosamine pool affects N-glycan complexity : a mechanism of ammonium action on protein glycosylation, *Biotechnol. Prog*. 14: 410-419.

Gray, P.W., Leung, D.W., Pennica, D., Yelverton, E., Najarian, R., Simonsen, C.C., Derynck, R., Sherwood, P.J., Wallace, D.M., Berger, S.L., Levinson, A.D., and Goeddel, D.V (1982) Expression of human immune interferon cDNA in *E.coli* and monkey cells, *Nature* 295: 503-508.

Grünewald, S., Matthijs, G., and Jaeken, J. (2002) Congenital disorders of glycosylation : a review, *Pediatr. Res*. 52: 618-624.

Grzesiek, S., Dobeli, H., Gentz, R., Garotta, G., Labhardt, A.M., and Bax, A. (1992) ^{1}H, ^{13}C, and ^{15}N NMR backbone assignments and secondary structure of human interferon-gamma, *Biochemistry*, 31: 8180-8190.

Hamilton, W.G., and Ham, R.G. (1977) Clonal growth of Chinese hamster ovary cell lines in protein-free media, *In vitro* 272: 333-337.

Hammond, C., and Helenius, A. (1995) Quality control in the secetory pathway, *Curr. Opin. Cell Biol*. 7:523-529.

Hampton, R.Y. (2002) ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation, *Curr. Opin. Cell Biol*. 14: 476-482.

Handcock, R.D., and Viola, R. (2002) Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production, *Trends Biotechnol*. 20: 299- 305.

Hanish, F.G. (2001) O-glycosylation of the mucin type, *Biol. Chem*. 382: 143-149.

Harding, H.P., Calfon, M., Urano, T., Novoa, I., and Ron, D. (2002) Transcriptional and translational control in the mammalian unfolded protein response, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 18:575-599.

Hauri, H.-P., Kappeler, F., Andersson, H., and Appenzeller, C. (2000) ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway, *J. Cell Sci*. 113: 587-596.

Hayter, P.M., Curling, E.M.A., Gould, M.L., Baines, A.J., Jenkins, N., Salmon, I.P.G., and Bull, A.T. (1993) The effect of the dilution rate on CHO cell physiology and recombinant interferon-γ production in glucose-limited chemostat culture, *Biotechnol. Bioeng*. 42 : 1077-1085.

Hayter, P.M., Curling, E.M.A., Baines, A.J., Jenkins, N., Salmon, I., Strange, P.G., and Bull, A.T. (1992) Glucose-limited chemostat culture of Chinese hamster ovary cells producing recombinant human interferon-γ, *Biotechnol. Bioeng*. 7 : 327-335.

Hayter, P.M., Curling, E.M.A., Gould, M.L., Baines, A.J., Jenkins, N., Salmon, I., Strange, P.G., and Bull, A.T. (1991) Chinese hamster ovary cell growth and interferon production kinetics in stirred batch culture, *Appl. Microb. Biotechnol*. 34 : 559-564.

Helenius, J., Ng, D.T.W., Marolda, C.L., Walter, P., Valvano, M.A., and Aebi, M. (2002) Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rtf1 protein, *Nature* 415: 447-450.

Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R.M., and Fischer, R. (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins, *Nat. Biotechnol*. 22: 1415-1422.

Herscovics, A., and Orlean, P. (1993) Glycoprotein biosynthesis in yeast, *FASEB* 7: 540-550.

Hesse, F., and Wagner, R. (2000) Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures, *Tibtech* 18: 173-180.

Hiller, G.W., Clark, D.S., and Blanch, H.W. (1994) Transient responses of hybridoma cells in continuous culture to step changes in amino acid and vitamin concentrations, *Biotechnol. Bioeng*. 44: 303-321.

Hiller, M.M., Finger, A., Schweiger M., and Wolf, D.H. (1996) ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway, *Science* 273:1725-1728.

Hills, A.E., Patel, A., Boyd, P., and James, D.C. (2001) Metabolic control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation in GS-NSO cells, *Biotechnol. Bioeng*. 75: 239-251.

Hirsch, C., Blom, D., and Ploegh, H.L. (2003) A role for *N*-glycanase in the cytosolic turnover of glycoproteins, *EMBO J*. 22: 1036-1048.

Hirschberg, C.B., and Snider, M.D. (1988) Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, *Annu. Rev. Biochem*. 56: 63-87.

Hollister, J.R., and Jarvis, D.L. (2001) Engineering lepidopteran insect cells for sialoglycoprotein production by genetic transformation with mammalian beta 1,4-galactosyltransferase and alpha 2,6-sialyltransferase genes, *Glycobiology*, 11: 1-9.

Hollister, J.R., Conradt, H., and Jarvis, D.L. (2003) Evidence for a sialic acid salvaging pathway in lepidopteran insect cells, *Glycobiology* 13: 487-495.

Holst, B., Bruun, A.W., Kielland-Brandt, M.C., and Winther J.R. (1996) Competition between folding and glycosylation in the endoplasmic reticulum, *EMBO J*. 15: 3538-3546.

Hood, E.E., Witcher, D.R., Maddock, S., Meyer, T., Baszezynski, M., Bailey, M., and Flynn, P. (1997) Commercial production of avidin from transgenic maize : characterization of transformant, production, processing, extraction, and purification, *Mol. Breed.* 3: 291-306.

Hooker, A.D., Green, N.H., Baines, A.J., Bull, A.T., Jenkins, N., Strange, P.G., and James, D.C. (1999) Constraints on the transport and glycosylation of recombinant IFN-gamma in Chinese hamster ovary and insect cells, *Biotechnol. Bioeng*. 63: 559-572.

Houdebine, L.-M. (2002) Antiboby manufacture in transgenic animals and comparisons with other systems, *Cur.Opin. Biotechnol*. 13: 625-629.

Houdebine, L.-M. (1998) La transgénèse animale et ses applications, *Prod. Anim*. 11: 81-94.

Houdebine, L.M. (1996) The deleterious effect of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein genen promoter in transgenic rabbits, *Repr. Nutr. Dev*., 36: 555-563.

Hubbard, S.C., and Robbins, P.W. (1980) Synthesis of the N-linked oligosaccharides of glycoproteins. Assembly of the lipid-linked precursor oligosaccharide and its relation to protein synthesis *in vivo*, *J. Biol. Chem*. 255: 11782-11793.

Hubbard, S.C., and Robbins, P.W. (1979) Synthesis and processing of protein-linked oligosaccharides *in vitro*, *J. Biol. Chem*. 254: 4568-4576.

Hughes, E.A., Hammond, C., and Cresswell, P. (1997) Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded into the proteasome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1896-1901.

Imamura, T., Crespi, C.L., Thily, W.G., and Brunengraber, H. (1982) Fructose as a carbohydrate source yields stable pH and redox parameters in microcarrier cell culture, *Anal. Biochem*. 124: 353-358.

Jackson, P. (1996) The analysis of fluorophore-labeled carbohydrates by polyacrylamide gel electrophoresis, *Mol. Biotechnol*. 5: 101-123.

James, D.C., Freedman, R.B., Hoare, M., Ogonah, O.W., Rooney, B.C., Larionov, O.A., Dobrovolsky, V.N., Lagutin, O.V., and Jenkins, N. (1995) N-glycosylation of recombinant human interferon-γ produced in different animal expression systems, *Bio/Technology* 13: 592-596.

James, D.C., Freedman, R.B., Hoare, M., and Jenkins, N. (1994) High-resolution separation of recombinant human interferon-gamma glycoforms by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Anal. Biochem*. 222: 315-322.

Jarvis, D.L. (2003) Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production, *Virology* 310: 1-7.

Jenkins, N., and Curling, E.M.A. (1994) Glycosylation of recombinant proteins : problems and prospects, *Enzyme Microb. Technol*. 16: 354-364.

Jenkins, N., Castro, P.M.I., Menon, S., Ison, A.P., and Bull, A.T. (1994) Effect of lipid supplements on the production and glycosylation of recombinant interferon-γ expressed in CHO cells, *Cytotechnol*. 15: 209-215.

Jenkins, N., and Hovey, A. (1993) Temperature control of growth and productivity in mutant Chinese hamster ovay cells synthetizing a recombinant protein, *Biotechnol. Bioeng.* 42: 1029-1031.

Johnson, M., Lanthier, S., Massie, B., Lefebvre, G., and Kamen, A.A. (1996) Use of the centritech Lab centrifuge for perfusion culture of hybridoma cells in protein-free medium, *Biotechnol. Prog*.12: 855-864.

Joosten, C.E., and Schuler, M.L. (2003) Effect of culture conditions on the degree of sialylation of a recombinant glycoprotein expressed in insect cells, *Biotechnol. Prog*. 19: 739-749.

Joshi, L., Schuler, M.L., and Wood, H.A. (2001) Production of a sialylated N-linked glycoprotein in insect cells, *Biotechnol. Prog*. 17: 822-827.

Jung, V., Jones, C., Kumar, C.S., Stefanos, S., O'Connell, S., and Pestka, S. (1990) Expression and reconstitution of a biologically active human interferon-γ receptor in hamster cells, *J. Biol. Chem*. 265: 1827-1830.

Jung, V., Rashidbaigi, A., Jones, C., Tischfield, A., Shows, T.B., and Pestka, S. (1987) Human chromosomes 6 and 21 are required for sensitivity to human interferon-γ, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4151-4155.

Kane, J.F., and Hartley, D.L. (1988) Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*, *Trends Biotechnol*. 6: 95-101.

Kang, S.H., Oh, T.J., Kim, R.G., Kang, T.J., Hwang, S.H., Lee, E.Y., and Choi, C.Y. (2000) An efficient cell-free protein synthesis system using periplasmic phosphatase-removed S30 extract, *J. Microbiol. Methods* 43: 91-96.

Karaoglu, D., Kelleher, D.J., and Gilmore, R. (2001) Allosteric regulation provides a molecular mechanism for preferential utilization of the fully assembled dolichol-linked oligosaccharide by the yeast oligosaccharyltransferase, *Biochemistry* 40: 12193-12206.

Kaufmann, H., Mazur, X., Fussenegger, M., and Bailey, J.E. (1999) Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells, *Biotechnol. Bioeng*. 63: 573-582.

Kean, E.L., Wei, Z., Anderson, V.E., Zhang, N., and Sayre, L.M. (1999) Regulation of the biosynthesis of N-acetylglucosaminylpyrophosphoryldolichol, feedback and product inhibition, *J. Biol. Chem*. 34072-34082.

Kean, E.L. (1991) Sialic acid activation, *Glycobiology* 1: 441-447.

Keefer, C.L. (2004) Production of bioproducts through the use of transgenic animal models, *Anim. Reprod. Sci*. 82-83: 5-12.

Keefer, M.C., Graham, B.S., Belshe, R.B., Schwartz, D., Corey, L., Bolognesi, D.P., Stablein, D.M., Montefiori, D.C., McElrath, M.J., and Clements, M.L. (1994) Studies of high doses of a human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 160 candidate vaccine in HIV type 1-seronegative humans, The AIDS Vaccine Clinical Trials Network, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10: 1713-1723.

Kelker, C.H., Yip, Y.K., Anderson, P., and Vilcek, J. (1983) Effects of glycosidase treatment on the physicochemical properties and biological activity of human interferon-gamma, *J. Biol. Chem*. 258: 8010-8013.

Kelleher, D.J., Karaoglu, D., Mandon, E.C., and Gilmore, R. (2003) Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties, *Mol. Cell*. 12:101-111.

Kelleher, D.J, and Gilmore, R. (1997) DAD1, the defender against apoptotic cell death, is a subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4994-4999.

Kelleher, D.J, Kreibich, G., and Gilmore, R. (1992) Oligosaccharyltransferase activity is associated with a protein complex composed of ribophorins I and II and a 48 kd protein, *Cell*. 69: 55-65.

Khatami, M., Suldan, Z., David, I., Weiye, L., and Rockey, J. (1988) Inhibitory effects of pyridoxal phosphate, ascorbate and amino-guanidine on nonenzymatic glycation of serum proteins in vitro and in vivo, *Life Sci*. 43: 1725-1731.

Kimura, R., and Miller, W.M. (1997) Glycosylation of CHO-derived recombinant t-PA produced under elevated pCO_2, *Biotechnol. Prog*. 13: 311-317.

Kmiecik, D., Herman, V., Stroop, C.J., Michalski, J.C., Mir, A.M., Labiau, O., Verbert, A., and Cacan, R. (1995) Catabolism of glycan moieties of lipid intermediates leads to a single $Man_5GlcNAc$ oligosaccharide isomer : a study with permeabilized CHO cells, *Glycobiology* 5: 483-494.

Ko, K., and Koprowski, H. (2005) Plant biopharming of monoclonal antibodies, *Vir. Res*. 111: 93-100.

Kömer, C., Lehle, L., and von Figura, K. (1998) Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1: correction of the glycosylation defect by deprivation of glucose or supplementation of mannose, *Glycoconjugate J*. 15: 499-505.

Kopp, K., Noe, W., Schluter, M., and Werner, R. (1996) Monitoring the glycosylation pattern of recombinant interferon-omega with high-pH anion-exchange chromatography and capillary electrophoresis, *Arzneim.-Forsch./Drug Res*., 46: 1191-1196.

Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides, *Annu. Rev. Biochem*. 54: 631-634.

Kousvelari E.E., Grant, S.R., and Baum, B.J. (1983) β-adrenergic receptor regulation of N-linked protein glycosylation in rat parotid acinar cells, *Proc. Natl. Acad. USA* 80: 7146-7150.

Kratje, R.B., Lind, W., and Wagner, R. (1994) Evaluation of the proteolytic potential of in vitro-cultivated hybridoma and recombinant mammalian cells, *J. Biotechnol*. 32: 107-125.

Kretzmer, G. (2002) Industrial processes with animal cells, *Appl. Microb. Biotechnol*. 59: 135-142.

Kunkel, J.P., Jan, D.C., Jmieson, J.C., and Butler, M. (1998) Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody, *J. Biotechnol*. 62: 55-71.

Kurano, S., Leist, C., Mesi, F., Kasuya, S., and Fiechter, A. (1990a) Growth behaviour of CHO in a compact loop bioreactor : 1-effects of physical and chemical environment, *J. Biotechnol*. 15: 102-112.

Kurano, S., Kurano, N., Leist, C., and Fiechter, A. (1990b) Utilization and stability of vitamins in serum-containing and serum-free media in CHO cell culture, *Cytotechnol*. 15: 102-112.

Lai, L. and Prather, R.S. (2002) Creating genitically modified pigs by using nuclear transfer, *Reprod. Biol. Endocrinol*. 1 : 1-6.

Lamotte, D., Buckberry, L., Monaco, L., Soria, M., Jenkins, N., Engasser, J.M., and Marc, A. (1999) Na-butyrate increases the production and α2,6-sialylation of recombinant IFN-γ expressed by α2,6-sialyltransferase engineered CHO cells, *Cytotechnol*. 29: 55-64.

Lamotte, D. (1997) Production et glycosylation de l'interféron-γ humain par des cellules CHO cultivées en bioréacteurs discontinus et perfusés. Influence des conditions opératoires et du potentiel de glycosylation des cellules, Thèse de Doctorat INPL, Nancy.

Lao, M.S., and 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.

Larrick, J.W., Yu, L., Naftzger, C., Jaiswal, S., and Wycoff, K. (2001) Production of secretory IgA antibodies in plants, *Biomol. Eng*.18: 87-94.

Lawrence, S.M., Huddleston, K.A., Pitts, L.R., Nguyen, N., Lee, Y.C., Vann, W.F., Coleman, T.A., and Betenbaugh, M.J. (2000) Cloning and expression of the human N-Acetylneuraminic acid phosphate synthase gene with 2-keto-3-deoxy-D-glycero-6-D-galacto-nononic acid biosynthesis ability, *J. Biol. Chem*. 275: 17869-17877.

Leelavatcharamas, V., Emery, A.N., and Al-Rubeai, M. (1994) Growth and interferon-gamma production in batch culture of CHO cells, *Cytotechnol*. 15: 65-71.

Le Floch, F. (2003) Production et glycosylation d'EPO par cellules CHO : caractérisation par électrophorèse capillaire au cours de procédés discontinus, Thèse de Doctorat INPL.

Lehrman, M.A. (2001) Oligosaccharide-based information in endoplasmic reticulum quality control and other biological systems, *Glycobiology* 276: 8623-8626.

Lerouge, P. Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Lainé, A.-C., Gomord, V., and Faye, L. (1998) N-glycoprotein biosynthesis in plants : recent developments and future trends, *Plant. Mol. Biol*. 38: 31-48.

Levy, R., Weiss, R., Chen, G., Iverson, B.L., and Georgiou, G. (2001) Production of correctly Fab antibody fragment in the cytoplasm of *Escherichia coli* trxB gor mutants *via* the coexpression of molecular chaperones, *Protein Express. Purif*. 23: 338 -347.

Lin, A.A., Kimura, R., and Miller, W.M. (1993) Production of t-PA in recombinant CHO cells under oxygen-limited conditions, *Biotechnol. Bioeng*. 42: 339-350.

Lin, W.-J., Huang, S.-W., and Chou, C.P. (2001) DegP-coexpression minimizes inclusion-body formation upon overproduction of recombinant penicilin acylase in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Bioeng*. 73: 484-492.

Little, M., Kipriyanov, S.M., Le Gall, F., and Moldenhauer, G. (2000) Of mice and men : hybridoma and recombinant antibodies, *Immunol. Today* 21: 364-370.

Littman, S.J., Devos, R., and Baclioni, C. (1985) Binding of unglycosylated and glycosylated human recombinant interferon-gamma to cellular receptors, *J. Interferon Res*. 5: 471-476.

Liu, D.V., Zawada, J.F., and Swartz, J.R. (2005) Streamlining *Escherichia coli* S30 extract preparation for economical cell-free protein synthesis, *Biotechnol. Prog*. 21: 460-465.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., and Darnell, J. (2004) *In* : *Molecular cell biology*, W.H. Freeman and Compagny (Eds) New York, 973.

Ma, J.K.C., Drake, P.M.W., Chargelegue, D., Obregon, P., and Prada, A. (2005) Antibody and engineering in plants, and new strategies for vaccine production, *Vaccine* 23: 1814-1818.

Ma, Y., and Hendershot, L.M. (2004) ER chaperone functions during normal and stress conditions, *J. Chem. Neuroanat*. 28: 51-65.

Ma, J.K.C., Hikmat, B.Y., Wycoff, K., Vine, N.D., Chargelegue, D., Yu, L., Hein, M.B., and Lehner, T. (1998) Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans, *Nat. Med*. 4: 601-606.

Maiorella, B.L., Winkelhake, J., Young, J., Moyer, B., Hora, M., Andya, J., Thomson, J., Patel, T., and Parekh, R. (1993) Effect of culture conditions on IgM antibody structure, pharmacokinetics and activity, *Bio/technology* 11: 387-392.

Marchal, I., Jarvis, D.L., Cacan, R., and Verbert, A. (2001) Glycoproteins from insect cells : sialylated or not ? *Biol. Chem.* 382: 151-159.

Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., and Ron, D. (2004) CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum, *Genes. Dev.* 18: 3066-3077.

Marquardt, T., and Denecke, J. (2003) Congenital isorders of glycosylation : review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies, *Eur. J. Pediatr*. 162: 359-379.

Martinelle, K., and Häggström, L. (1993) Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells : transport across cell membranes, *J. Biotechnol*. 30: 339-350.

Marz, L., Altmann, F., Staudacher, E., and Kubelka, V. (1995) Protein glycosylation in insects. *In* : *Glycoproteins – New comprehensive biochemistry*, Montreuil, J., Vliegenthart, J.F.G. and Schachter, H. (Eds.) Elsevier Science, Amsterdam, Vol. 29a: 163-172.

Massoud, M., Attal, J., Thépot, D., Pointu, H., Stinnakre, M.G., Théron, M.C., Lopez, C., and Megaw, J.M., and Johnson, L.D. (1979) Glycoprotein synthetized by cultured cells : effects of serum concentrations and buffers on sugar content, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 69: 60-65.

Mc Keehan, W.L. (1986) Glutaminolysis in animal cells, *In* : *Carbohydrate metabolism in cultured cells*, Morgan, M.M. (Eds) Plenum Press, 111-150.

McQueen, A. and Bailey, J.E. (1990) Mathematical modeling of the effects of ammonium ions on the intracellular pH of hybridoma cells, *Biotechnol. Bioeng*. 35: 879-906.

Meager, A., and Leist, T. (1986) Antigenic characterictics of glycosylated natural and unglycosylated recombinant human gamma-interferon, *J. Interferon Res*. 6: 225-232.

Mercille, S., Johnson, M., Lanthier, S., Kamen, A.A., and Massie, B. (2000) Understanding factors that limit the productivity of suspension-based perfusion cultures operated at high medium renewal rates, *Biotechnol. Bioeng*. 20: 435-50.

Merten, O.-W. (2000) Constructive improvement of the ultrasonic separation device ADI 1015, *Cytotechnol.* 34: 175-179.

Meyer, S., Noisommit-Rizzi, N., Reuss, M., and Neubauer, P. (1999) Optimized analysis of intracellular adenosine and guanosine phosphates in *Escherichia coli*, *Anal. Biochem*. 271: 43-52.

Meynal-Salles, I., and Combes, D. (1996) In vitro glycosylation of proteins : an enzymatic approach, *J. Biotechnol.* 46: 1-14.

Miele, R.G., Castellino, F.J., and Bretthauer, R.K. (1997) Characterization of the acidic oligosaccharides assembled on the *Pichia pastoris*-expressed recombinant kringle 2 domain of human tissue-type plasminogen activator, *Biotechnol. Appl. Biochem*. 26: 79-83.

Mochizuki, S., Hamato, N., Hirose, M., Miyano, K., Ohtani, W., Kameyama, S., Kuwae, S., Tokuyama, T., and Ohi, H. (2001) Expression and characterization of recombinant human antithrombin III in *Pichia pastoris*, *Protein Express. Purif*. 23: 55 -65.

Moellering, B.J., Tedesco, J.L., Townsend, R., Hardy, M.R., Scott, R.S., and Prior, C.P. (1990) Electrophoretic differences in a MAb expressed in three media, *BioPharm*. 3:30-38.

Moens, S., and Vanderleyden, J. (1997) Glycoproteins in prokaryotes, *Arch. Microbiol*. 168: 169-175.

Mols, J., Peeters-Joris, C., Wattiez, R., S.N., and Schneider, Y.J. (2005) Recombinant interferon-gamma secreted by Chinese hamster ovary-320 cells cultivated in suspension in protein-free media is protected against extracellular proteolysis by the expression of natural protease inhibitors and by the addition of plant protein hydrolysates to the culture medium, *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim*. 41: 83-91.

Mols, J., Burteau, C.C., Verhoeye, F.R., Ballez, J.S., Agathos, S.N., and Schneider, Y.J. (2003) Fortification of a protein-free cell culture medium with plant peptones improves cultivation and productivity of an interferon-γ producing CHO cell line, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 39:291-296.

Monaco, L., Marc, A., Eon-Duval, A., Acerbis, G., Distefano, G., Lamotte, D., Engasser, J.M., Soria, M., and Jenkins, N. (1996) Genetic engineering of alpha2,6-sialyltransferase in recombinant CHO cells and its effect on the sialylation of recombinant interferon-γ, *Cytotechnol*. 22: 197-203.

Montesino, R., Garcia, R., Quintero, O., and Cremata, J.A. (1998) Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Protein Expres. Purif*. 14: 197-207.

Montesino, R., Cremata, J.A., Rodriguez, M., Besada, V., Falcon, V., and de la Fuente, J. (1996) Biochemical characterization of the recombinant Boophilus microplus Bm86 antigen expressed by transformed *Pichia pastoris* cells, *Biotechnol. Appl. Biochem*. 23: 23-28.

Montreuil, J. (1993) Naissance de la glycobiologie, *Biofutur* 125 : 8-11.

Moore, A., Mercer, J., Dutina, G., Donahue, C.J., Bauer, K.D., Mather, J.P., Etcheverry, T., and Ryll, T. (1997) Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures, *Cytotechnol*. 23: 47-54.

Moore, S.E.H., Bauvy, C., and Codogno, P. (1995) Endoplasmic reticulum-to-cytosol transport of free polymannose oligosaccharides in permeabilized HepG2 cells, *EMBO J*. 14: 6034-6042.

Moremen, K.W., Trimble, R.B., and Hersovics, A. (1994) Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway, *Glycobiology* 4: 113-126.

Munster, A.K., Eckhardt, M., Potvin, B., Muhlenhoff, M., Stanley, P., and Gerardy-Schahn, R. (1998) Mammalian cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase : a nuclear protein with evolutionarily conserved structural motifs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9140-9145.

Neermann, J., and Wagner, R. (1996) Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells, *J. Cell. Physiol*. 166: 152-159.

Nielsen, L.K., Niloperbowo, W., Reid, S., and Greenfield, P.F. (1992) Avoiding rapid growth at high cell densities : a potentially important optimisation criterion for hybridoma cultures, *Cytotechnol.* 9: 21-27.

Nita-Lazar, M., Wacker, M., Schegg, B., Amber, S., and Aebi, M. (2004) The N-X-S/T consensus sequence is required but not sufficient for bacterial N-linked protein glycosylation, *Glycobiology* 15: 361-367.

Nufer, O., Kappeler, F., Guldbrandsen, S., and Hauri, H.-P. (2003) ER export of ERGIC-53 is controlled by cooperation of targeting determinants in all three of its domains, *J. Cell Sci*. 116: 4429-4440.

Nyberg, G.B., Balcarcel, R.R., Follstad, B.D., Stephanopoulos, G., and Wang, D.I.C. (1999) Metabolic effects on recombinant interferon-γ glycosylation in continuous culture of Chinese hamster ovary cells, *Biotechnol. Bioeng*. 62 : 336-347.

O'Rear, J.L., Scocca, J.R., Walker, B.K., and Krag, S.S. (1999) Chinese hamster ovary cells with reduced hexokinase activity maintain normal GDP-Mannose levels, *J. Cell. Biochem*. 72: 56-66.

Ohkura, T., Fukushima, K., Kurisaki, A., Sagami, H., Ogura, K., Ohno, K., Hara-Kuge, S., and Yamashita, K. (1997) A partial deficiency of dehydrodolichol reduction is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type-I, *J. Biol. Chem*. 272: 6868-6875.

Osman, N., Mc Kenzie, I.F., Ostenried, K., Ioannou, Y.A., Desnick, R.J., ans Sandrin, M.S. (1997) Combined transgenic expression of alpha-galactosidase and alpha 1,2-fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Gal alpha (1,3) Gal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14677-14682.

Ozturk, S.S., and Palsson, B.O. (1990) Chemical decomposition of glutamine in cell culture media : effect of type, pH, and serum concentration, *Biotechnol. Prog*. 6: 121-128.

Ozturk, S.S., Riley, M.R., and Palsson, B.O. (1992) Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism and antibody production, *Biotechnol. Bioeng*. 39: 418-431.

Palomares, L.A., Joosten, C.E., Hughes, P.R., Granados, R.R., and Schuler, M.L. (2003) Novel insect cell line capable of complex N-glycosylation and sialylation of recombinant proteins, *Biotechnol. Prog*. 19: 185-192.

Panneerselvam, K., Etchison, J.R., and Freeze, H.H. (1997) Human fibroblasts prefer mannose over glucose as a source of mannose for N-glycosylation, *J. Biol. Chem*. 272: 23123-23129.

Pannerselvam, K., and Freeze, H.H. (1996) Mannose enters mammalian cells using a specific transporter that is insensitive to glucose, *J. Biol. Chem*. 271: 9417-9421.

Parker, M.H., Birck-Wilson, E., Allard, G., Masiello, N., Day, M., Murphy, K.P., Paragas, V., Silver, S., and Moody, M.D. (2004) Purification and characterization of a recombinant version of human α-fetoprotein expressed in the milk of transgenic goats, *Prot. Exp. Purif*. 38: 177-183.

Parodi, A.J. (2000) Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing in glycoprotein folding and degradation, *Biochem. J*. 348: 1-13.

Patel, T.P., Parekh, R.B., Moellering, B.J., and Prior, C.P. (1992) Different culture methods lead to differences in glycosylation of a murine IgG monoclonal antibody, *Biochem. J*. 285: 839-845.

Pavlou, A.K., and Belsey, M.J. (2005) The therapeutic antibodies market to 2008, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59: 389-396.

Pavlou, A.K., and Reichert, J.M. (2004) Recombinant protein therapeutics - Success rates, market trends and values to 2010, *Nat. Biotechnol*. 22: 1513-1519.

Peeters, K., De Wilde, C., De Jaeger, G., Angenon, G., and Depicker, A. (2001) Production of antibodies and antibody fragments in plants, *Vaccine* 19: 2756-2761.

Pels Rijcken, W.R.P, Overdijck, B., Vandneijnden, D.H., and Ferwerda, W. (1995) The effect of increasing nucleotide sugar concentrations on the incorporation of sugars into glyconjugates in rat hepatocytes, *Biochem. J*. 305: 865-870.

Pels Rijcken, W.R., Overdijk, B., van den Eijnden, and Ferwerda, W. (1993) Pyrimidine nucleotide metabolism in rat hepatocytes : evidence for compartmentation of nucleotide pools, *Biochem. J.* 293: 207-213.

Petch, D., and Butler, M.A. (1994) Profile of energy metabolims in a murine hybridoma : glucose and glutamine utilization, *J. Cell. Phys.* 161: 71-76.

Petrescu, A.-J., Milac, A.-L., Petrescu, S.M., Dwek, R.A., and Wormald, M.R. (2004) Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites : implications for occupancy, structure and folding, *Glycobiology* 14: 103-114.

Pham, M.-Q., Naggie, S., Wier, M., Cha, H.J., and Bentley, W.E. (1999) Human interleukin-2 production in insect (*Trichoplusia ni*) larvae : effects and partial control of proteolysis, *Biotechnol. Bioeng*. 62: 175-182.

PhRMA (2004) Survey : Biotechnology medecines in development, www.phrma.org.

Pless, D.D., and Lennarz, W.J. (1977) Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 134-138.

Potvin, B., Kumar, R., Howard, D.R., and Stanley, P. (1990) Transfection of a human α1,3 fucosyltransferase gene into Chinese hamster ovary cells. Complications arise from activation of endogenous α1,3 fucosyltransferase, *J. Biol. Chem*. 265: 1615-1622.

Qi, W., Fong, C., and Lamport, D.T.A. (1991) Gum arabic glycoprotein is a twisted hairy rope. A new model on O-galactosylhydroxyproline polysaccharide attachment, *Plant. Physiol*. 96: 848-855.

Quéméneur, E., Guthapel, R., and Guegen, P. (1994) A major phosphoprotein of the endoplasmic reticulum disulfide isomerase, *J. Biol. Chem*. 269: 5485-5488.

Rademacher, T.W., Parekh, R.B., and Dwek, R.A. (1988) Glycobiology, *Annu. Rev. Biochem*. 57: 785-838.

Ramsoondar, J.J., Machaty, Z., Costa, C., Williams, B.L., Fodor, W.L., and Bondioli, K.R. (2003) Production of α1,3-galactosyltransferase knockout-cloned pigs expressing human α1,2-fucosyltransferase, *Biol. Reprod*. 69: 437-445.

Ray, M.K., Yang, J., Sundaram, S., and Stanley, P. (1991) A novel glycosylation phenotype expressed by Lec23, a Chinese hamster ovary mutant deficient in alpha-glucosidase I, *J. Biol. Chem*. 266: 22818-22825.

Rearick, J.I., Chapman, A., and Kornfeld, S. (1981) Glucose starvation alters lipid-linked oligosaccharide biosynthesis in Chinese hamster ovary cells, *J. Biol. Chem*. 256: 6255-6261.

Richter, A., Sandford, K.K., and Evans, V.J. (1972) Influence of oxygen and culture media on plating efficiency of some mammalian tissue cells, *J. Natl. Cancer Inst*. 49: 1705-1712.

Rimoldi, D., Creek, K.E., and Luca, L.M. (1990) Reduced mannose incorporation into GDP-mannose and dolichol-linked intermediates of N-glycosylation in hamster liver using vitamin A deficiency, *Mol. Cell. Biochem*. 93: 129-140.

Rinderknecht, E., O'Connor, B.H., and Rodriguez, H., Natural human interferon-γ. Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation, *J. Biol. Chem*. 259: 6790-6797.

Rodriguez, P., Rivas, C.I., Godoy, A., Villanueva, M., Fischbarg, J., Vera, J.C., and Reyes, A.M. (2005) Redifining the facilitated transport of mannose in human cells : absence of a glucose-insensitive, high-affinity facilitated mannose transport system, *Biochemistry* 44: 313-320.

Romanos, M.A., Scorer, C.A., and Clare, J.J. (1992) Foreign gene expression in yeast : a review, *Yeast* 8: 423-488.

Ron, D. (2002) Translational control in the endoplasmic reticulum stress response, *J. Clin. Invest*. 110:1383-1388.

Roth, J., Ziak, M., and Zuber, C. (2003) The role of glucosidase II and endomannosidase in glucose trimming of asparagine-linked oligosaccharides, *Biochimie* 85: 287-294.

Rothman, R.J., Warren, L., Vliegenthart, J.F., and Hard, K.J. (1989) Clonal analysis of the glycosylation of immmunoglobulin G secreted by murine hybridomas, *Biochemistry* 28: 1377-1384.

Rutkowski, D.T., Kaufman, R.J. (2004) A trip to the ER : coping with stress, *Trends in Cell Biol*. 14: 20-28.

Ryll, T., Valley, U., and Wagner, R. (1994) Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells, *Biotechnol. Bioeng*. 44: 184-193.

Ryll, T., and Wagner, R. (1992) Intracellular ribonucleotide pools as a tool for monitoring the physiological state of in vitro cultivated mammalian cells during production processes, *Biotechnol*. *Bioeng*. 40: 934-946.

Ryll, T., and Wagner, R. (1991) Improved ion-pair high-performance liquid chromatographic method for the quantification of a wide variety of nucleotides and sugar-nucleotides in animal cells, *J. Chromatograph*. 570: 77-88.

Sadler, J.E. (1984) Biosynthesis of glycoproteins : formation of O-linked oligosaccharides, *In* : *Biology of carbohydrates*, Ginsburg, V. and Robbins, P.W. (Eds) Wiley, New York, vol. 2 : 199-288.

Saint-Pol, A., Bauvy, C., Codogno, P., and Moore, S.E.H. (1997) Transfer of free polymannose-type oligosaccharides from the cytosol to lysosomes in cultured human hepatocellular carcinoma HepG2 cells, *J. Cell. Biol*. 136: 45-59.

Samanci, A., Yi, Q., Fagerberg, J., Strigard, K., Smith, G., Ruden, U., Wahren, B., and Mellstedt, H. (1998) Pharmacological administration of granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor is of significant importance for the induction of a strong humoral and cellular response in patients immunized with recombinant carcinoembryogenic antigen, *Cancer Immunol. Immunother*. 47: 131-142.

Sandkvist, M., and Bagdasarian, M. (1996) Secretion of recombinant proteins by Gram-negative bacteria, *Cur. Opin. Biotechnol*. 7: 505-511.

Sandrin, M.S., Loveland, B.E., and McKenzie, I.F. (2001) Genetic engineering for xenotransplantation, *J. Card. Surg*. 16: 448-457.

Santell, L., Ryll, T., Etcheverry, T., Santoris, M., Dutina, G., Wang, A., Gunson, J., and Warner, T.G. (1999) Aberrant metabolic sialylation of recombinant proteins expressed in Chinese hamster ovary cells in high productivity cultures, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 258: 132-137.

Sareneva, T., Pirhonen, J., Cantell, K., and Julkunen, I. (1995) *N*-glycosylation of human interferon-gamma : glycans at Asn-25 are critical for protease resistance, *Biochem. J*. 308: 9-14.

Sareneva, T., Pirhonen, J., Cantell, K., Kalkkinen, N., and Julkunen, I. (1994) Role of *N*-glycosylation in the synthesis, dimerization and secretion of human interferon-gamma, *Biochem. J*. 303: 831-840.

Sareneva, T., Cantell, K., Pyhälä, L., Pirhonen, J., and Julkunen, I. (1993) Effects of carbohydrates on the pharmacokinetics of human interferon-γ, *J. Interferon Res*. 13: 267-269.

Schäffer, C., Graninger, M., and Messner, P. (2001) Prokaryotic glycosylation, *Proteomics* 1: 248-261.

Schauer, R. (2001) Achievements and challenges of sialic acid research, *Glyconjugate J*. 17: 485-499.

Schlaeger, E.J., ans Schumpp, B. (1989) Studies of mammalian cell growth in suspension culture, *In* : *Advances in animal cell biology and technology for bioprocesses*, Carrondo, M.J.T., Griffiths, J.B., Stephenne, J., Crooy, P.J. (Eds) Butterworth, 386-396.

Schmidt, F.R. (2004) Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry, *Appl. Microb. Biotechnol.* 65: 363-372.

Schneider, M., Marison, I.W., and von Stockar, U. (1996) The importance of ammonia in mammalian cell culture, *J. Biotechnol*. 46: 161-185.

Schneider, Y.-J. (1989) Optimization of hybridoma cell growth and monoclonal antibody secretion in chemically defined serum- and protein-free medium, *J. Immunol. Methods* 116: 67-77.

Schrag, J.D., Procopio, D.O., Cygler, M., Thomas, D.Y., and Bergeron, J.J. (2003) Lectin control of protein folding and sorting in secretory pathway, *Trends Biochem. Sci*. 28:49-57.

Schröder, M., and Kaufman, R.J. (2005) The mammalian unfolded protein response, *Ann. Rev. Biochem.* 74: 739-789.

Schubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norburry, C.C., Yewdell, J.W., and Bennink, J.R. (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthetized proteins by proteasomes, *Nature* 404: 770-774.

Séveno, M., Bardor, M., Paccalet, T., Gomord, V., Lerouge, P., and Faye, L. (2003) Glycoprotein sialylation in plants? *Nat. Biotechnol*. 22: 1351-1352.

Shah, M.M., Fujiyama, K., Flynn, C.R., and Joshi, L. (2003) Sialylated endogenous glyconconjugates in plant cells, *Nat. Biotechnol*. 21: 1470-1471.

Shang, J., Korner, C., Freeze, H., and Lehrman, M.A. (2002) Extension of lipid-linked oligosaccharides is a high priority aspect of the unfolded protein response : endoplasmic reticulum stress in type I congenital disorder of glycosylation fibroblasts, *Glycobiology* 12: 307-317.

Shao, L., Luo, Y., Moloney, D.J., and Haltiwanger, R.S. (2002) O-glycosylation of EGF repeats : identification and initial characterization of a UDP-glucose: protein O-glucosyltransferase, *Glycobiology* 12: 763-770.

Shi, Y.P., Das, P., Holloway, B., Udhayakumar, V., Tongren, J.E., Candal, F., Biswas, S., Ahmad, R., Hasnain, S.E., and Lal, A.A. (2000) Development, expression and murine testing of a multistage *Plasmodium falciparum* malaria vacine candidate, *Vaccine* 18: 2902-2914.

Shirgaonkar, I.Z., Lanthier, S., and Kamen, A. (2004) Acoustic cell filter : a proven cell retention technology for perfusion of animal cell cultures, *Biotechnol. Adv*. 22: 433-444.

Silberstein, S., Kelleher, D.J, and Gilmore, R. (1992) The 48-kDa subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase complex is homologous to the essential yeast protein WBP1, *J. Biol. Chem*. 267: 23658-23663.

Sousa, M.C., Ferrero Garcia, M.A., Parodi, A.J. (1992) Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc : glycoprotein glycosyltransferase, *Biochemistry*, 31: 97-105.

Span, P.N., Pouwels, M.J., Olthaar, A.J., Bosch, R.R., Hermus, R.M.M., and Sweep, C.G.J. (2001) Assay for hexosamine pathway intermediates (uridine diphosphate-*N*-acetyl amino sugars) in small samples of human muscle tissue, *Technical Briefs* 47: 944-946.

Spiro, R.G. (2002) Protein glycosylation : nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds, *Glycobiology* 12: 43R-56R.

Spiro, M.J., and Spiro, R.G. (1991) Potential regulation of N-glycosylation precursor through oligosaccharide-lipid hydrolase action and glucosyltransferase-glucosidase shuttle, *J. Biol. Chem*. 266: 5311-5317.

Spiro, M.J., and Spiro, R.G. (1986) Control of N-linked carbohydrate unit synthesis in thyroid endoplasmic reticulum by membrane organization and dolichyl phosphate availability, *J.Biol. Chem*. 261: 14725-14732.

Spiro, M.J., Spiro, R.G., and Bhoyroo, V. (1979) Glycosylation of proteins by oligosaccharide-lipids, *J. Biol. Chem*. 254: 7668-7674.

Stanley, P. Raju, T.S., and Bhaumik, M. (1996) CHO cells provide access to novel N-glycans and developmentally regulated glycosyltransferases, *Glycobiology* 6: 695-699.

Stark, N.J., and Heath, E.C. (1979) Glucose-dependent glycosylation of secretory glycoprotein of pharmaceutical interest, *Anal. Chem*. 62: 1714-1722.

Stoger, E., Sack, M., Fischer, R., and Christou, P. (2002) Plantibodies : applications, advantages and bottlenecks, *Cur. Opin. Biotechnol*. 13:161-166.

Stolba, P., Hatle, K., Krnakova, A., Streda, M., and Starka, L. (1987) Effects of ascorbic acid on non enzymatic glycation of serum proteins in vitro and in vivo, *Diabetologia* 30: 585A.

Stoll, J. (1986) The isolation and characterization of mammalian glycoprotein mutants, PhD Thesis, The John Hopkins University.

Strandberg, L. And Enfors, S.O. (1991) Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1669-1674.

Streatfield, S., and Howard, J.A. (2003) Plant-based vaccines, *Int. J. Parasitol*. 33:479-493.

Strömqvist, M., Houdebine, L.M., Andersson, J., Edlund, A., Johansson, T., Viglietta, C., and Puissant, C., and Hansson, L. (1997) Recombinant human extracellular superoxide dismutase produced in milk of transgenic rabbits, *Transgenic Res*. 6: 271-278.

Sung, Y.H., Song, Y.J., Lim, S.W., Chung, J.Y., and Lee, G.M. (2004) Effect of sodium butyrate on the production, heterogeneity and biological activity of human thrombopoietin by recombinant Chinese hamster ovary cells, *J. Biotechnol*. 112: 323-335.

Suzuki, T., Park, H., Katajima, K., and Lennarz, W.J. (1998) peptides glycosylated in the endoplasmic reticulum of yeast are subsequently deglycosylated by a soluble peptide : N-glycanase activity, *J.Biol. Chem*. 273: 21526-21530.

Suzuki, T., Park, H., and Lennarz, W.J. (2002) Cytosolic peptide: *N*-glycanase (PNGase) in eukaryotic cells : occurrence, primary structure, and potential functions, *FASEB J*. 16: 635-641.

Swartz, J.R. (2001) Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins, *Cur. Opin. Biotechnol*. 12: 195-201.

Swayne, D.E., Perdue, M.L., Beck, J.R., Garcia, M., and Suarez, D.L. (2000) Vaccins protect chicken against H5 highly pathogenic avian influenza in the face of genetic changes in field viruses over multiple years, *Vet. Microbiol*. 74: 165-172.

Takamatsu, S., Fukuta, K., Asanagi, M., Abe, R., Yokomatsu, T., Fujibayashi, Y., and Makino, T. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* 1622: 179-191.

Teige, M. Weidemann, R., and Kretzmer, G. (1994) Problems with serum-free production of antithrombin III regarding proteolytic activity and product quality, *J. Biotechnol*. 34: 101-105.

Thorens, B., and Vassalli, P. (1986) Chloroquine and ammonium chloride prevent terminal glycosylation of immunoglobulin in plasma cells without affecting secretion, *Nature* 321: 618-620.

Tomiya, N., Ailor, E., Lawrence, S.M., Betenbaugh, M.J., and Lee, Y.C. (2001) Determination of nucleotides and sugar nucleotides involved in protein glycosylation by high-performance anion-exchange chromatography : sugar nucleotide contents in cultured insect cells and mammalian cells, *Anal. Biochem*. 293: 129-137.

Tomlinson, N. (1991) The effect of growth factors and the transferrin receptor on the productivity of recombinant mammalian cells, Ph.D. thesis, University of Kent at Canterbury, UK.

Tran-Moseman, A., Schauer, N., and De Bernardez Clark, E. (1999) Renaturation of *Escherichia coli*-derived recombinnat human macrophage colony-stimulating factor, *Protein Express. Purif*. 16: 181-189.

Trimble, R.B., Atkinson, P.H., Tschopp, J.F., Townsend, R.R., and Maley, F. (1991) Structure of oligosaccharides on *Saccharomyces cerevisiae SUC2* invertase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris, J. Biol. Chem*. 266: 22807-22817.

Trombetta, E.S. (2003) The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis, *Glycobiology* 13: 77R-91R.

Tsurushita, N., Hinton, P.R., and Kumar, S. (2005) Design of humanized antibodies: from anti-Tac to Zenapax, *Methods* 36: 69-83.

Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D. (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane kinase IRE1, *Science* 287: 664-666.

Urlaub, G., and Chasin, L.A. (1980) Isolation of CHO cells mutants deficient in dihydrofolate reductase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 77: 4216-4220.

Valley, U. Nimtz, M., Conradt, H.S., and Wagner, R. (1999) Incorporation of ammonium into intracellular UDP-activated N-acetylhexosamines and into carbohydrate structures in glycoproteins, *Biotechnol. Bioeng*. 64: 401-417.

Varki, A. (1994) Metabolic radiolabeling of glycoconjugates, *Methods Enzymol*. 230: 16-32.

Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides : all of the theories are correct, *Glycobiology*, 3: 97-130.

Verbert, A. (1993) La glycosylation des protéines recombinantes, *Biofutur* 125 : 40-43.

Verostek, M.F., and Trimble, R.B. (1995) Mannosyltransferase activity in membranes from various yeast strains, *Glycobiology* 5: 671-681.

Villers, C., Cacan, R., Mir, A.M., Labiau, O., and Verbert, A. (1994) Release of oligomannoside-type glycans as a marker of the degradation of newly synthesized glycoproteins, *Biochem. J*. 298: 135-142.

Von Schaewen, A., Sturm, A., O'Neill, J., and Chrispeels, M.J. (1993) Isolation of a mutant *Arabidopsis* plant that lacks *N*-acetylglucosaminyl transferase I and is unable to synthesize Golgi-modified complex N-linked glycans, *Plant. Physiol*. 102: 1109-1118.

Wacker, M., Linton, D., Hitchen, P.G., Nita-Lazar, M., Haslam, S.M., North, S.J., Panico, M., Morris, H.R., Dell, A., Wren, B.W., and Aebi, M. (2002) *N*-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*, *Science* 298: 1790-1793.

Wagner, A. (1990) Production de PUK par des cellules humaines tumorales cultivées en réacteurs discontinus et perfusés : cinétiques, physiologie et modélisation, Thèse INPL, Nancy.

Wall, R.J. (1996) Transgenic livestock : progress and prospects for the future, *Theriogenology* 45: 57-68.

Walmsley, A.M., and Arntzen, C.J. (2003) Plant cell factories and mucosal vaccines, *Cur. Opin. Biotechnol*. 14: 145-150.

Walsh, G. (2003) Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union, *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 55: 3-10.

Warner, T.G. (1999) Enhancing therapeutic glycoprotein production in Chinese hamster ovary cells by metabolic engineering endogenous gene control with antisense DNA and gene targeting, *Glycobiology* 9: 841-850.

Watson, E., Bhide, A., and van Halbeek, H. (1994) Structure determination of the intact major sialylated oligosaccharide chains of recombinant human erythropoietin expressed in CHO cells, *Glycobiology*, 4: 227-237.

Weidemann, R., Ludwig, A., and Kretzmer, G. (1994) Low temperature cultivation-a step towards process optimisation, *Cytotechnol*. 15: 111-116.

Wen, Z.Y., Teng, X.W., and Chen, F. (2000) A novel perfusion system for animal cell cultures by two step sequential sedimentation, *J. Biotechnol*. 79: 1-11.

Wenderoth, I., and von Schaewen, A. (2000) Isolation and characterization of plant *N*-acetylglucosaminyltransferase I (GNT I) cDNA sequences. Functional analyses in the Arabidopsis *cgl* mutant and in antisens plants, *Plant. Physiol*. 123: 1097-1108.

Werner, R.G. (2004) Economic aspects of commercial manufacture of biopharmaceuticals, *J. Biotechnol*. 113: 171-182.

Werner, R.G., and Noé, W. (1993) Mammalian cell cultures. Part II : Genetic engineering, protein glycosylation, fermentation and process control, *Arzneim.-Forsch./Drug. Res*. 43: 1242-1249.

Wilkins, J., Cone, J., Randhawa, Z.I., Wood, D., Warre, M.K., and Witkowska, E. (1993) A study of intermediates involved in the folding pathway for recombinant human macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) : evidence for two distinct folding pathways, *Protein Sci*. 2: 244-254.

Witcher, D.R., Hood, E.E., Peterson, D., Bailey, M., Bond, D., Kusnadi, A., Evangelista, R., and Nikolov, Z. (1998) Commercial production of β-glucuronidase (GUS) : a model system for the production of proteins in plants, *Mol. Breed.* 4: 301-312.

Wong, D.C.F., Wong, K.T.K., Goh, L.T., Heng, C.K., and Yap, M.G.S. (2004) Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures, *Biotechnol. Bioeng*. 89: 164-177.

Wurm, F.M. (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells, *Nat. Biotechnol*. 22: 1393-1398.

Xie, L., Nyberg, G., Gu, X., Li, H., Möllborn, F., and Wang, D.I.C. (1997) Gamma-IFN production and quality in stochiometric fed-batch cultures of CHO cells under serum-free conditions, *Biotechnol. Bioeng*. 56: 577-582.

Xu, Y.K., Kaufman, F.R., Donnell, G.N., Giudici, T., Alfi, O. and Ng, W.G. (1995) HPLC analysis of uridine diphosphate sugars: decreased concentrations of uridine diphosphate galactose in erythrocytes and cultured skin fibroblasts from classical galactosemia patients, *Clin. Chim. Acta* 240: 21-33.

Yamamoto, I., Matsunaga, T., Sakata, K., Nakamura, Y., Doi, S., and Hanmyou, F. (1996) Histone hyperacetylation plays a role in augmentation of IL-4-induced IgE production in LPS-stimulated murine B-lymphocytes by sodium butyrate, *J. Biochem*. 119: 1056-1061.

Yamanishi, K., Takahashi, M., Noshida, T., Ohmoto, Y., Takano, M., Nakai, S., and Hirai, Y. (1991) Renaturation, purification, and characterization of human truncated macrophage colony-stimulating factor expressed in *Escherichia coli*, *J. Biochem.* 109: 404-409.

Yanagishita, M., and Hascall, V.C. (1992) Cell surface heparan sulfate proteoglycans, *J. Biol. Chem.* 267: 9451-9454.

Yang, M., and Butler, M. (2002) Effects of ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms, *Biotechnol. Prog*. 18: 129-138.

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

Yoneda, T., Imaizumi, K, Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., Tohyama, M. (2001) Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to ER stress, *J. Biol. Chem*. 276:13935-13940.

Yoon, S.K., Song, J.Y., and Lee, G.M. (2003) Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells, *Biotechnol. Bioeng*. 82: 279-298.

Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., Mori, K. (2001) Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response, *Mol. Cell. Biol*. 21: 1239-1248.

Young, N.M., Brisson, J.-R., Kelly, J., Watson, D.C., Tessier, L., Lanthier, P.H., Jarrell, H.C., Cadotte, N., St Michael, F., Aberg, E., and Szymanski, M. (2002) Structure of the *N*-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium *Campylobacter jejuni*, *J. Biol. Chem*. 277: 42530-42539.

Yuk, I.H.Y., and Wang, D.I.C. (2002) Glycosylation by Chinese hamster ovary cells in dolichol phosphate-supplemented cultures, *Biotechnol. Appl. Biochem*. 36: 141-147.

Yurchenco, P.D., and Atkinson, P.H. (1977) Equilibration of fucosyl glycoprotein pools in HeLa cells, *Biochemistry* 16: 944-953.

Zalkin, H. (1985) Glutamine amidotransferases, *Methods Enzymol*. 113: 282-287.

Zanghi, J.A., Mendoza, T.P., Knop, R.H., and Miller, W.M. (1998) Ammonia inhibits neural cell adhesion molecule polysialylation in Chinese hamster ovary and cell lung cancer cells, *J. Cell. Phys*. 177: 248-263.

Zapun, A., Jakob, C.A., Thomas, D.Y., and Bergeron, J.J.M. (1999) Protein folding in a specialized compartment the endoplasmic reticulum, *Structure* 7:R173-R182.

Zawada, J., Richter, B., Huang, E., Lodes, E., Shah, A., and Swartz, J. (2003) High-density, defined media culture for the production of *Escherichia coli* cell extracts, *Ferm. Biotechnol*. 862: 142-156.

Zen, Y., and Decker, W.D. (1995) Mathematical modeling and analysis of glucose and glutamine utilization and regulation in cultures of continuous mammalian cells, *Biotechnol. Bioeng*. 47: 334-346.

Zhou, Q., Kyazike, J., Echelard, Y., Meade, H.M., Higgins, E., Cole, E.S., and Edmunds, T. (2005) Effect of genetic backgroung on glycosylation heterogeneity in human antithrombin produced in the mammary gland of transgenic goats, *J. Biotechnol*. 117: 57-72.

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Monsieur Loïc FAYE, Directeur de Recherche, Université de Rouen, Mont Saint Aignan

Monsieur Otto-Wilhelm MERTEN, Directeur Scientifique, Généthon, Evry

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame KOCHANOWSKI Nadine

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

"Influence des précurseurs de la glycosylation sur la macrohétérogénéité de l'IFN-γ produit en bioréacteur par des cellules CHO"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **« Procédés biotechnologiques et alimentaires »**

Fait à Vandoeuvre, le 17 octobre 2005
Le Président de l'I.N.P.L.,
L. SCHUFFENECKER

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE – NANCY –

Pour le Président
Le Vice-Président,
J.-L. COUJARD

TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55