



HAL
open science

Production et glycosylation d'EPO par cellules CHO : caractérisation par électrophorèse capillaire au cours de procédés discontinus

François Le Floch

► **To cite this version:**

François Le Floch. Production et glycosylation d'EPO par cellules CHO : caractérisation par électrophorèse capillaire au cours de procédés discontinus. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2003. Français. NNT : 2003INPL079N . tel-01749708

HAL Id: tel-01749708

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749708>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



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>

0360358458

03INPL07SN

03 2003 LE FLOCH F.

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
Laboratoire des Sciences du Génie Chimique – CNRS

THESE

présentée à l'INPL par

François LE FLOCH

Pharmacien de l'Université H. Poincaré de Nancy
Ingénieur de l'ENSIC de Nancy

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Sujet

**Production et glycosylation d'EPO par cellules CHO :
caractérisation par électrophorèse capillaire
au cours de procédés discontinus**

soutenue publiquement le 30 octobre 2003 devant la commission d'examen

Membres du jury :

Président : M. Athanase Visvikis – Professeur à l'Université H. Poincaré, Nancy
Rapporteurs : Mme Nicole Kessler – Professeur à l'Université C. Bernard, Lyon
Mme Anne Harduin-Lepers – Chargée de Recherche au CNRS, Lille
Examineurs : Mme Annie Marc – Directeur de Recherche au CNRS, Nancy
M. Jean-Louis Goergen – Professeur à l'INP de Lorraine, Nancy



AVANT-PROPOS

Ce projet a été réalisé au Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC) de Nancy, au sein du groupe Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires (GPBA) sous la direction de Madame Annie Marc, Directeur de Recherche au CNRS et de Monsieur Jean-Louis Goergen, Professeur à l'Institut National Polytechnique de Lorraine. Je les remercie pour la formation scientifique qu'ils m'ont permis d'acquérir, ainsi que pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

J'exprime ma vive reconnaissance à Monsieur Athanase Visvikis, Professeur à la l'Université Henri Poincaré (Nancy), pour avoir examiné ce travail et accepté la présidence du jury de thèse.

Je tiens à remercier Mesdames Nicole Kessler, Professeur à l'Université Claude Bernard (Lyon) et Anne Harduin-Lepers, Chargée de Recherche au CNRS, d'avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteur de ce travail.

Ce projet ayant fait l'objet d'un partenariat avec la société Aventis Pharma, je remercie Messieurs Pierre Cans et Jean-Marc Guillaume pour leur contribution scientifique, ainsi que pour leur accueil au sein de leur équipe à Vitry sur Seine.

Je tiens également à remercier les nombreuses personnes cotoyées au laboratoire tout au long de ce travail, en particulier, Bertrand Tessier, Sébastien Chenuet et Isabelle Ténégal pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée durant leurs stages respectifs, mais aussi toute l'équipe des "cellules animales", Davin Uy, Zahi et Marianne Chemaly, Hichem Cherichi et Fabrice Blanchard.

Enfin, je remercie grandement tous mes proches qui n'ont jamais manqué de me témoigner leur soutien tout au long de cette longue aventure.



LISTE DES ABREVIATIONS

APTS	:	8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate
AS	:	acide sialique
Asn	:	asparagine
BHK	:	baby hamster kidney
CGE	:	électrophorèse capillaire en phase gel
CHO	:	chinese hamster ovary
CLHP	:	chromatographie liquide haute pression
CMP	:	cytidine 5'-mono-phosphate
CZE	:	électrophorèse capillaire de zone
DEAE	:	chromatographie basse pression à échange d'ions
DHFR/dhfr	:	dihydrofolate réductase
Dol	:	dolichol
EC	:	électrophorèse capillaire
ELISA	:	enzyme linked immuno-sorbent assay
<i>E.coli</i>	:	<i>Escherichia coli</i>
EPO-h	:	érythropoïétine humaine
EPO-m	:	érythropoïétine murine
Fuc	:	fucose
FUT	:	fucosyltransférase
Gal	:	galactose
Glc	:	glucose
GDP	:	guanosine 5'-diphosphate
GM-CSF	:	facteur de croissance des granulocytes et des macrophages
HPAEC	:	chromatographie haute pression à échange d'ions
IEF	:	iso-électrofocalisation
IFN	:	interféron
Ig	:	immunoglobuline
IL	:	interleukine
Lac	:	lactosamine
MALDI/TOF	:	matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight
Man	:	mannose
MEKC	:	électrophorèse capillaire micellaire
MEM	:	modified Eagle medium
NAc	:	N-acétyl
NeuAc	:	acide N-acétylneuraminique
NeuGc	:	acide N-glycolylneuraminique
PBS	:	phosphate buffer saline solution
RMN	:	résonance magnétique nucléaire
SEC	:	chromatographie par exclusion de taille
Ser	:	sérine
SM	:	spectrométrie de masse
svf	:	sérum de veau foetal
TAg	:	large T antigen
Thr	:	thréonine
Trp	:	tryptophane
Tyr	:	tyrosine
UDP	:	uridine 5'-diphosphate
CHO-UH1	:	lignée CHO dite "hôte universel de 1 ^{ère} génération"



SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	7
BIBLIOGRAPHIE.....	13
I. Les procédés de production de protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique par culture de cellules animales.....	13
1. Les systèmes d'expression.....	13
1.1. Les principaux systèmes.....	14
1.2. Les nouveaux systèmes de production.....	17
1.3. Les cellules CHO.....	21
2. Les différents procédés de culture des cellules de mammifères.....	22
2.1. Les conditions de culture.....	22
2.2. Culture de cellules adhérentes et culture de cellules en suspension.....	26
2.3. Les différents modes de culture à grande échelle.....	27
2.4. Les grandes tendances industrielles.....	29
II. La glycosylation des protéines recombinantes produites par cellules de mammifères.....	30
1. Structure et mécanisme de synthèse.....	30
2. Rôles des chaînes glycaniques.....	36
3. Influence du procédé de culture sur la glycosylation des glycoprotéines recombinantes.....	37
3.1. Cellule hôte.....	37
3.2. Environnement extracellulaire / Composition du milieu de culture (sérum, glutamine, NH ₄ ⁺ , glucose.....)	39
3.3. Mode de culture et paramètres opératoires physico-chimiques.....	41
3.4. Durée de culture et dégradation enzymatique.....	43
4. Méthodes d'analyse des glycoprotéines.....	43
4.1. Séparation des glycoformes.....	44
4.2. Séparation des chaînes glycaniques.....	45
4.3. Détermination de la séquence oligosaccharidique.....	46
4.4. Application au suivi de la glycosylation en cours de culture.....	47
III. L'érythropoïétine : rôle, structure, production, purification et analyse.....	49
1. Généralités : rôles physiologiques et utilisations de l'EPO.....	49
2. Structure de l'EPO.....	51
2.1. Chaîne peptidique.....	52
2.2. Glycosylation de l'EPO.....	54
3. Procédés de production d'EPO.....	58
3.1. Systèmes d'expression.....	58
3.2. Procédés de culture en masse pour la production d'EPO (cellules CHO ou BHK).....	59
4. Procédés de purification et d'analyse de l'EPO.....	60
4.1. Purification de l'EPO.....	60
4.2. Analyse de la glycosylation de l'EPO.....	61
IV. Positionnement de l'étude.....	71

MATERIELS ET METHODES.....	72
I. Génération du clone CHO recombiné producteur d'EPO.....	72
1. Construction moléculaire du vecteur d'expression eucaryotique.....	72
2. Transformation bactérienne.....	74
3. Transfection de cellules CHO.....	75
II. Culture cellulaire.....	77
1. Lignées cellulaires d'origine.....	77
1.1. Lignée CHO UH-1.....	77
1.2. Lignée CHO TAg.....	77
2. Culture et propagation des cellules.....	77
2.1. Cellules adhérentes.....	77
2.2. Cellules en suspension.....	78
2.3. Culture en bioréacteur régulé et parfaitement agité.....	79
3. Conservation des lignées.....	80
3.1. Congélation des cellules.....	80
3.2. Décongélation des cellules.....	80
4. Numération cellulaire.....	81
5. Milieux de culture.....	81
6. Analyse des constituants du milieu.....	82
7. Analyse de l'activité sialidasique dans le surnageant de culture.....	84
8. Dosage de l'activité α 1,4 fucosyltransférase.....	85
9. Exploitation des résultats : calculs des paramètres cinétiques.....	86
III. Immuno-purification de l'EPO.....	88
IV. Caractérisation de l'EPO.....	89
1. Western-blot.....	89
2. Quantification de l'EPO par test ELISA.....	90
3. Analyse de la glycosylation de l'EPO par électrophorèse capillaire.....	91
3.1. Matériel.....	91
3.2. Analyse des chaînes glycaniques provenant de glycoprotéines.....	91
RESULTATS ET DISCUSSION.....	93
I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée.....	93
1. Génération d'une lignée cellulaire CHO productrice d'EPO.....	93
1.1. Construction du vecteur plasmidique d'expression eucaryotique (pFL1).....	94
1.2. Transfections des cellules CHO.....	96
1.3. Sélection du meilleur clone CHO producteur d'EPO.....	98
2. Mise au point de l'immuno-purification de l'EPO.....	103
2.1. Capacités de couplage de l'anticorps sur différents gels d'immuno-affinité.....	103
2.2. Capacités de fixation de l'EPO sur le gel CNBr activé.....	104
2.3. Choix du tampon d'éluion.....	105
2.4. Etude de la qualité de la méthode.....	107
3. Analyse des chaînes glycaniques de l'EPO par électrophorèse capillaire.....	110
3.1. Adaptation du protocole d'analyse des glycanes aux contraintes du suivi de la glycosylation de protéines recombinantes en cours de procédé.....	110
3.2. Analyse des chaînes glycaniques de l'EPO par électrophorèse capillaire.....	114

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO murine produite par culture discontinue de cellules CHO	127
1. Analyse des chaînes glycaniques de l'EPO-m et comparaison avec l'EPO-h	127
1.1. Identification des pics parasites induits par le milieu de culture.....	127
1.2. Identification des pics correspondant aux chaînes sialylées de l'EPO-m.....	131
1.3. Discussion sur la nature des chaînes glycaniques de l'EPO-m.....	132
2. Suivi de la glycosylation de l'EPO-m sécrétée au cours d'une culture discontinue de cellules CHO	134
3. Conclusions	153
III. Influence de l'adaptation à la culture sans sérum sur la physiologie des cellules CHO (production et glycosylation de l'EPO, croissance et métabolisme cellulaires).....	154
1. Adaptation à la culture sans sérum ou sans protéine.....	154
1.1. Essais préliminaires avec plusieurs milieux commerciaux	154
1.2. Procédure d'adaptation dans les deux milieux sélectionnés	156
2. Etude de l'influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire.....	159
3. Conclusions	185
 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	 186
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 193



INTRODUCTION



INTRODUCTION

Le génie génétique, né dans les années 70, a ensuite connu un essor de grande ampleur en raison des applications variées dont il est à l'origine. En effet, de nombreuses molécules, dont la complexité de structure ne permettait pas la synthèse chimique et qui devaient auparavant être extraites directement de sources biologiques, peuvent désormais être produites en intégrant à une cellule hôte un matériel génétique hétérologue. C'est ainsi par exemple, que l'insuline, utilisée dans le traitement du diabète, provenait de pancréas de porcs ou de bœufs jusqu'en 1982, date à partir de laquelle cette protéine a pu être produite à l'échelle industrielle à partir de cultures de bactéries : ce fut le premier cas de commercialisation d'une protéine recombinante. De même, en 1985, l'hormone de croissance humaine, qui était jusqu'alors extraite d'hypophyses prélevées sur des cadavres, fut également mise sur le marché sous forme recombinante. En 1987, le rtPA (recombinant tissue plasminogen activator) est la première protéine produite par culture de cellules CHO (Chinese hamster ovary) à être commercialisée. Ce type de technologie trouve aujourd'hui un champ d'applications très vaste, principalement dans l'industrie pharmaceutique (médicaments, vaccins, et probablement bientôt thérapie génique), mais aussi dans le domaine plus controversé actuellement de l'agriculture (amélioration des plantes, résistance aux maladies, aux insectes, etc...).

Parmi les protéines d'intérêt thérapeutique produites aujourd'hui par recombinaison génétique, la plupart comportent dans leur structure une composante glycanique, souvent nécessaire à leur activité biologique *in vivo*. C'est ainsi le cas du facteur VIII recombinant qui est utilisé pour remplacer la molécule naturelle, absente ou inactive dans le processus de coagulation chez les hémophiles de type A, ou du facteur de croissance des granulocytes et des macrophages (GM-CSF) recombinant qui peut, quant à lui, être administré chez des sujets immunodéprimés, suite à une chimiothérapie par exemple, dans le but de stimuler l'hématopoïèse.

Bien que l'activité biologique de ces glycoprotéines soit généralement portée par la partie protéique (fonction enzymatique, hormonale ou de transport), la structure glycosylée leur confère un certain nombre de propriétés particulières. D'un point de vue physico-chimique, les glycannes participent à la structure spatiale de la molécule en influençant son repliement et en recouvrant plus ou moins largement la surface de la chaîne peptidique, ce qui peut ainsi la protéger contre

les dégradations protéolytiques, masquer des épitopes ou au contraire en constituer de nouveaux, susceptibles de déclencher des réactions antigéniques. La solubilité de la protéine peut aussi être notablement modifiée par l'hydrophilie apportée par les oligosaccharides. Cependant, le rôle essentiel joué par la partie glycanique dans l'activité thérapeutique des glycoprotéines n'est, en réalité, lié qu'indirectement à leurs fonctions biologiques et concerne plus particulièrement leur durée de vie dans l'organisme (Saxena *et al.*, 1998; Weikert *et al.*, 1999). En effet, la demi-vie de ces molécules peut se trouver fortement dépendante de leur structure glycanique, probablement en raison de sa situation en surface de la molécule et des sites de reconnaissance potentiels qu'elle présente donc pour les récepteurs membranaires des cellules hépatiques chargées de la détoxification de l'organisme. Ainsi, plusieurs glycoprotéines, telles que l'érythropoïétine (EPO) notamment, voient leur élimination hépatique grandement augmentée et donc leur activité biologique *in vivo* réduite d'autant, lorsqu'elles ne sont pas glycosylées correctement, en particulier au niveau de leur sialylation terminale.

D'un point de vue thérapeutique, la principale utilisation des protéines recombinantes étant la substitution de molécules naturelles, absentes ou inactives dans de nombreuses pathologies, il apparaît essentiel de concevoir des procédés de production assurant une structure moléculaire conduisant à une activité biologique optimale. Il s'avère que la meilleure solution est bien souvent d'essayer de reproduire le plus fidèlement possible ce que la nature a établi au cours de l'évolution. C'est ainsi que les cellules hôtes les plus adaptées à la production industrielle de glycoprotéines recombinantes se sont révélées être les cellules de mammifères, en particulier les lignées cellulaires de hamster CHO, dont les capacités de glycosylation rendent possible l'obtention de structures glycaniques très proches de celles rencontrées sur les molécules humaines naturelles. En effet, en dépit de rendements de production largement supérieurs et de contraintes de mise en œuvre beaucoup moins importantes, les autres systèmes d'expression cellulaires utilisés actuellement pour la production de protéines recombinantes plus simples, présentent en général l'inconvénient majeur de ne permettre aucune glycosylation, pour ce qui concerne les bactéries (*Escherichia coli*), ou uniquement une glycosylation incomplète, pour les levures (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*) ou les cellules d'insecte infectées par baculovirus (*Spodoptera frugiperda*).

La composante glycanique apporte donc ici une complexité singulière car, contrairement à la synthèse peptidique basée sur un modèle précis codé au niveau de l'ADN, la glycosylation dépend du bon fonctionnement et de la spécificité de toute une série d'enzymes; il n'y a pas de

modèle à reproduire et le résultat dépend de l'ordonnement des réactions enzymatiques et de leur contrôle. La synthèse d'un oligosaccharide de 12 unités, par exemple, n'implique pas moins de 40 réactions enzymatiques successives, et l'absence d'un seul résidu peut suffire à modifier complètement la structure et donc la fonction d'un glycanne. Chaque type de cellule hôte possédant en outre un équipement enzymatique qui lui est propre, il est aisé de comprendre que toutes les lois régissant ces modifications post-traductionnelles ne sont pas encore maîtrisées et qu'il n'est donc pas encore possible de contrôler la structure des glycannes aussi bien qu'une séquence peptidique.

Ce processus complexe de glycosylation induit une grande hétérogénéité de structure en ce qui concerne les molécules synthétisées, et la plupart des glycoprotéines se présentent en fait sous de multiples "glycoformes", identiques par leur chaîne peptidique mais se différenciant chacune par la nature des oligosaccharides qu'elles portent. Or, sur le plan des réglementations pharmaceutiques internationales, la tendance actuelle de la FDA (Food and Drug Administration) pour les Etats Unis et du CPMP (Committee for Proprietary Medical Productions) pour l'Union Européenne est de demander sans cesse davantage de garanties sur la qualité des produits commercialisés dans le but d'améliorer efficacité et sécurité d'utilisation. Bien entendu, la conséquence directe pour les biotechnologies est l'intensification des contrôles visant à limiter les risques de contamination de tout ordre; et concernant plus particulièrement les nouvelles glycoprotéines destinées à la thérapie humaine, les analyses de glycosylation requises sont de plus en plus poussées afin de justifier de la production de molécules de structure précise et constante.

Dans ce contexte, de nombreuses recherches dans le domaine de la glycobiologie ont pour but de faire progresser au plus vite la compréhension et la maîtrise du processus de glycosylation *in vivo* mais également en cours de culture de cellules animales, et représentent donc un enjeu important pour le développement de cette technologie prometteuse appliquée à la production de ce type particulier de biomolécules que sont les glycoprotéines d'intérêt thérapeutique.

Ainsi, l'étude de l'influence des différents procédés de culture sur la structure glycanne des protéines obtenues paraît d'une importance cruciale dans la mesure où le type de bioréacteur (cuve agitée classique, lit fixe ou fluidisé, fibres creuses...), son mode de fonctionnement (continu, semi-continu ou discontinu) et ses paramètres opératoires (composition du milieu de culture, température, oxygénation, durée de la culture...) peuvent avoir des effets importants sur

l'état physiologique des cellules et donc sur leur métabolisme, et par conséquent sur régulation intracellulaire des réactions enzymatiques de glycosylation.

C'est pourquoi, l'objectif de ce travail, qui s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre un laboratoire universitaire et un groupe industriel (Aventis Pharma), est d'apporter une contribution aux connaissances concernant l'influence du procédé de production sur la structure glycanique d'une glycoprotéine recombinante.

Pour cette étude, l'EPO murine produite par des cellules CHO en culture discontinue a été choisie comme système modèle. En effet, d'une part, la littérature abondante concernant la forme humaine de cette protéine fortement glycosylée (à 40%_{pp}) procurait l'avantage de constituer une base conséquente pour la mise au point des techniques d'analyse et de purification. Pour des raisons d'ordre stratégique, notre partenaire industriel a préféré nous fournir une construction moléculaire contenant le gène de l'EPO murine plutôt que celui de la protéine humaine. D'autre part, la lignée cellulaire principalement utilisée dans ces travaux (UH-1 pour "hôte universel de 1^{ère} génération"), présentait l'intérêt d'avoir été préalablement "humanisée" en lui intégrant le gène de l' α 2,6-sialyltransférase (ST6 Gal I), enzyme de glycosylation non exprimée par les cellules CHO mais présente chez l'Homme. En outre, le système de culture de type discontinu a été retenu car il représente l'étape initiale de la plupart des travaux de développement de procédés en raison de sa simplicité de mise en œuvre, les autres modes de culture étant essentiellement appliqués en cours de phases d'optimisation plus avancées.

La glycosylation de l'EPO ainsi produite a été analysée par électrophorèse capillaire (EC), technique hautement résolutive, dotée d'une grande sensibilité, permettant de fournir des profils caractéristiques de glycoprotéines et de déterminer précisément la taille des chaînes glycaniques dont elles sont constituées.

Ainsi, après la mise au point des différents outils indispensables à l'étude, les effets de deux facteurs liés au procédé sur la glycosylation d'une protéine recombinante ont pu être étudiés (Figure 1) :

- les cellules changeant d'état physiologique tout au long d'une culture discontinue, il a d'abord paru intéressant d'analyser l'évolution de la glycosylation de l'EPO au cours du temps pendant une culture standard de ce type. Ce suivi de la qualité de la protéine tout au long du

procédé a ainsi pu être réalisé en appliquant l'électrophorèse capillaire à l'analyse des chaînes glycaniques de l'EPO produite au cours d'une culture, ce qui constitue une approche originale par le niveau de précision qu'elle procure

- puis, dans un deuxième temps, l'adaptation des cellules à un milieu sans sérum a été réalisée dans le but d'ajuster au mieux les conditions de culture aux contraintes industrielles. Alors que cette procédure oblige les cellules à orienter leur métabolisme en fonction des nouvelles sources nutritionnelles disponibles, les modifications qu'elle pourrait potentiellement induire sur la glycosylation des protéines recombinantes n'ont pas encore fait l'objet d'étude spécifique dans la littérature à ce jour. Notre travail a donc ensuite consisté à évaluer l'influence de ce type d'adaptation sur la glycosylation de l'EPO, ainsi que sur la physiologie cellulaire, en mettant en évidence les effets propres à la procédure d'adaptation elle-même, et ceux spécifiquement liés à la modification de l'environnement extra-cellulaire provoquée par l'élimination du sérum du milieu de culture.

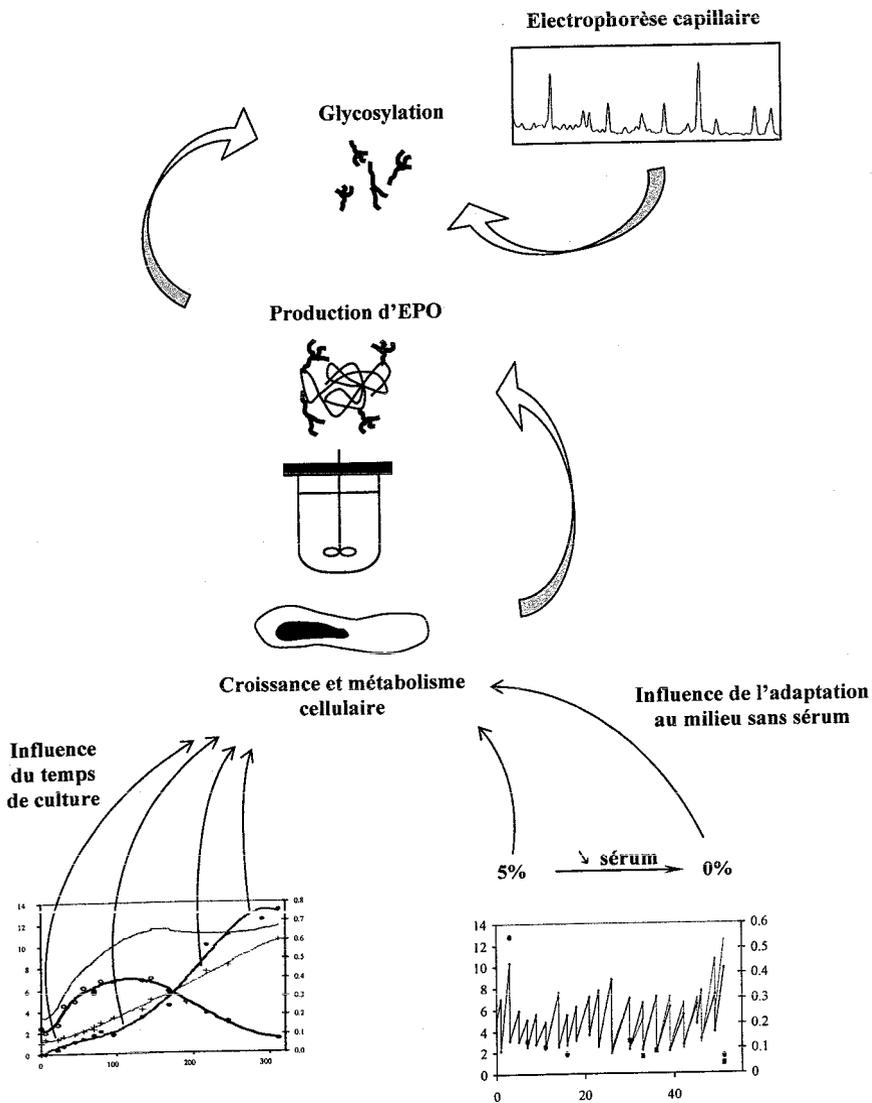
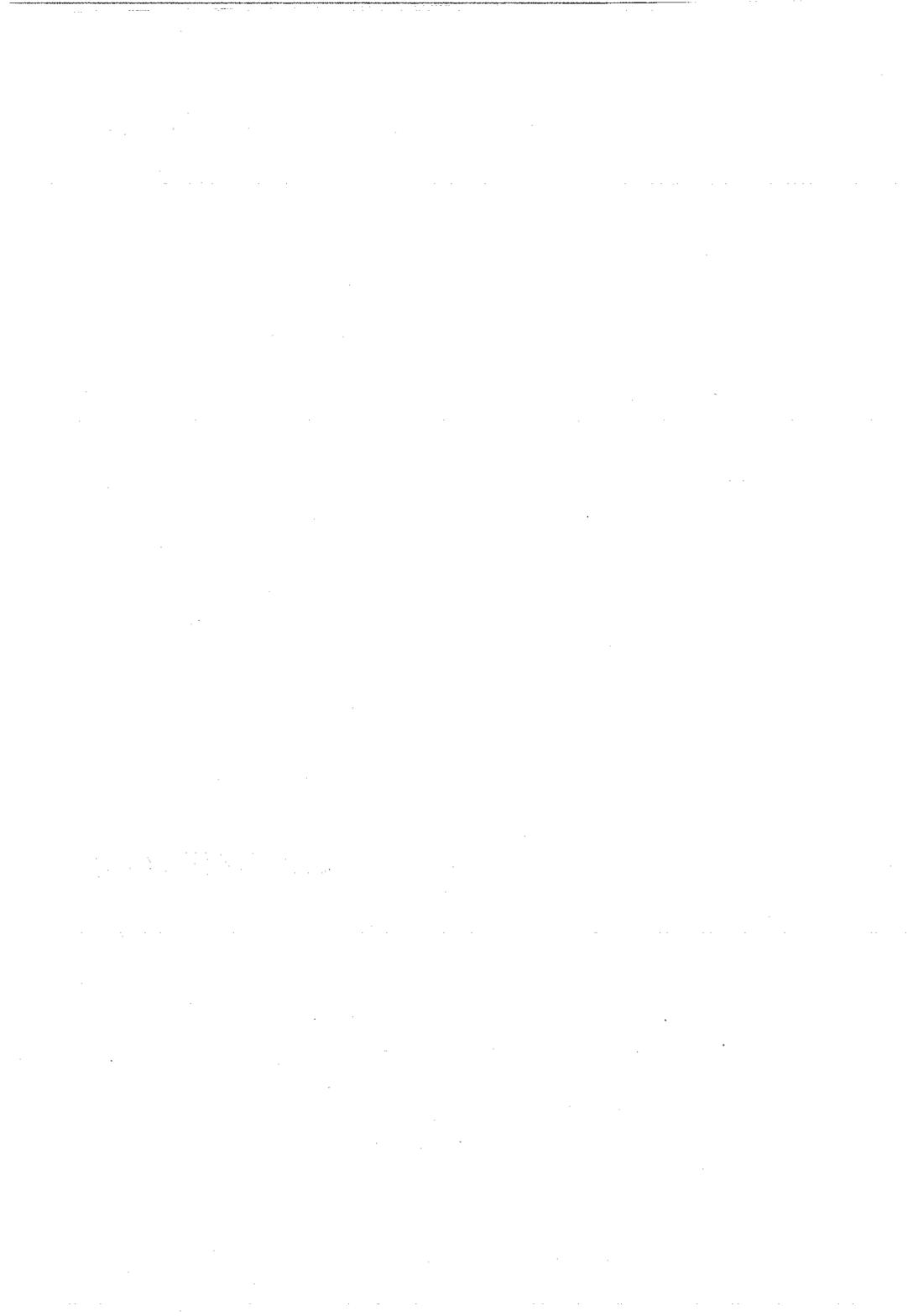


Figure 1 : Schématisation des objectifs de l'étude.

BIBLIOGRAPHIE



BIBLIOGRAPHIE

I. Les procédés de production de protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique par culture de cellules animales

1. Les systèmes d'expression

Les systèmes de production de protéines recombinantes mettent en œuvre un vecteur d'expression permettant d'introduire et de faire exprimer un gène étranger dans des cellules hôtes pouvant être procaryotes, eucaryotes ou même constituer un organisme multi-cellulaire. Ce vecteur d'expression, de nature plasmidique ou virale, est une construction moléculaire comprenant le gène d'intérêt, un promoteur reconnu par la cellule hôte contrôlant l'expression de ce gène, des signaux de fin de traduction, et éventuellement des signaux de sécrétion.

Dans le but de produire en grande quantité une protéine de structure correcte, le vecteur idéal doit avoir plusieurs qualités particulières : il doit, premièrement, pouvoir pénétrer en de nombreux exemplaires dans la cellule hôte ou se répliquer afin que le gène de la protéine hétérologue y soit présent en de multiples copies, deuxièmement, contenir un promoteur "fort" pour que ces copies soient exprimées préférentiellement par rapport aux autres gènes de la cellule hôte, et troisièmement, être stable afin de persister dans les cellules le plus longtemps possible.

Les qualités de l'hôte idéal sont encore plus diverses. Il doit, bien entendu, exécuter correctement les instructions portées par le gène étranger mais aussi pouvoir, si nécessaire, réaliser des modifications post-traductionnelles permettant d'obtenir une protéine ressemblant au mieux à la protéine naturelle. De plus, afin de permettre une production de masse en bioréacteur, les cellules hôtes doivent être résistantes, peu exigeantes en éléments nutritifs et pouvoir se multiplier rapidement et à densité élevée. S'il s'agit de plantes ou d'animaux entiers, le coût de leur culture ou élevage doit être limité.

1.1. Les principaux systèmes

Jusqu'au milieu des années 90, les protéines d'intérêt thérapeutique étaient principalement produites dans les trois systèmes d'expression que sont la bactérie *Escherichia coli*, la levure *Saccharomyces cerevisiae* et la cellule de hamster CHO (Hodgson, 1993). Depuis, de nouveaux modèles ont été développés, mais les contraintes et les atouts de ces trois types de système représentent encore les critères essentiels à concilier pour les différentes alternatives actuelles quant au choix d'un système de production.

Etudiée depuis une cinquantaine d'années, *E. coli* constitue le système hôte-vecteur le mieux connu. Cette bactérie accepte de nombreux vecteurs plasmidiques; elle se prête très bien à la culture de masse en fermenteurs de grande capacité, et les taux d'expression de la protéine d'intérêt y sont très élevés, de l'ordre de plusieurs grammes par litre, et pouvant représenter jusqu'à 30% des protéines cellulaires exprimées. Ainsi, Horn *et al.* (1996) ont produit plus de 3 g/L d'un fragment d'anticorps ("mini-anticorps") par culture semi-continue à haute densité d'un clone d'*E. coli* pourvu d'un vecteur d'expression optimisé. Malheureusement, cette bactérie est incapable de réaliser naturellement les maturations post-traductionnelles souvent nécessaires à l'activité ou à la stabilité de certaines protéines que sont, en particulier, la glycosylation ou la formation de ponts disulfures stables, nécessaires au repliement correct de la molécule (Bessette *et al.*, 1999). En outre, les faibles capacités de sécrétion de cet hôte induisent souvent une accumulation des produits synthétisés sous forme de corps d'inclusion inactifs; après extraction, la protéine est alors souvent très difficile à renaturer, ce qui baisse considérablement les rendements de production. Enfin, cette entérobactérie possède des endotoxines contraignant les molécules obtenues à subir une purification et des contrôles très poussés.

Cependant, d'importants progrès ont été réalisés récemment, en ce qui concerne le repliement moléculaire notamment. De plus, même si la sécrétion des protéines reste encore problématique, leur synthèse dans le cytoplasme ou le périplasma de la bactérie permet d'éviter leur accumulation sous forme de corps d'inclusion (Swartz, 2001). Ainsi, le double objectif que représente l'obtention d'un produit soluble et biologiquement actif a été atteint pour des molécules aussi complexes que l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA, produit actuellement par Genentech sur cellules CHO) contenant 527 acides aminés et 17 ponts disulfures (Qiu *et al.*, 1998). Par ailleurs, des essais de "synthèse de protéine sans cellule" ont également donné lieu à des résultats prometteurs (Kigawa *et al.*, 1999). En effet, ce système de

Bibliographie

production à base d'extraits cellulaires d'*E. coli*, s'avère d'une flexibilité étonnante par l'étendue des possibilités de manipulation des capacités de synthèse et de repliement protéique qu'il autorise (enzymes, ARN_m, acides aminés, ATP,...). Il permet également de focaliser les ressources métaboliques sur le processus de synthèse de la protéine, et même de se dispenser d'étudier son éventuelle toxicité pour la division cellulaire. Cependant, les coûts induits par les importants volumes de réactifs onéreux nécessaires à la mise en œuvre de cette technique ne permettent pas encore actuellement d'étendre son application à grande échelle (Swartz, 2001). En dépit de ces avancées expérimentales significatives, plusieurs inconvénients demeurent des obstacles très lourds pour la production de certaines protéines par ce premier système d'expression, et d'autres modèles ont été développés dans le but d'y remédier.

Dans un deuxième temps donc, la levure de boulanger, utilisée depuis l'antiquité pour la fabrication du pain et de boissons alcoolisées, est également devenue un hôte de choix pour la production de protéines recombinantes du fait de son matériel génétique relativement simple et de son absence de toxicité. La stabilité des vecteurs disponibles aujourd'hui est satisfaisante; certains vecteurs "intégratifs" pouvant même s'incorporer définitivement au génome de la levure par recombinaison homologe. Les taux d'expression des protéines hétérologues obtenus chez *S. cerevisiae* sont très variables d'une protéine à l'autre, mais peuvent atteindre des niveaux assez élevés, de l'ordre de 100-500 mg/L. Pour ce qui concerne les modifications post-traductionnelles, la levure peut en réaliser certaines comme la myristylation, la phosphorylation ou l'isoprénylation, mais n'est capable d'effectuer qu'une glycosylation très simple, à base de résidus "mannose" ajoutés en quantité importante sur la chaîne peptidique, pouvant non seulement s'avérer néfaste pour l'activité biologique souhaitée, mais également conférer aux protéines obtenues des propriétés immunogènes gênantes. D'autre part, la sécrétion de petits polypeptides est un phénomène naturel chez la levure qui simplifie grandement les étapes ultérieures de purification; cependant, pour les protéines de plus grande taille, un couplage à une séquence "signal" est nécessaire et affecte souvent notablement le taux de sécrétion (Morelle, 1993).

Ainsi, afin de produire des molécules plus complexes, nécessitant une maturation et un repliement corrects, un troisième type de système d'expression a été développé : les cellules de mammifères, la lignée CHO étant la plus largement utilisée. Durant la dernière décennie, ce système s'est en outre imposé comme prédominant sur le marché des protéines recombinantes thérapeutiques puisque les deux tiers des biomolécules approuvées par la FDA entre 1996 et 2000 sont produites par des systèmes mettant en œuvre des cellules de mammifères (Chu et

Bibliographie

Robinson, 2001). Ces cellules sont effet dotées de capacités de glycosylation très proches de celles des cellules humaines, et même si certaines différences de structure persistent, elles permettent d'étendre très sensiblement le champ d'application de cette technologie à d'autres molécules à usage thérapeutique, notamment les glycoprotéines humaines telles que l'EPO ou le facteur VIII comme nous l'avons vu précédemment. Le gène d'intérêt peut être introduit dans le génome cellulaire grâce à plusieurs types de vecteurs d'expression, basés par exemple, sur l'utilisation d'éléments des virus SV40 (*Simian Virus 40*) et CMV (*Cytomegalovirus*), et peut alors être amplifié, en particulier, par le système DHFR (Dihydrofolate reductase). La lignée CHO se prête relativement bien à la culture de masse en bioréacteurs et les protéines produites sont en général sécrétées dans le milieu extracellulaire, mais ses performances sont très inférieures aux deux systèmes de production précédents. Les cellules animales ne sont en effet pas aussi faciles d'utilisation que les bactéries ou les levures; elles sont plus fragiles, les milieux de cultures, plus coûteux, et les taux d'expression, beaucoup plus faibles, de l'ordre de 10 mg/L (voire 100 mg/L dans certains systèmes expérimentaux optimisés). L'optimisation de ce type de système est en outre plus délicate et la durée de développement entre la mise au point du vecteur d'expression et la production à grande échelle de la protéine est par conséquent beaucoup plus longue.

Par ailleurs, il convient de mentionner également l'importance du système particulier que sont les hybridomes, résultant de la fusion d'une lignée lymphoblastoïde humaine et d'une lignée murine, et permettant de produire spécifiquement des anticorps monoclonaux à des taux très élevés (plusieurs centaines de mg/L). Ceux-ci sont en effet utilisés très largement en recherche comme outils de détection, en médecine pour le diagnostic mais aussi, et de plus en plus, en thérapie (Gavilondo et Larrick, 2000), comme par exemple, l'anticorps OKT3, produit depuis 1986 par ce système d'hybridomes (Damm, 1995). Cependant, ces anticorps monoclonaux d'origine murine se révèlent souvent fortement immunogènes lorsqu'ils sont l'objet d'administrations *in vivo* répétées (Khanzaei *et al.*, 1994), ce qui explique que les anticorps développés dans un but thérapeutique sont des molécules "chimériques" dont les régions constantes d'origine murine ont été remplacées par leurs homologues humaines (Ryu et Nam, 2000); la tendance actuelle étant même de synthétiser des anticorps complètement humains ("humanisés"). Les systèmes de production de ces nouveaux types d'anticorps ont donc également évolué, et les cellules de mammifères (CHO et NSO), et dans une moindre mesure, les animaux et plantes transgéniques (chèvre, tabac) sont aujourd'hui les systèmes les plus utilisés. Ainsi, aussi bien en oncologie que dans le traitement des maladies inflammatoires et cardiovasculaires, les applications médicales

des anticorps sont actuellement en pleine extension (Chadd et Chamow, 2001); ils représentent plus de 20% des biomolécules pharmaceutiques en cours de développement clinique, et leur marché devrait atteindre 5 milliards de dollars en 2005 (Larrick *et al.*, 2001).

1.2. Les nouveaux systèmes de production

En plus de ces principaux systèmes, de nombreux autres modèles ont été proposés, mais sans toujours donner lieu à la production industrielle de produits thérapeutiques, principalement parce que la génétique et le métabolisme des cellules employées demeurent encore moins bien maîtrisés.

Ainsi, la levure *Pichia pastoris* possède les avantages de sécréter beaucoup plus facilement les protéines hétérologues que *S. cerevisiae*, de conférer une glycosylation de meilleure qualité (moins riche en résidus mannose), de pouvoir se développer à haute densité sur le milieu très économique qu'est le méthanol, de convertir jusqu'à 40% de son poids en protéines, et d'être génétiquement stable du fait de l'intégration du gène d'intérêt à son génome. Par exemple, un fragment d'anticorps (chaîne simple Fv) a pu être sécrété sous forme soluble dans le surnageant de culture de *P. pastoris* à un taux de plus de 100 mg/L (Ridder *et al.*, 1995). Et en dépit d'une glycosylation encore peu compatible avec l'activité de certaines glycoprotéines, cette levure s'est cependant montrée capable de produire le t-PA sous forme biologiquement active à des taux largement supérieurs à ceux obtenus par cellules animales et à un coût très inférieur (Dodet, 1990).

Un autre système qui s'est fortement développé ces dernières années, consiste à infecter des cellules d'insecte, les plus couramment utilisées étant celles de *Spodoptera frugiperda* (*Sf9* et *Sf21*), par un baculovirus recombiné. Les taux d'expression obtenus avec cette technique sont généralement bien plus élevés qu'avec les cellules de mammifères, et la maturation des protéines sécrétées est nettement meilleure qu'avec les levures (glycosylation conséquente, ponts disulfure, phosphorylation), mais l'absence de certaines structures, de sialylation sur les résidus Gal terminaux en particulier, peut cependant rester un obstacle pour la production de certaines glycoprotéines thérapeutiques (Marchal *et al.*, 2001). En outre, le mode d'expression transitoire qu'implique ce système, ainsi que le temps nécessaire à la préparation de stocks viraux concentrés sont des facteurs pénalisants supplémentaires (Qiu, 1998).

Bibliographie

De façon plus anecdotique, des insectes entiers, des larves de vers à soie notamment, ont également été utilisés comme "bioréacteurs" après infection par un baculovirus pour la synthèse de l'interféron- α (IFN- α), de l'interleukine-3 (IL-3) de souris ou d'un vaccin antigrippal (Dodet, 1990).

Par ailleurs, la culture de cellules végétales (tabac, pomme de terre, maïs) a fait l'objet de quelques études dans le but de produire des protéines recombinantes, principalement des anticorps, mais le nombre d'applications reste encore assez limité même si de nombreuses espèces végétales (riz, *Taxus*) ont fait l'objet de travaux concernant la production par culture cellulaire de métabolites secondaires, tels que la vincristine ou la vinblastine, utilisées en thérapeutique en tant qu'agents anti-cancéreux. En effet, les taux de croissance cellulaire et de production protéique demeurent relativement faibles (Fischer *et al.*, 1999) et les capacités de maturation post-traductionnelle, quoique permettant la synthèse de molécules complexes, génèrent des différences structurales sensibles par rapport aux molécules humaines naturelles. La glycosylation présente notamment des chaînes de type oligo-mannosidique ainsi que des résidus β 1,2 xylose et α 1,3 fucose potentiellement immunogènes chez l'Homme (Larrick *et al.*, 2001), et l'absence de sialylation est également susceptible de réduire l'activité biologique de la protéine en accélérant son élimination au niveau hépatique (Peeters *et al.*, 2001). Cependant, l'introduction de séquences "signal" particulières dans le vecteur d'expression permet d'obtenir la sécrétion des protéines dans le milieu de culture ou leur synthèse dans des compartiments subcellulaires intéressants (réticulum endoplasmique, chloroplastes, vacuoles, membranes). Il faut noter que l'extraction de la protéine d'intérêt peut ensuite entraîner un relargage de composés phénoliques et de protéases si les cellules sont broyées mécaniquement; la digestion enzymatique douce de la paroi cellulaire ou la sonication peuvent s'avérer préférables pour améliorer la qualité de la purification (Fischer *et al.*, 1999).

Concernant les autres types de cellules de mammifères utilisés en tant que système d'expression de protéines recombinantes, les cellules de rein de hamster syrien BHK (baby hamster kidney) et les cellules de myélome de souris NSO et Sp2/0 ont également donné lieu à la commercialisation de protéines thérapeutiques (Chu et Robinson, 2001).

Afin d'améliorer encore la maturation post-traductionnelle des protéines synthétisées, certaines cellules humaines sont aussi à l'étude, en particulier, des lignées lymphoblastoïdes (Namalwa ou

Bibliographie

RPMI 1788), mais leur plus grande fragilité limite la culture de masse et les rendements de production restent encore assez faibles. Les travaux sur les cellules embryonnaires de rein (human embryonic kidney) HEK 293 ont principalement concerné l'expression transitoire de protéines d'intérêt après infection par un adénovirus recombinant, permettant d'atteindre des taux d'expression plus importants (Garnier *et al.*, 1994). Dans le but de produire directement la protéine *in vivo*, l'infection d'animaux a aussi été réalisée dans le cadre d'essais préliminaires de thérapie génique (Osada *et al.*, 1999). Ce système HEK 293 / adénovirus constitue en outre un outil intéressant pour la production de virus d'intérêt thérapeutique pour cette application. Les cellules humaines PER.C6, qui sont également déjà largement utilisées dans le cadre de la production de vecteurs adénoviraux pour la thérapie génique, sont actuellement à l'étude en vue de la production de protéines recombinantes à grande échelle tels que les anticorps monoclonaux (Jones *et al.*, 2003).

Les plantes entières recombinantes ou "transgéniques" font également l'objet de plusieurs travaux concernant la synthèse de protéines recombinantes car elles pourraient constituer un système très économique pour la production à grande échelle de molécules dont la glycosylation n'est pas fondamentale pour l'activité biologique. En effet, les coûts d'une production agricole sont quasiment négligeables par rapport à ceux qu'impliquent une fermentation; en outre, un stockage simple et stable est également possible grâce à de nouveaux promoteurs permettant de cibler l'expression des protéines transgéniques dans des tissus spécifiques de la plante (graines, par exemple); et enfin, les végétaux ne sont pas des hôtes potentiels pour les agents pathogènes humains et animaux (prions, HIV...), ce qui réduit considérablement les procédures de purification et d'assurance de la qualité particulièrement lourdes pour les produits à but thérapeutique (Fischer *et al.*, 1999 - Peeters *et al.*, 2001). Plusieurs inconvénients peuvent cependant limiter le développement des plantes transgéniques, en particulier, la propagation dans l'environnement de végétaux génétiquement modifiés fait actuellement l'objet de grandes controverses, et les quelques différences de maturation post-traductionnelle entre cellules végétales et humaines peuvent rendre les protéines ainsi synthétisées potentiellement immunogènes ou nuire à leur activité *in vivo*. Il faut cependant souligner qu'en ce qui concerne l'anticorps de type IgA CaroRx™, produit dans du tabac transgénique (Ma *et al.*, 1995) et développé à des fins thérapeutiques pour l'immunisation locale contre *Streptomyces mutans* en prévention de l'apparition de caries dentaires, aucune réaction immunogène n'a été détectée au cours des essais cliniques de phase II dont il a fait l'objet (Larrick *et al.*, 2001). En outre, plusieurs tentatives d'humanisation des capacités de glycosylation de plantes transgéniques sont

Bibliographie

également en cours, ciblant soit la rétention de la glycoprotéine dans le réticulum endoplasmique, soit l'inhibition de glycosyltransférases endogènes de l'appareil de Golgi ou au contraire, l'ajout de glycosyltransférases humaines (Lerouge *et al.*, 2000).

Outils d'exploration du fonctionnement des gènes, les animaux transgéniques peuvent aussi constituer des bioréacteurs vivants pour la production de protéines recombinantes. Ce système permet d'obtenir à grande échelle des molécules de grande taille et correctement maturées (Clark, 1998). Des brebis par exemple, ont ainsi été génétiquement modifiées dans le but de produire dans leur lait différentes protéines, telles que l' α -1-antitrypsine ou le facteur IX de la coagulation (Schnieke *et al.*, 1997). Le laboratoire d'origine écossaise PPL Therapeutics, spécialisé dans les techniques de clonage animal et de transgénèse, a d'ailleurs entrepris le développement clinique de l' α -1-antitrypsine ainsi produite, les essais de phase II étant en cours pour le traitement de la fibrose kystique pulmonaire (Tebbutt, 2000). La purification des protéines à partir du lait est généralement assez aisée, et des taux de plusieurs grammes par litre peuvent être obtenus (Pollock *et al.*, 1999), mais le coût d'élevage des animaux, leur vitesse de reproduction et la quantité de lait produite, ne sont pas des critères toujours conciliables avec les impératifs économiques d'une production industrielle. La souris est un excellent modèle de laboratoire car les taux d'expression y sont très élevés (Houdebine, 1995) mais l'extrapolation à plus grande échelle est rapidement limitée par la très faible quantité de lait produite par cet animal. Le lapin a également fait l'objet de plusieurs travaux de transgénèse (Coulibały *et al.*, 1999) mais le processus de lactation est également assez limité et son coût d'élevage important. Par contre, la chèvre présente plusieurs atouts pour la production de masse de protéines recombinantes car elle peut en effet produire jusqu'à 1000 litres de lait par période de lactation (300 jours environ), les taux d'expression peuvent atteindre 1 à 5 g/L, et la durée nécessaire à la génération d'une chèvre transgénique (temps de gestation, de croissance jusqu'à maturité sexuelle, et de nouvelle gestation) n'est que de 18 mois, contre environ 3 ans en ce qui concerne la vache (Pollock *et al.*, 1999). En plus de ces diverses contraintes liées à l'animal hôte, l'expression du transgène reste relativement aléatoire, et comparés à d'autres systèmes, les risques de contamination par des agents pathogènes tels que les prions demeurent assez préoccupants même si le développement récent de tests très sensibles permettent de les réduire fortement (Houdebine, 2000).

De nombreux facteurs interviennent donc dans le choix d'un système de production d'une protéine recombinante, mais, en ce qui concerne les glycoprotéines d'intérêt thérapeutique, il s'avère que les cellules CHO représentent généralement le meilleur compromis entre qualité, sécurité et coût.

1.3. Les cellules CHO

La lignée CHO a été établie en 1957 par Puck *et al.* à partir de fibroblastes d'ovaire de hamster chinois. En 1980, Urlaub et Chasin ont construit une lignée n'exprimant pas le gène de l'enzyme dihydrofolate réductase (dhfr), particulièrement utilisée actuellement dans le but d'obtenir une amplification très importante du gène d'intérêt. En effet, l'introduction du gène dhfr dans le vecteur d'expression porteur du gène d'intérêt permet ensuite la sélection et l'amplification de cellules ayant incorporé un grand nombre de copies du vecteur. Ajouté au milieu de culture, le méthotrexate, inhibiteur de la dhfr, empêche les cellules de croître en leur interdisant la synthèse de nucléotides dATP, dGTP et dTTP. Cependant, quand le nombre de copies du gène dhfr est élevé, l'enzyme est produite en quantité suffisante pour saturer le méthotrexate; par conséquent, seules les cellules ayant un grand nombre de copies du gène dhfr, et donc aussi du gène d'intérêt, pourront se développer. Cette étape d'amplification est réalisée sur plusieurs semaines en utilisant des concentrations croissantes de méthotrexate dans le milieu de culture. Ainsi, l'intégration de 150 copies d'un vecteur t-PA/DHFR dans les chromosomes de cellules CHO a pu être obtenue sous pression de sélection au méthotrexate, conduisant à la production de 10 mg/L de t-PA après amplification; l'optimisation du milieu de culture a ensuite permis d'atteindre 50 mg/L; le taux de production a encore été amélioré en culture semi-continue après modélisation métabolique de la consommation des acides aminés à l'état d'équilibre, et 200 mg/L de t-PA ont finalement pu être obtenus (Lucas *et al.*, 1996).

D'autres systèmes de sélection/amplification ont également été développés pour l'expression dans les cellules CHO. Suivant un principe similaire au précédent, le système GS met en œuvre la glutamine synthétase, nécessaire à la synthèse intracellulaire de glutamine, pour amplifier le nombre de copies du vecteur par l'ajout au milieu de culture d'un inhibiteur de cette enzyme, la méthionine sulfoximine (Hodgson, 1993). Le système NEO utilise quant à lui, la néomycine phosphotransférase et son inhibiteur, l'antibiotique G418 (néomycine) (Werner *et al.*, 1998).

2. Les différents procédés de culture des cellules de mammifères

2.1. Les conditions de culture

Comparée à d'autres systèmes de production, la culture de cellules de mammifères est très exigeante, tant en ce qui concerne la précision des conditions opératoires à maintenir, qu'en raison de la spécificité du matériel nécessaire. En effet, ce type de cellules est particulièrement sensible aux variations, même faibles, de nombreux paramètres de culture, et leur contrôle représente un élément essentiel à l'obtention d'une croissance cellulaire et d'une production protéique optimales, le rendement de ces procédés étant très dépendant de ces deux facteurs.

2.1.1. Les conditions opératoires de culture

L'oxygénation suffisante des cellules est, bien entendu, un facteur indispensable à l'obtention d'une croissance optimale en permettant une respiration cellulaire maximale. Les échanges gazeux à l'interface air-liquide entre l'air environnant et le milieu de culture sont assez limités mais permettent cependant d'assurer un apport d'oxygène acceptable pour les cultures de petits volumes. Par contre, l'optimisation des procédés à l'échelle du bioréacteur nécessite la mise en place d'un dispositif supplémentaire (diffuseur fritté, tube poreux en silicone) pour accroître la capacité d'aération du système, ainsi que le contrôle rigoureux de l'oxygène dissous dans le milieu. La valeur de consigne est généralement fixée entre 20% et 80% car une oxygénation excessive conduit à la production de peroxyde toxique pour la cellule.

La température optimale de croissance des cellules de mammifères est généralement de 37°C, des écarts de l'ordre de 1°C pouvant provoquer des changements métaboliques indésirables tels que le ralentissement de la croissance ou la production de protéines de choc thermique (Kurano *et al.*, 1990a ; Jenkins et Hovey, 1993). Cependant, croissance et production peuvent parfois nécessiter des conditions optimales différentes, et un changement de température en fin de phase de croissance peut alors permettre d'améliorer le facteur production, comme c'est le cas pour les systèmes d'expression thermo-inductibles (Jenkins et Hovey, 1993).

Bibliographie

Le pH du milieu de culture nécessite également un contrôle précis afin de le maintenir autour de valeurs proches de 7.2 ou 7.4. En effet, le milieu a tendance à se basifier en début de culture et surtout à s'acidifier fortement ensuite en raison de la production d'acide lactique par les cellules après métabolisation du glucose. Ainsi, des systèmes de régulation, tels que le système tampon $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ à petite échelle, et l'ajout de soude ou de CO_2 en bioréacteur permettent d'éviter des écarts de plus de 0.1 unités pH susceptibles de ralentir la croissance cellulaire et la production protéique (Cherlet, 1995).

Pour les systèmes de culture en suspension dont nous reparlerons plus en détail dans le paragraphe 2.2, la vitesse d'agitation (en bout de pale) représente également un paramètre important dans l'optimisation du procédé. En effet, l'homogénéisation constante de la composition du milieu de culture permet d'améliorer significativement la disponibilité en oxygène et en nutriments dans l'environnement immédiat des cellules tout en y diminuant la concentration des déchets qu'elles rejettent. Par contre, une agitation trop forte peut provoquer la lyse des cellules.

2.1.2. La composition du milieu de culture

Comparées à d'autres types de système de production, les cellules animales nécessitent un milieu de culture complexe et donc coûteux. Ainsi, les principaux milieux de base commerciaux (α MEM, RPMI, DMEM...) contiennent une source carbonée, des acides aminés, des vitamines, plusieurs sels minéraux, un tampon et un indicateur pH. Ils sont habituellement supplémentés par divers constituants en fonction de la lignée cellulaire utilisée afin de répondre plus spécifiquement à ses besoins.

Le glucose (généralement compris entre 1 et 5 g/L) représente le plus souvent la source d'énergie principale mais peut être remplacé par d'autres glucides, tels que le fructose, le maltose ou le galactose (Dardenne, 1995 et Wagner, 1990) pour limiter la production d'acide lactique.

La glutamine (classiquement comprise entre 2 et 4 mM) constitue la seconde source énergétique avec le glucose; elle est également utilisée comme source d'azote pour la synthèse des protéines et des acides nucléiques (transaminations,...).

Bibliographie

La plupart des acides aminés dits "essentiels" selon Eagle en 1955 (méthionine, phénylalanine, tryptophane, thréonine, lysine, valine, leucine et isoleucine) sont également des éléments indispensables à la croissance des cellules de mammifères et plusieurs autres peuvent également apporter un effet bénéfique (arginine, acide glutamique, cystéine, histidine, tyrosine...).

Les nombreux ions minéraux intervenant dans le métabolisme cellulaire (calcium, sodium, potassium, magnésium, phosphate,...) doivent être présents dans le milieu de culture; ils participent en outre à y maintenir le pH et l'osmolarité à des valeurs souhaitées.

Plusieurs vitamines (acide folique, choline, nicotinamide, inositol, pantothénate, pyridoxal, riboflavine, thiamine et biotine) représentent des cofacteurs enzymatiques essentiels pour les cellules. Si leur concentration est trop faible dans le milieu de culture, elles peuvent être à l'origine de limitations au niveau de la croissance cellulaire (Kurano *et al.*, 1990b).

De plus, les milieux de culture pour cellules animales sont classiquement supplémentés par du sérum de veau fœtal (jusqu'à 5 à 20%_{v/v}), riche en une grande diversité de substances impliquées dans la physiologie cellulaire tels que des facteurs de croissance (EGF, PDGF) ou d'adhérence, des vitamines (rôle de cofacteurs), des hormones (insuline, estrogènes, stéroïdes, somatostatine, prolactine), des lipides (pour la synthèse des membranes), des nucléotides, des ions (sélénium), de l'albumine et de la transferrine (rôle de transporteurs), du collagène, de la putrescine, du pyruvate, des acides aminés, des sucres, etc... (Barnes, 1987 ; Froud, 1999).

Cependant, les contraintes industrielles conduisent de plus en plus souvent à l'utilisation de milieux sans sérum, voire sans protéine (Zang *et al.*, 1995). Ces milieux de composition parfaitement définie, doivent pouvoir apporter également des constituants de même nature ou des molécules plus simples capables de s'y substituer (peptides, acides gras...) (Mather *et al.*, 1997). Pour cela, il a été nécessaire d'identifier précisément les différentes substances présentes dans le sérum, ainsi que leurs fonctions respectives, ceci malgré la variabilité et la complexité de composition de ce celui-ci. En outre, les interactions intervenant entre ses différents composants sont nombreuses, et l'activité du sérum résulte davantage de la synergie d'action de plusieurs d'entre-eux que de l'action particulière de l'un ou de l'autre. Les proportions relatives des différentes molécules de substitution doivent donc faire également l'objet d'études spécifiques pour déterminer des conditions de croissance optimale. De plus, la physiologie de chaque lignée

Bibliographie

cellulaire présente des particularités, ce qui induit des besoins nutritionnels qui lui sont propres. Cependant, certaines molécules telles l'albumine (pour son activité de protection et de transport de lipides, d'hormones et de sels minéraux) l'insuline (pour son rôle dans la synthèse du glycogène et des acides gras), la transferrine (pour sa fonction dans le transport du fer) se révèlent nécessaires à la croissance de la plupart des cellules (Barnes, 1987). En règle générale, les milieux de culture de base sont donc supplémentés par des substances stimulant la croissance cellulaire telles que l'insuline, le glucagon, l'hormone de croissance, l'hydrocortisone ou la testostérone, ainsi que par des facteurs de croissance de nature peptidique comme les prostaglandines (E1 et E2), l'EGF (facteur de croissance épidermique) ou le FGF (facteur de croissance fibroblastique). Des protéines de transport sont également toujours apportées. Le plus souvent, il s'agit de la transferrine, de l'albumine ou de l' α -2 macroglobuline (qui a un rôle particulier dans le transport de l'hormone de croissance et de l'insuline). Des protéines d'adhésion cellulaire (fibronectine, collagène ou SSF : serum spreading factor), des enzymes extracellulaires (catalase ou thrombine), des inhibiteurs de protéases, des vitamines (acide ascorbique, α -tocophérol, rétinol) et des lipides (acide linoléique) s'avèrent utiles pour la croissance de certaines lignées. Enfin, plusieurs nutriments de faible poids moléculaire tels que la putrescine (pour son rôle dans la division cellulaire) et des sels minéraux (Na_2SeO_3 , FeSO_4) se révèlent souvent indispensables à l'état de traces (Hata *et al.*, 1992).

Ainsi, une analyse métabolique approfondie est généralement nécessaire pour concevoir un milieu sans sérum permettant de conserver les performances de croissance et de production atteintes en présence de sérum (Buntemeyer *et al.*, 1991; Hewlett, 1991; Castro *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 2001). Conduisant à l'optimisation de la composition du milieu de culture, une telle étude des besoins spécifiques d'une lignée particulière peut même permettre d'atteindre des taux de production de protéines plus élevés qu'avec un milieu contenant du sérum (Lambert et Merten, 1996), ainsi que la sélection et la propagation de types cellulaires incapables de se développer dans les milieux traditionnels (enrichis en sérum) car ces derniers peuvent se trouver limités en certaines substances indispensables ou contenir des facteurs inhibant la croissance cellulaire (Barnes, 1987).

Toutefois, l'adaptation d'une lignée cellulaire à un milieu sans sérum peut également être entreprise sans ce type d'étude au préalable. Généralement, l'adaptation requiert alors une durée d'"habitation" d'un ou plusieurs mois. L'adaptation se réalise probablement par mutations successives, ayant pour effet l'augmentation de la synthèse endogène de facteurs de croissance, ou par l'activation de gènes qui étaient réprimés en présence de sérum (Morrow, 1998). Plusieurs stratégies peuvent être employées, la plus courante consiste à réduire progressivement la teneur

du sérum dans le milieu de culture (Sinacore *et al.*, 1996). Cette méthode est la plus longue mais peut s'appliquer à la majorité des lignées cellulaires. Il est également possible d'essayer d'éliminer "brutalement" le sérum du milieu en travaillant simultanément avec de multiples mini-cultures, sur des plaques de 96 puitsensemencées à raison de 100 cellules par puits, et en continuant ensuite sur des systèmes plus grands (Yamauchi *et al.*, 1992). Une autre technique, dite "stœchiométrique", propose d'adapter la composition du milieu selon une équation modélisant théoriquement la croissance cellulaire (Xie et Wang, 1994) : elle permet ainsi de limiter la production des métabolites toxiques en maintenant constante et faible la concentration des nutriments. Cette technique a été utilisée avec succès à des cultures semi-continues de cellules CHO pour la production d'IFN- γ (Xie *et al.*, 1997).

2.2. Culture de cellules adhérentes et culture de cellules en suspension

De nombreuses lignées cellulaires ont été générées à partir de cellules extraites de tissus (rein, ovaire,...) dans lesquels les cellules sont au contact les unes aux autres, chacune constituant un support pour ses voisines. En culture *in vitro* également, ces lignées ont naturellement besoin d'adhérer à un support pour se développer, celui-ci pouvant être la paroi du flacon de culture (culture statique), celle de petites billes spécialement ajoutées à cet effet (micro- ou macro-porteurs) ou même d'autres cellules (agrégats). A grande échelle, la culture de cellules dites "adhérentes" présente l'inconvénient majeur de limiter l'espace disponible pour la propagation cellulaire à la surface de ces systèmes et donc, de ne pas en optimiser le volume total.

Afin de remédier à ce problème, une procédure d'adaptation à la culture en suspension est généralement entreprise, et les cellules acquièrent ainsi progressivement la capacité de se développer librement dans le milieu. Les micro-environnements et les phénomènes de limitations diffusionnelles s'en trouvent réduits aux seules zones dans lesquelles l'agitation ne permet pas l'homogénéisation suffisante du milieu de culture en raison de la fragilité sensiblement accrue des cellules libres vis à vis des contraintes de cisaillement (cas des systèmes à grande échelle uniquement).

A petite échelle, les cultures statiques sont effectuées dans des flacons de Roux ("T-flask") et les cultures agitées en fioles d'Erlenmeyer ou en flacon agité ("spinner").

2.3. Les différents modes de culture à grande échelle

Les systèmes utilisés pour la culture à grande échelle sont des bioréacteurs pouvant fonctionner en mode discontinu, semi-continu ou continu/perfusé.

En mode discontinu ("batch"), le système est fermé (hormis l'oxygénation et la régulation de pH) et aucun ajout ni soutirage de milieu de culture n'est effectué. La phase de croissance cellulaire dure généralement de 3 à 5 jours, jusqu'à ce qu'un ou plusieurs nutriments se trouvent épuisés, ou que des métabolites toxiques se soient excessivement accumulés dans le milieu de culture.

L'ajout de milieu en cours de culture, en continu ou par paliers, sans soutirage, permet aux procédés semi-continus ("fed-batch") de prolonger la phase de croissance cellulaire et donc d'augmenter la biomasse produisant la protéine d'intérêt.

Les cultures en mode continu sont principalement mises en œuvre en réacteurs perfusés industriellement : l'ajout de milieu frais et le soutirage de milieu ancien se font au même débit, le volume de culture restant constant, et les cellules sont retenues à l'intérieur du système par un dispositif de filtration, de décantation ou de centrifugation, ce qui permet d'utiliser des taux de dilution élevés (supérieurs à la vitesse maximale de croissance des cellules) et d'atteindre ainsi de hautes densités cellulaires (Griffiths *et al.*, 1992).

La configuration simple du réacteur agité s'est affirmée comme la technologie de choix dans l'industrie. Par contre, le mode traditionnel de fonctionnement discontinu laisse progressivement place à des systèmes plus performants sur le plan de la productivité volumique. Les procédés semi-continus et continus permettent en effet d'optimiser l'alimentation en nutriments, de réduire l'accumulation des déchets toxiques dans le milieu, et d'atteindre ainsi des densités cellulaires et des productions protéiques plus élevées (Chu et Robinson, 2001). En particulier, le réacteur perfusé est devenu le système le plus communément utilisé pour la production de protéines à grande échelle. La rétention des cellules représente un élément crucial pour la productivité de ce procédé; les dispositifs les plus employés sont les filtres rotatifs ("spin filters") internes ou externes, les fibres creuses, les centrifugeuses et les décanteurs gravitationnels ou acoustiques (à ultrasons) (Hu et Aunins, 1997).

Bibliographie

Malgré les avantages que présentent les procédés de culture en suspension quant à leur extrapolation à grande échelle, l'adaptation des cellules à ce type de culture s'avère difficile dans certains cas, et plusieurs systèmes de configuration généralement assez simple sont actuellement utilisés dans l'industrie pour la culture de cellules adhérentes. Ainsi, l'EPO est produite en flacons roulants ("roller bottles") par Amgen depuis 1989. Comparé à la culture purement statique, ce procédé permet d'améliorer l'homogénéisation du milieu au contact des cellules, d'augmenter la surface disponible pour les cellules dans un volume donné et de limiter les opérations lors du passage des cellules. Par ailleurs, des systèmes à plateaux multi-couches ("Costar cellcubes" et "Nunc cell factories"), notamment utilisés pour la production de virus inactivés (vaccin anti-hépatite A) par Merck, permettent d'optimiser le rapport surface sur volume disponible et par conséquent d'augmenter la densité cellulaire à l'intérieur du système (Chu et Robinson, 2001).

La culture de cellules adhérentes à grande échelle peut également être réalisée sur microporteurs en réacteur agité (jusqu'à 10 000 L). Plusieurs inconvénients nuisent encore au développement de ce type de système (génération de micro-environnements, toxicité potentielle des billes), mais il a été montré récemment que le transfert direct des cellules entre microporteurs était possible, ce qui permettrait d'éviter l'étape très contraignante de trypsination et faciliterait considérablement la procédure d'amplification des cellules (Hu *et al.*, 2000).

Mais, bien entendu, les procédés de culture de cellules en suspension s'avèrent préférables pour les applications à grande échelle quand il est possible d'adapter la lignée sans baisse significative des capacités de croissance cellulaire, de la production ou de qualité protéique. L'homogénéité et l'extrapolation du système à l'échelle industrielle s'en trouvent grandement améliorée. En outre, les paramètres critiques de ce type de procédé sont de mieux en mieux identifiés, ce qui permet la mise au point de procédures de validation plus fiables concernant le procédé de production en lui-même, mais aussi la qualité du produit synthétisé (Schenerman *et al.*, 1999 et Moran *et al.*, 2000). Ainsi, il est important de souligner que des résultats très similaires ont été rapportés pour des cultures en suspension de 3 à 10 000 L (Moran *et al.*, 2000).

Un autre élément d'importance dans le choix du type de réacteur est la durée requise par le développement du procédé à grande échelle : ainsi, l'extrapolation des systèmes aussi simples que les cultures en flacons roulants pourra être très rapide, alors que le développement et la validation de procédés continus pouvant durer plusieurs mois demandera un temps nettement plus long (Birch et Froud, 1994).

2.4. Les grandes tendances industrielles

Les différentes contraintes industrielles, d'ordre financier ou réglementaire, imposent la mise au point de procédés de plus en plus productifs mais aussi de mieux en mieux contrôlés. Ces deux éléments sont à l'origine du développement du système simple et performant que représente la culture en réacteur agité de cellules en suspension, notamment dans sa configuration perfusée. De même, la généralisation des milieux de culture sans sérum répond également à ces deux impératifs.

Dans le but de suivre les réglementations sans cesse plus exigeantes, et d'améliorer encore la rentabilité des procédés, un certain nombre de questions concentrent actuellement les efforts de recherche. Ainsi, par exemple, des progrès ont été récemment réalisés concernant les limitations en oxygène engendrées par les cultures en grand volume (Dutton, 2000 et Cacciuttolo *et al.*, 1998). D'autre part, des milieux de culture sans protéine ou à base d'hydrolysats végétaux ont été mis au point afin d'éliminer toute substance d'origine animale (Inoue *et al.*, 1996 ; Zang *et al.*, 1995 ; Keen et Rapson, 1995). L'optimisation de l'alimentation en nutriments a également permis de vérifier l'intérêt d'une supplémentation spécifique de la lignée cellulaire hôte et de composition adaptée à chaque phase de la culture (Werner, 1998). En outre, les problèmes de contaminations, par virus ou prions bien entendu, mais également celles résultant de mauvaises conditions de production, ne sont pas encore clairement résolus; le contrôle du taux de CO₂ dissous se révèle également d'actualité en raison du succès des systèmes de micro-aération par oxygène pur, limitant les dégradations cellulaires liées au contact avec les bulles mais entraînant aussi l'accumulation du CO₂ dans le milieu (Pattison *et al.*, 2000). Enfin, de nombreux travaux soulignent de plus en plus l'influence que peuvent avoir les conditions de culture sur la structure de la protéine synthétisée, notamment en ce qui concerne l'état physiologique des cellules (taux de croissance) ou la composition du milieu (accumulation des ions NH₄⁺) (Andersen *et al.*, 2000), et une attention grandissante est désormais portée sur la qualité de la protéine dans les études d'optimisation des procédés.

II. La glycosylation des protéines recombinantes produites par cellules de mammifères

1. Structure et mécanisme de synthèse

A la différence des simples protéines définies par un enchaînement particulier d'acides aminés précisément déterminé par une séquence d'ADN, les glycoprotéines se présentent sous forme d'une population variée de "glycoformes" constituées d'une même chaîne polypeptidique sur laquelle sont fixées différentes structures glycaniques (ou oligosaccharidiques). Cette diversité de structure résulte des multiples modifications post-traductionnelles que subit la protéine après sa biosynthèse dans les ribosomes. Ainsi, une même glycoprotéine pourra présenter des chaînes glycaniques très variées en fonction de l'équipement enzymatique et de l'état physiologique de la cellule qui la produira.

La fraction glycanique peut représenter de 5 à 85% du poids de la molécule (Meynal-Salles et Combes, 1996). Les oligosaccharides sont fixés sur la chaîne peptidique au niveau de sites de glycosylation particuliers et sont classés en deux catégories selon la nature de cette liaison : de type "O", ils peuvent être fixés sur différents acides aminés tels que la sérine et la thréonine, ou de type "N", ils sont alors liés à un résidu asparagine (compris dans une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr). Les deux types de liaisons peuvent se retrouver sur une même molécule.

Conférant de nombreuses fonctions aux glycoprotéines recombinantes, les N-glycannes ont fait l'objet d'études plus systématiques que les oligosaccharides liés en O dont la structure et le rôle paraissent moins homogènes. Ainsi, les N-glycannes sont caractérisés par un "noyau" pentasaccharidique commun ($\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$) sur lequel sont fixées différents types d'"antennes" pouvant posséder des sucres "périphériques" à leurs extrémités (un fucose en position proximale, ou un acide sialique en position terminale, par exemple). Les antennes, au nombre de deux à quatre (voire cinq parfois), présentent généralement trois types de structure : oligo-mannosidique (ou "high-mannose"), complexe (ou "N-acétyllactosaminique") ou hybride (Elbein, 1991 ; Cumming, 1992 ; Kobata, 1992 ; Montreuil, 1993 ; Wyss et Wagner, 1996) (Figure 2).

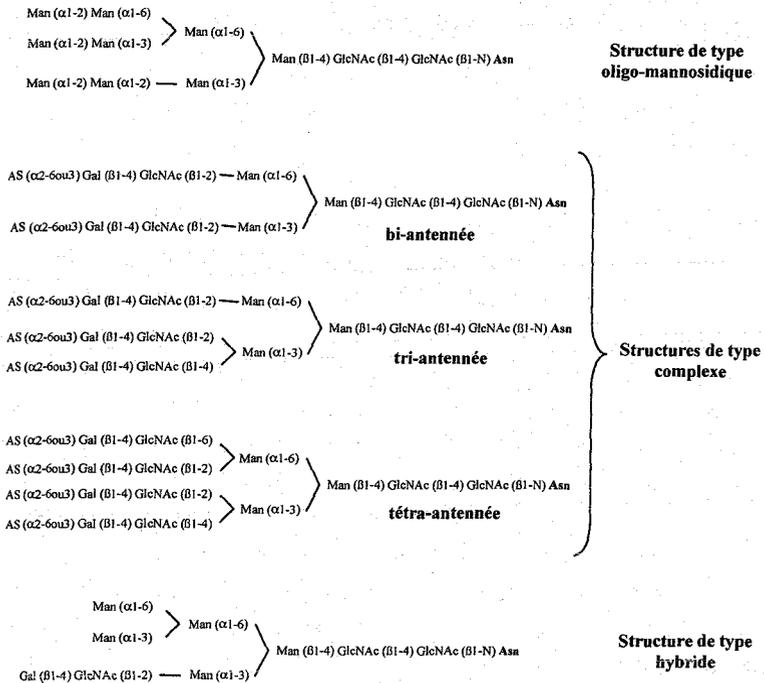


Figure 2 : Les trois types principaux de structures de N-glycannes pouvant être retrouvées sur les protéines recombinantes : oligo-mannosidique, complexe et hybride (Man : mannose ; Gal : galactose ; GlcNAc : N-acétylglucosamine ; AS : acide sialique ; Asn : asparagine).

La nature de la cellule dans laquelle est synthétisée la glycoprotéine détermine grandement le type des structures glycaniques qui pourront être associées à la chaîne polypeptidique (Parek *et al.*, 1989a ; Kobata, 1992). Ainsi, la plupart des cellules de mammifères sont capables d'assembler des oligosaccharides complexes tandis que les capacités de glycosylation des levures se limitent principalement à l'ajout de chaînes oligo-mannosidiques (Elbein, 1991 ; Drickamer et Taylor, 1998).

Bibliographie

En outre, les sites de glycosylation d'une même protéine présentent souvent des motifs glycaniques différents, comme c'est le cas pour le t-PA ou l'EPO par exemple (Opdenakker *et al.*, 1993 ; Parek *et al.*, 1989a). D'autre part, une occupation hétérogène des différents sites de glycosylation de certaines glycoprotéines (IFN- γ , t-PA) peut également être observée (Lamotte, 1997 ; Parek *et al.*, 1989a).

Cette grande diversité de structures implique un contrôle multiple et complexe des différentes réactions enzymatiques de glycosylation, catalysées chacune par une glycosyltransférase étroitement spécifique d'un donneur, d'un accepteur et d'un type de liaison précis. Le nombre de glycosyltransférases (glucosidases, mannosidases, N-acétylglucosaminotransférases, galactosyltransférases, sialyltransférases, etc...) nécessaires à la synthèse des différents motifs de glycosylation rencontrés sur les glycoprotéines et glycolipides des cellules de mammifères est estimé à plus de 250 (Paulson et Colley, 1989). Bien qu'il n'existe qu'une très faible homologie au niveau des séquences d'ADN codant pour ces enzymes, celles-ci présentent certaines caractéristiques structurales communes : ce sont généralement des protéines transmembranaires, comportant une partie intracytoplasmique courte à leur extrémité amino-terminale et un segment d'ancrage membranaire de 16 à 20 acides aminés. Le reste de la molécule, dont le site catalytique situé au niveau d'une extrémité carboxy-terminale étendue, se trouve dans la lumière de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique (Paulson et Colley, 1989). Ces caractéristiques structurales se retrouvent en particulier dans la famille des sialyltransférases qui, chez l'Homme, comprend probablement une vingtaine de protéines différentes. Ces enzymes permettent de catalyser le transfert d'un acide sialique sur une chaîne glycanique d'une glycoprotéine à plusieurs niveaux, principalement sur un résidu galactose en α -6 ou α -3, ou sur un résidu N-acétylgalactosamine en α -6 (Harduin-Lepers *et al.*, 2001).

Le processus de N-glycosylation commence dans le réticulum endoplasmique rugueux par la synthèse d'un précurseur glycanique ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) lié à la membrane par un intermédiaire lipidique, le dolichol diphosphate. Pour cela, deux résidus de N-acétylglucosamine et cinq de mannose sont d'abord ajoutés séquentiellement sur la molécule de dolichol à l'extérieur du réticulum à partir de donneurs de type glycosyl-nucléotidique (UDP-N-acétylglucosamine et GDP-mannose). Le précurseur doit ensuite être internalisé pour continuer sa maturation à l'intérieur de ce même compartiment intra-cellulaire et ainsi recevoir quatre autres résidus mannose et trois résidus glucose. A la différence de la première, cette

seconde étape fait intervenir des donneurs de nature lipidique : le dolichol-P-mannose et le dolichol-P-glucose (Abeijon et Hirschberg, 1992) (Figure 3).

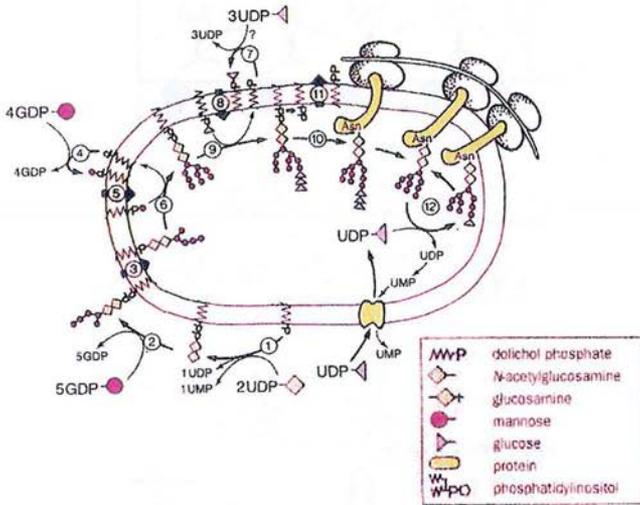


Figure 3 : Schéma simplifié de l'initiation de la N-glycosylation (d'après Abeijon et Hirschberg, 1992)

Le précurseur de base ainsi formé ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) est ensuite transféré "en bloc" sur un résidu asparagine de la protéine naissante (événement co-traductionnel). Le glycanne subit alors des modifications (ajouts et éliminations successifs de sucres) dans l'appareil de Golgi qui aboutiront aux diverses structures oligo-mannosidiques, N-acétyllactosaminiques ou hybrides généralement rencontrées sur les glycoprotéines (événements post-traductionnels) (Drickamer et Taylor, 1998 ; Elbein, 1991 ; Kobata, 1992) (Figure 4).

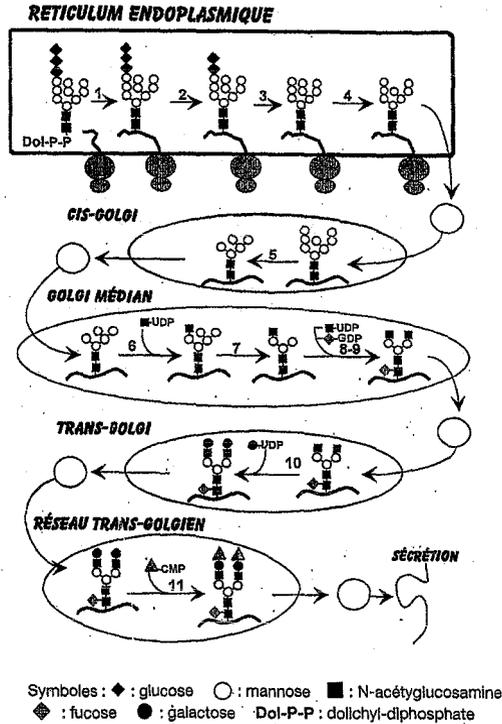


Figure 4 : Schéma simplifié de la maturation des N-glycannes des glycoprotéines (d'après Kornfeld et Kornfeld, 1985).

Ces réactions enzymatiques font intervenir des glycosyl-nucléotides comme donneurs primaires (UDP-acétylglucosamine, GDP-mannose, UDP-galactose, GDP-fucose ou CMP-acide neuraminique et UDP-glucose). D'origine cytoplasmique (ou nucléique pour le CMP-acide neuraminique), certaines de ces molécules hydrophiles (GDP-mannose et UDP-glucose) doivent traverser des membranes intracellulaires (sous forme dol-P-Man et dol-P-Glc par exemple) pour atteindre leur site d'utilisation, ce qui permet un second point de régulation fondé sur la compartimentation et le contrôle du transport des glycosyl-nucléotides.

Un troisième niveau de régulation repose sur le trafic intracellulaire en raison de l'organisation séquentielle des glycosyltransférases, localisées dans des compartiments cytosoliques différents : dans le réticulum endoplasmique s'élabore le noyau pentasaccharidique commun aux N-glycannes, dans les saccules du Golgi "cis" et "médian" se construisent les différentes antennes, et les sucres périphériques sont enfin ajoutés dans les saccules du *trans*-Golgi et le réseau *trans*-golgien (Verbert, 1993).

Par ailleurs, les chaînes O-glycanniques rencontrées sur les glycoprotéines présentent également une grande diversité, en particulier en ce qui concerne leur liaison avec la chaîne peptidique qui peut faire intervenir des acides aminés (sérine, thréonine, tyrosine, lysine, proline) et des monosaccharides (N-acétylgalactosamine, mannose, glucose) très variés (Montreuil, 1993). Elles sont généralement classées en quatre groupes principaux en fonction de la structure de leur noyau de base (Kobata, 1992 ; Cumming, 1992 ; Wyss et Wagner, 1996) (Figure 5).

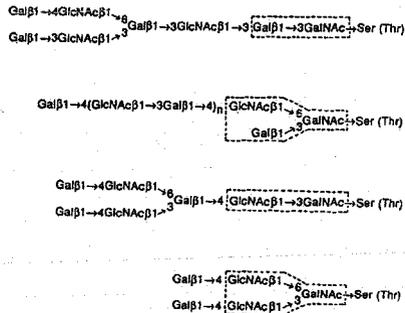


Figure 5 : Exemples de structures glycanniques liées en O rencontrées sur les glycoprotéines (d'après Kobata, 1992)

Du fait de la complexité du mécanisme de biosynthèse des glycannes, il est aisé de comprendre la difficulté qui existe à essayer de le maîtriser, en particulier quand il s'agit de reproduire les structures naturelles sur les glycoprotéines recombinantes, produites par conséquent par des cellules hôtes différentes dans des conditions physiologiques particulières.

2. Rôles des chaînes glycaniques

Les nombreuses fonctions que peut avoir la fraction glycanique des glycoprotéines repose principalement sur la diversité de structure qui la caractérise. En particulier, la diversité de nature des monosaccharides composant les chaînes glycaniques (micro-hétérogénéité) et l'occupation potentielle des sites de glycosylation (macro-hétérogénéité) vont influencer sur les propriétés physico-chimiques et biologiques de la protéine (Cumming, 1992).

Ainsi, les oligosaccharides peuvent tout d'abord jouer un rôle de stabilisation de la molécule. En effet, situés à la surface de la protéine, ils contribuent au maintien de sa conformation spatiale en participant au repliement moléculaire (Elbein, 1991 ; Opendakker *et al.*, 1993). Couvrant plus ou moins largement la chaîne peptidique, ils peuvent, en outre, avoir un rôle important en protégeant les sites fonctionnels contre les dégradations protéolytiques ou au contraire en masquant des épitopes (Wyss et Wagner, 1996). La nature hydrophile des glycannes leur permet également d'influer sur la solubilité globale de la glycoprotéine (Verbert, 1993).

De plus, l'activité biologique de la molécule peut être régulée par la nature de ses chaînes glycaniques. Celles-ci permettent en particulier de moduler de manière très significative la demi-vie de la molécule dans la circulation sanguine (Saxena *et al.*, 1998; Weikert *et al.*, 1999). Les interactions entre glycannes et récepteurs hépatiques (exprimant une lectine spécifique de résidus "galactose" terminaux) induisent en effet l'élimination rapide des glycoprotéines dont la sialylation est incorrecte (Monsigny, 1993 ; Flesher *et al.*, 1995). D'autre part, les oligosaccharides peuvent aussi jouer le rôle de signaux de reconnaissance vis à vis de récepteurs spécifiques impliqués dans le trafic intracellulaire (ciblage vers les lysosomes par exemple) et ainsi contribuer au contrôle de la vitesse de sécrétion de la glycoprotéine (Elbein, 1991).

Enfin, dans le cas de l'utilisation thérapeutique des glycoprotéines, les chaînes glycaniques peuvent elles-même constituer de véritables épitopes susceptibles de déclencher des réactions antigéniques si elles comportent des monosaccharides ou des motifs de glycosylation inexistant chez l'Homme (Schauer, 1988; Goochee *et al.*, 1991; Noguchi *et al.*, 1995; Fernandes et Gregoriadis, 2001).

Les structures de glycosylation sont donc impliquées dans de multiples fonctions cellulaires et leur altération peut être à l'origine d'un certain nombre de pathologies telles que la polyarthrite rhumatoïde, certains cancers (Dwek, 1995) ou le syndrome de Jaeken (ou "carbohydate deficient glycoprotein syndrome type 1a") (Kornfeld, 1998 ; Mehlman *et al.*, 2003).

3. Influence du procédé de culture sur la glycosylation des glycoprotéines recombinantes

Compte-tenu de l'importance que peut avoir la glycosylation sur les propriétés de la glycoprotéine, il s'avère souvent essentiel dans les procédés de production de molécules recombinantes, de reproduire au mieux la forme naturelle, en particulier quand le but est une utilisation en médecine humaine. Pour cela, la maîtrise des différents facteurs susceptibles d'influencer la qualité de la glycosylation revêt un intérêt crucial, en dépit de la compréhension encore incomplète des mécanismes intracellulaires. Ainsi, les procédés de culture sont l'objet de nombreux travaux dans le but de déterminer les principaux points présentant une source potentielle de variation pour la structure des glycoprotéines produites.

Il est cependant important de comprendre que l'essentiel des notions liées à la glycosylation reste très particulier à une molécule donnée, et que des phénomènes opposés peuvent s'observer lors de l'étude d'autres protéines. Il est donc primordial pour chaque système étudié, de vérifier l'exactitude d'une propriété décrite dans la littérature. Ceci est particulièrement vrai pour ce qui concerne la structure des oligosaccharides ou l'occupation potentielle des sites de glycosylation mais également pour ce qui se rapporte aux effets que le procédé de culture peut induire sur la glycosylation.

3.1. Cellule hôte

Une grande variété de systèmes de production de protéines recombinantes sont aujourd'hui disponibles et nous avons vu précédemment que le choix de l'hôte d'expression dépendra largement des fonctions portées par la composante glycannique (dans le cas de la protéine étudiée). S'il s'avère que celle-ci joue effectivement un rôle clé dans les propriétés de la molécule, les cellules de mammifères seront probablement les seules à être capables de

Bibliographie

reproduire des motifs de glycosylation de type complexe semblables à ceux que portent les protéines naturelles d'origine humaine.

Cependant, chaque lignée cellulaire possède son propre équipement enzymatique et le choix de la cellule hôte peut influencer très significativement les structures glycaniques obtenues (Kagawa *et al.*, 1988; Parekh *et al.*, 1989a et b; Utsumi *et al.*, 1989; Jenkins, 1995; Flesher *et al.*, 1995; Kopp *et al.*, 1997). Ainsi, Goto *et al.* (1988) ont observé que l'EPO recombinante produite par des cellules de hamster BHK-21 ou de souris NIH/3T3, différait de l'hormone naturelle au niveau de la composante glycanique et que l'activité biologique s'en trouvait modifiée. En outre, à la différence des cellules humaines, les cellules de hamster CHO n'expriment pas l' α 2,6-sialyltransférase, ce qui ne leur permet de synthétiser des glycoprotéines qui ne portent des acides sialiques qu'en position α 2,3 uniquement. Ces cellules sont également incapables d'ajouter des groupements "sulfate" sur les résidus GalNAc comme c'est le cas sur certaines hormones humaines naturelles. Il a aussi été montré que les acides sialiques de type "glycolique" (NeuGc) présents sur les molécules synthétisées par les cellules CHO pouvaient se révéler antigéniques en raison de leur absence sur les protéines humaines (Schauer, 1988; Noguchi *et al.*, 1995). D'autre part, les cellules murines possèdent, elles, les capacités de sulfatation et de sialylation en position α 2,3 et α 2,6 comme les cellules humaines, mais expriment en plus l' α 1,3-galactosyltransférase, également susceptible de rendre les protéines synthétisées potentiellement antigéniques (Jenkins et Curling, 1994).

Par conséquent, certaines lignées cellulaires CHO ont été génétiquement modifiées afin d'améliorer leur potentiel de glycosylation en permettant l'expression de certaines glycosyltransférases dont elles sont dépourvues à l'origine. C'est notamment le cas de l' α 2,6-sialyltransférase (Lee *et al.*, 1989; Monaco *et al.*, 1996) et de l' α 1,3-fucosyltransférase (Potvin *et al.*, 1990). Inversement, l'expression d'enzymes propres aux cellules hôtes mais non exprimées chez l'Homme, telles que la CNAH (CMP-N-acétylneuraminic acid hydroxylase), peut également être abaissée par modification génétique (Chenu *et al.*, 2003).

3.2. Environnement extracellulaire / Composition du milieu de culture (sérum, glutamine, NH_4^+ , glucose...)

Le métabolisme intracellulaire étant étroitement lié à l'environnement extracellulaire, la machinerie enzymatique de glycosylation peut être fortement influencée par les divers nutriments et déchets présents dans le milieu de culture.

Le sérum de veau fœtal, classiquement utilisé pour compléter les milieux de cultures de cellules animales, permet d'apporter une grande diversité de substances impliquées dans la physiologie cellulaire (facteurs de croissance, vitamines, hormones, nucléotides, ions protéines, acides aminés, sucres, etc...) et son influence bénéfique est largement reconnue en ce qui concerne la croissance cellulaire. Par contre, ses effets sur la glycosylation des protéines sont beaucoup plus variables et apparaissent très dépendants de chaque système "cellule hôte - protéine". Ainsi, le contenu en acide sialique d'un anticorps monoclonal produit par un hybridome cultivé en présence et absence de sérum s'est révélé nettement plus important sans sérum (Patel *et al.*, 1992). D'un autre côté, Moellering *et al.* (1990) n'ont trouvé aucune différence significative dans la composition glycanique d'un autre anticorps monoclonal produit avec et sans sérum, et des différences, d'ordre mineur uniquement, ont été observées pour une autre immunoglobuline produite par cellules CHO dans les deux conditions de culture (Lifely *et al.*, 1995). Concernant l'IFN- γ caractérisé par une forte macro-hétérogénéité au niveau de ses deux sites de N-glycosylation, la distribution de ses glycoformes peut être sévèrement affectée (diminution de la forme glycosylée sur les deux sites) par la présence de sérum qui paraît induire une dégradation protéolytique en fin de culture ; dans ces conditions, le niveau de sialylation apparaît également diminué et la micro-hétérogénéité glycanique accrue (Castro *et al.*, 1995; Lamotte, 1997).

La culture sans sérum est également susceptible d'influencer la glycosylation d'une interleukine-2 modifiée en augmentant son degré de sialylation terminale et de fucosylation proximale (Gawlitzeck *et al.*, 1995).

Par ailleurs, le glucose, source énergétique principale de la plupart des milieux de culture, peut aussi avoir des effets néfastes sur la glycosylation des protéines en cas de limitation. Deux types d'altération ont été décrites dans la littérature : la présence de précurseurs oligosaccharidiques anormaux (Gershman et Robbins, 1981) ou l'absence complète de chaînes glycaniques sur les

Bibliographie

sites de glycosylation habituels (Stark et Heath, 1979). Il est intéressant de noter que ces anomalies pouvaient être évitées par l'addition de mannose dans le milieu de culture mais non par celle d'autres sucres. Par ailleurs, une étude du comportement de cellules CHO maintenues en croissance réduite par une limitation en glucose a montré que ces conditions de culture favorisaient la production de la forme non glycosylée de l'IFN- γ (Hayter *et al.*, 1993). Ce phénomène pourrait être dû à des modifications du métabolisme du glucose ou à une perturbation concernant les précurseurs nucléotidiques des glycanes (Jenkins et Curling, 1994; Nyberg *et al.*, 1999).

Une concentration élevée en ions ammoniums (NH_4^+) dans le surnageant de culture est également susceptible d'altérer la biosynthèse des chaînes glycaniques des protéines. Produits dérivés de la métabolisation par les cellules de la glutamine, principale source d'azote des milieux de culture, leur accumulation est directement dépendante de la concentration initiale de cet acide aminé et peut atteindre des concentrations supérieures à 10 mM en fin de culture (Gawlitzeck *et al.*, 1998). Kopp *et al.* (1996) ont par exemple observé une modification importante du profil glycanique de l'IFN- ω obtenu par électrophorèse capillaire quand la concentration de chlorure d'ammonium (NH_4Cl) était augmentée. Plusieurs travaux indiquent aussi que la sialylation peut être partiellement, voire complètement inhibée par des concentrations en NH_4Cl de 10 mM (Thorens et Vassalli, 1986; Andersen et Goochee, 1995; Yang et Butler, 2000a, b et 2002; Zanghi *et al.*, 1998a et b). La complexité des chaînes N-glycaniques (nombre d'antennes) serait également accrue par des concentrations de cet ordre (Grammatikos *et al.*, 1998; Gawlitzeck *et al.*, 1998) et selon Borys *et al.* (1994), la N-glycosylation dans son ensemble serait susceptible d'être sévèrement altérée dans ces conditions. Diverses hypothèses basées sur le changement du pH intracellulaire ou sur la modification du métabolisme mitochondrial ont été proposées pour expliquer les effets observés (Schneider *et al.*, 1996). L'augmentation du pool intracellulaire des précurseurs nucléotidiques des glycanes (UDP-Nacétylhexosamines) a également été observée en présence de forte teneur en NH_4Cl et serait directement liée à l'activité de la glucosamine-6-phosphate isomérase (GPI) qui favoriserait l'entrée des ions NH_4^+ dans le métabolisme cellulaire (Ryll *et al.*, 1994; Valley *et al.*, 1999; Cayli *et al.*, 1999). Ce phénomène serait à l'origine de l'augmentation de la complexité glycanique mais ne concernerait pas l'inhibition de la sialylation liée, elle, à une modification du pH de l'environnement extracellulaire (Grammatikos *et al.*, 1998). En outre, des travaux récents indiquent que les ions NH_4^+ ne semblent pas induire de dégradation mais plutôt perturber

la biosynthèse des oligosaccharides par une action pH-dépendante sur l'activité des glycosyltransférases (Gawlitzeck *et al.*, 2000).

De façon similaire, l'ajout de glucosamine dans le milieu de culture peut induire l'augmentation concomitante de la concentration intracellulaire des précurseurs nucléotidiques des oligosaccharides et de la complexité glycanique (Gawlitzeck *et al.*, 1998; Yang et Butler, 2002).

La supplémentation du milieu de culture par le butyrate de sodium, reconnu pour stimuler la production des protéines recombinantes, semble également pouvoir améliorer leur degré de sialylation (Lamotte *et al.*, 1999; Chotigeat *et al.*, 1994). Il a été montré en outre, qu'en sa présence, l'occupation des sites potentiels de glycosylation pouvait être plus élevée (Andersen *et al.*, 2000).

D'autres suppléments ont fait l'objet d'études ponctuelles concernant leur effet sur la glycosylation. Ainsi, le niveau de sialylation de l'IFN- γ a pu être augmenté par l'ajout dans le milieu de culture de substances directement impliquées dans la biosynthèse glycanique, telles que la N-acétylmannosamine (Gu et Wang, 1998) et divers lipides (Jenkins *et al.* 1994). Mentionnons enfin que l'acide rétinoïque a permis de diminuer la proportion des chaînes de types "high mannose" et hybride au profit de structures complexes sur la fibronectine synthétisée par des chondrocytes (Bernard *et al.*, 1984).

3.3. Mode de culture et paramètres opératoires physico-chimiques

Par le rôle significatif qu'il peut jouer dans l'évolution de l'environnement des cellules, le mode de culture peut avoir un impact important sur la physiologie cellulaire et par conséquent, sur le métabolisme enzymatique contrôlant la biosynthèse des oligosaccharides.

Ainsi, la sialylation de kallikréine obtenue par des cellules adhérentes cultivées sur microporteurs peut s'avérer moins abondante que par culture de cellules en suspension (Watson *et al.*, 1994). En outre, Kopp *et al.* (1996) ont observé que les cellules CHO avaient tendance à synthétiser des glycoformes de l'IFN- ω plus complexes en culture statique que lorsqu'elles étaient cultivées en suspension. Lamotte (1997) a également mis en évidence une diminution de la sialylation de l'IFN- γ produit en culture perfusée comparée à celle obtenue en configuration

Bibliographie

discontinue. L'auteur indique cependant que le phénomène décrit précédemment dans le cas de cellules adhérentes a pu être induit par la formation d'agrégats dans la culture perfusée.

De même, les conditions opératoires de culture influent grandement sur la physiologie cellulaire et peuvent donc également avoir une action sur le processus de glycosylation. En particulier, des valeurs de pH inférieures à 6.9 ou supérieures à 8.2 peuvent perturber la synthèse des chaînes glycaniques en provoquant une diminution de leur taille. Le fonctionnement des enzymes de la glycosylation serait modifié par la variation du pH intracellulaire (Borys *et al.*, 1993).

La baisse du taux d'oxygène dissous dans le milieu de culture (pO_2) semble être néfaste pour l'activité des sialyltransférases intracellulaires et pourrait entraîner une réduction du degré de sialylation des protéines en raison d'une moindre disponibilité du donneur UDP-Gal (Chotigeat *et al.*, 1994). En cas de chute importante de la pO_2 (à des valeurs de l'ordre de 10% de la saturation d'air), une altération du niveau de galactosylation des N-glycannes a également été observée (Kunkel *et al.*, 1998 et 2000). Par contre, Lin *et al.* (1993) n'ont observé aucune modification de la composante glycanique du t-PA en condition d'anaérobiose, même sévère.

La diminution de la température perturbe également la biosynthèse des oligosaccharides. Une différence au niveau de la macro-hétérogénéité du t-PA (augmentation du taux d'occupation des sites de glycosylation) a ainsi été mise en évidence lors de cultures réalisées à 33°C, au lieu de 37°C habituellement. Ce phénomène pourrait être lié à la perturbation du cycle cellulaire, la proportion de cellules en phase G_0/G_1 augmentant quand la température diminue (Andersen *et al.*, 2000).

Mentionnons aussi qu'un taux élevé de CO_2 dissous (250 mmHg) dans le milieu de culture (pCO_2) a induit l'augmentation de la proportion des acides sialiques de type N-glycolylneuraminique du t-PA sans que d'autres modifications aient été observées au niveau de la glycosylation. Aucune hypothèse n'a été formulée par les auteurs pour expliquer cette observation (Kimura et Miller, 1997).

3.4. Durée de culture et dégradation enzymatique

Les structures glycaniques portées par les glycoprotéines sont également susceptibles de varier avec le temps de culture. Les effets observés sont étroitement dépendants de la configuration du procédé qui détermine l'évolution éventuelle de l'environnement extracellulaire en cours de culture. Les configurations continues ou perfusées permettent de maintenir un état d'équilibre pendant lequel la glycosylation est généralement stable (Hayter *et al.*, 1993; Cruz *et al.*, 2000). Par contre, au cours des procédés discontinus (et semi-continus), les conditions de culture en évolution permanente peuvent induire des changements métaboliques susceptibles de perturber la synthèse des oligosaccharides. Ainsi, en cours de culture, la macro-hétérogénéité peut évoluer comme c'est le cas pour le t-PA dont l'occupation des sites de glycosylation a tendance à augmenter (Andersen *et al.*, 2000) ou pour l'IFN- γ dont la forme doublement glycosylée (2N) diminue au cours du temps (Lamotte, 1997). Sur cette même glycoprotéine, une substitution progressive des chaînes glycaniques de type complexe par des structures tronquées et oligomannosidiques a également été mise en évidence (Hooker *et al.*, 1995). Un changement du profil glycanique de l'IFN- ω , a, en outre, été observé par électrophorèse capillaire, suggérant une diminution de la taille des oligosaccharides en fin de culture (Kopp *et al.*, 1996).

D'autre part, plusieurs travaux montrent que la sialylation peut progressivement s'altérer en raison de dégradations de type protéolytique au niveau intracellulaire (Curling *et al.*, 1990; Goldman *et al.*, 1997 et 1998) ou d'origine sialidasique à la suite du relargage d'enzymes dans le surnageant par des cellules lysées (Warner *et al.*, 1993; Gramer *et al.*, 1995; Munzert *et al.*, 1996 et 1997; Gu *et al.*, 1997; Zhang et Wang, 1998). D'un point de vue quantitatif, des valeurs d'activité sialidasique pouvant atteindre 3 000, voire 30 000 nmol/h/L, ont été relevées dans des surnageants de culture de cellules CHO (Muntzert *et al.*, 1996 et 1997; Gramer et Goochee, 1993).

4. Méthodes d'analyse des glycoprotéines

Nous venons de voir que l'extrême diversité des séquences oligosaccharidiques, pouvant en particulier se rencontrer sur un même site de glycosylation, entraînait une grande complexité de structure qui, elle-même, pouvait influencer directement sur de nombreuses propriétés des glycoprotéines. En outre, les différences entre ces diverses glycoformes ne reposent parfois que

sur la nature d'un seul sucre ou d'une seule liaison. L'analyse des structures glycaniques exige donc des techniques dotées d'une sensibilité élevée, et très variées afin de tirer profit des propriétés physico-chimiques particulières de certains sucres.

Les nombreuses techniques susceptibles d'apporter des informations sur la composante glycanique des glycoprotéines peuvent être classées en trois catégories : certaines ont pour but d'analyser la molécule entière par séparation de différentes glycoformes, d'autres visent à étudier plus spécifiquement les chaînes glycaniques après clivage de la partie protéique, et enfin les dernières permettent de déterminer précisément leur séquence.

4.1. Séparation des glycoformes

Les méthodes de séparation des glycoformes sont basées sur l'analyse de la protéine entière. L'électrophorèse sur gel (SDS-PAGE), rapide et simple d'utilisation, fournit généralement les renseignements préliminaires concernant la fraction glycanique. La mise en évidence de la protéine d'intérêt par des anticorps spécifiques (western-blot) permet d'améliorer le seuil de sensibilité de cette technique et l'utilisation de lectines à haute affinité pour des séquences oligosaccharidiques particulières (lectin-blot) donne accès à certaines données très précises concernant la composition glycanique (Robertson et Kennedy, 1996; Storrington *et al.*, 1996).

Le niveau de résolution beaucoup plus élevé de la chromatographie, à échange d'anions notamment (DEAE, HPAEC) ou à exclusion de taille (SEC), et plus encore de l'électrophorèse capillaire, de zone (CZE), à iso-électrofocalisation (cIEF) ou micellaire (MEKC), permet d'obtenir une meilleure séparation des multiples espèces en présence (Tran *et al.*, 1991; James *et al.*, 1994; Bietlot et Girard, 1997; Cifuentes *et al.*, 1999; Nyberg *et al.*, 1999; Kakehi *et al.*, 2001).

En outre, ces diverses techniques peuvent être mises en œuvre sous différents modes afin d'orienter la séparation selon des critères directement liés aux propriétés particulières des oligosaccharides. L'iso-électrofocalisation (IEF) présente ainsi un intérêt évident pour l'analyse du contenu en acides sialiques des glycoformes puisque l'acidité qu'ils apportent influera directement sur la séparation basée principalement dans ce cas, sur la différence de point isoélectrique (pI) des espèces (Imai *et al.*, 1990a; Flesher *et al.*, 1995; Tam *et al.*, 1991; Lasne et de Ceaurriz, 2000). L'IEF est notamment utilisée actuellement en électrophorèse sur gel bidimensionnelle dans le but d'en améliorer la capacité de séparation basée ici sur les critères de pI puis de taille (Wimmer *et al.*, 1994; Yang et Butler, 2000a; Skibeli *et al.*, 2001).

Le "peptide-mapping" est une technique intermédiaire puisqu'elle vise à analyser des glycoprotéines hydrolysées par des enzymes protéolytiques (telles que la trypsine) spécifiques de certains enchaînements d'acides aminés. Des peptides glycosylés ou non, sont ainsi libérés et leur séparation est plus aisée que celle des glycoformes entières. Les profils obtenus sont également caractéristiques de l'état de glycosylation de la glycoprotéine mais ne fournissent qu'assez peu d'informations précises sur les chaînes glycaniques elles-mêmes (Recny *et al.*, 1987; Spellman, 1990; Rush *et al.*, 1993; Boss *et al.*, 1995; Gu et Wang, 1998).

La résolution obtenue dépend bien-entendu de la technique employée mais aucune ne parvient à séparer parfaitement toutes les glycoformes. Des résultats intéressants sont néanmoins rapportés, généralement sous forme de profils caractérisant la distribution des différentes glycoformes produites dans des conditions données (Watson et Yao, 1993; Jenkins, 1995; Kopp *et al.*, 1996; Gokana *et al.*, 1997; Goldman *et al.*, 1998; Kinoshita *et al.*, 2000; Skibeli *et al.*, 2001).

4.2. Séparation des chaînes glycaniques

La seconde classe de méthodes a pour but d'analyser spécifiquement la composante glycanique des glycoprotéines. La séparation des différentes chaînes glycaniques permet d'accéder à des informations structurales plus précises concernant en particulier leur taille et leur degré de sialylation. Ces méthodes font donc intervenir une première étape de clivage des fractions peptidique et glycanique, réalisée généralement par voie enzymatique par action de la peptide N-glycosidase F (de *Flavobacterium meningosepticum*) et précédée d'une dénaturation de la glycoprotéine qui favorisera le clivage. Les oligosaccharides ainsi libérés font le plus souvent l'objet d'un marquage fluorescent afin d'améliorer la sensibilité de la détection.

Les techniques de séparation précédemment citées pour l'analyse de la protéine entière pourront alors être également utilisées dans ce cas, mais sous des configurations différentes. L'échange d'anions, le plus souvent couplé à un détecteur ampérométrique pulsé (high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection ou HPAE-PAD) est le type de chromatographie le plus largement utilisé (Spellman, 1990; Parekh et Patel, 1992; Rice *et al.*, 1992; Conradt *et al.*, 1991; Flesher *et al.*, 1995; Kakehi *et al.*, 2001); les configurations en phases normales et phases inverses donnent également des résultats intéressants (Tsuda *et al.*, 1988; Skibeli *et al.*, 2001). L'électrophorèse des glycannes sur gel (fluorescence associated

Bibliographie

carbohydre electrophoresis ou FACE) est actuellement en plein essor (Guttman et Starr, 1995; Friedman et Higgins, 1995; Flesher *et al.*, 1995; Morimoto *et al.*, 1999; Bardor *et al.*, 2000; Yang et Butler, 2000b et c) mais son pouvoir de résolution n'atteint pas celui de l'électrophorèse capillaire, employée également en phase "gel" (CGE) dans cette application, et permettant d'obtenir des profils glycaniques caractéristiques de la qualité d'une glycoprotéine (Guttman et Starr, 1995; Guttman, 1996; Guttman *et al.*, 1996a et b; Kakehi *et al.*, 2001).

4.3. Détermination de la séquence oligosaccharidique

Généralement couplées à la chromatographie pour l'étape de séparation préalable, deux techniques très puissantes permettent d'accéder à la séquence précise des monosaccharides composant une chaîne glycanique : la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (SM), en particulier sous ses configurations MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight) et FAB (fast atom bombardment). Ces deux techniques ont donc été largement appliquées à l'étude de la structure précise de nombreuses glycoprotéines telles que l'IFN- γ (Harmon *et al.*, 1996), l'EPO (Sasaki *et al.*, 1987 et 1988; Tsuda *et al.*, 1988; Nimtz *et al.*, 1993 et 1995; Watson *et al.*, 1994; Rush *et al.*, 1995; Kanazawa *et al.*, 1999; Kawasaki *et al.*, 2000), l'IFN- β (Conradt *et al.*, 1987), la thrombopoïétine (Inoue *et al.*, 1999b) ou le facteur VIII (Medzihradsky *et al.*, 1997). En dépit des difficultés posées par le choix d'un tampon compatible avec les deux techniques, le couplage de l'EC (de zone, généralement) et de la SM, sous ses configurations MALDI-TOF et ESI (electrospray ionisation), tend aussi à se développer actuellement (Boss *et al.*, 1995 et 1998; Che *et al.*, 1999). Malgré les formidables progrès que ces techniques ont permis, leur développement reste limité par leur complexité de mise en œuvre, et plus particulièrement, le degré de pureté de la molécule, le niveau de compétence des utilisateurs et le coût du matériel très élevés qu'elles exigent.

Sans faire obligatoirement appel aux deux techniques très lourdes que sont la RMN et la SM, le séquençage enzymatique permet également d'obtenir des informations très précises sur la composition des chaînes oligosaccharidiques (nature et ordre des monosaccharides, type de liaison α/β , etc...). Cette méthode consiste à mettre séquentiellement ces dernières en présence de différentes exo-glycosidases très spécifiques (sialidases, galactosidases, mannosidases, N-acétylhexosaminidases, fucosidases, etc...) et d'observer leur action respective sur la structure des glycannes après chaque incubation (Edge *et al.*, 1992a et b; Yang et Butler, 2000b).

4.4. Application au suivi de la glycosylation en cours de culture

Les techniques pouvant être appliquées au suivi de la glycosylation d'une protéine produite en cours de culture doivent être à la fois sensibles et simples à mettre en œuvre. En effet, les quantités de protéine à analyser sont souvent réduites en raison du volume limité des prélèvements répétés, ainsi que des concentrations protéiques faibles inhérentes aux débuts de culture. De plus, si l'objectif est de contrôler la qualité de la glycoprotéine "en temps réel" au cours de sa production, comme ce peut être le cas en condition industrielle par exemple, la vitesse d'analyse constituera également un critère prioritaire et exigera que chaque étape soit la plus rapide possible (en particulier, la purification).

Il est donc essentiel de souligner que la plupart des résultats concernant les structures de glycosylation décrits dans la littérature ont été obtenus par des méthodes nécessitant des quantités importantes de protéines (plusieurs mg) provenant directement de fournisseurs commerciaux et par conséquent hautement purifiées par des procédés pouvant mettre en œuvre jusqu'à sept étapes successives (Takeuchi *et al.*, 1989; Miyake *et al.*, 1977). Ainsi, même si de nombreuses techniques paraissent "théoriquement" intéressantes, les contraintes précédemment citées peuvent expliquer que peu de travaux concernent effectivement cette application particulière.

Hooker *et al.* (1995), ainsi que Goldman *et al.* (1998), ont analysé l'évolution en cours de cultures perfusée et discontinue, de la macro-hétérogénéité de l'IFN- γ par électrophorèse capillaire micellaire, de son pI par électrophorèse capillaire à iso-électrofocalisation et du profil de ses chaînes sialylées par chromatographie à échange de cations. Notons que les volumes de prélèvement étaient assez importants (aliquots de 0.5 à 1.5 L), que 500 μg d'IFN- γ étaient utilisés pour l'analyse des chaînes glycaniques et que l'étape de purification était réalisée simplement par immuno-affinité puis concentration et dessalement. En outre, le suivi de la micro-hétérogénéité de l'IFN- γ en cours de culture a été également réalisé par Harmon *et al.* (1996) qui ont mis au point un procédé automatisé puissant permettant, en l'espace de quelques heures, la purification par immuno-affinité, la digestion (par la trypsine), le fractionnement par chromatographie en phase inverse et enfin l'analyse par SM (MALDI/TOF) de très faibles quantités de protéine, de l'ordre de 0.5 μg . Cette méthode est notamment à la base des travaux réalisés par Gu *et al.* (1997) et Zhang et Wang (1998).

Par ailleurs, Yang et Butler (2000c) ont étudié la glycosylation de l'EPO récoltée en début et milieu de culture (deux prélèvements après 4 et 7 jours). Les glycoformes entières ont été analysées par western-blot et électrophorèse sur gel à deux dimensions (SDS-PAGE et IEF) à partir d'échantillon de 50 μ L de surnageant non purifié. Le profil des chaînes glycaniques a été obtenu par FACE et chromatographie d'échange d'ions, ce qui a nécessité la purification par immuno-affinité d'un litre de surnageant. Mentionnons de plus, la méthode de suivi de la glycosylation de l'EPO par chromatographie à échange d'anions mise au point par Conradt *et al.* (1991). Celle-ci aurait pour but d'être appliquée dans le cadre de contrôles de routine de lots de produits recombinants, mais il est important de souligner qu'ils utilisent pour leurs analyses, des échantillons de 50 à 100 μ g d'EPO commerciale purifiée à 99%.

Enfin, Kopp *et al.* (1996) ont étudié l'évolution de la glycosylation de l'IFN- ω au cours du temps (après 4 et 8 jours de culture) à partir de l'analyse des glycoformes entières par électrophorèse capillaire micellaire et de celle des chaînes glycaniques par chromatographie à échange d'anions (Figure 6). Notons également que le suivi de la macro-hétérogénéité du t-PA (distribution des glycoformes) en cours de culture a également été effectué par chromatographie en phase inverse par Andersen *et al.* (2000). Ces deux travaux ne mentionnent malheureusement aucune information quantitative concernant les techniques de purification et d'analyse utilisées.

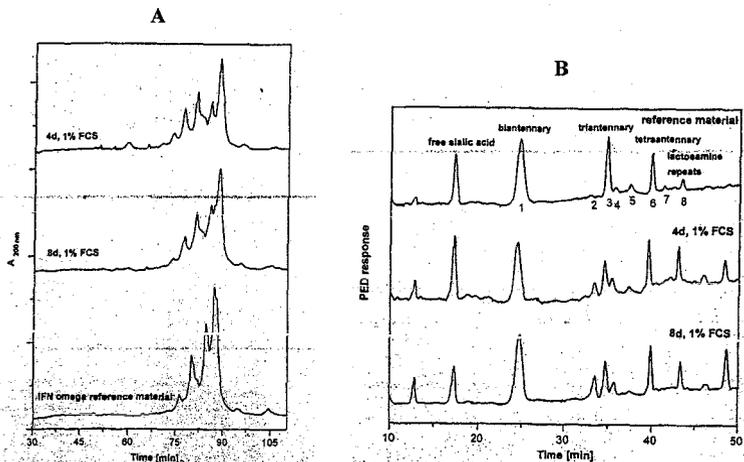


Figure 6 : Analyse au cours du temps (après 4 et 8 jours de culture) de l'IFN- ω entier, par électrophorèse capillaire micellaire (A), et de ses chaînes glycaniques désialylées, par chromatographie à échange d'anions (B) (d'après Kopp *et al.*, 1996).

III. L'érythropoïétine : rôle, structure, production, purification et analyse

1. Généralités : rôles physiologiques et utilisations de l'EPO

Depuis l'idée émise par Claude Bernard, il y a plus de 100 ans, concernant la probable existence d'une substance contrôlant l'érythropoïèse, l'EPO a été identifiée comme le principal facteur de croissance de la lignée érythrocytaire. Synthétisée dans le foie chez l'embryon, puis dans le rein chez l'adulte, cette glycoprotéine est libérée dans la circulation sanguine pour exercer son activité dans la moelle osseuse, sur les progéniteurs érythroïdes, qui portent des récepteurs membranaires spécifiques (Figure 7). Elle y stimule leur prolifération et différenciation en globules rouges matures (processus durant 5 à 9 jours) et participe ainsi à la régulation de l'érythropoïèse par un effet dose-dépendant lié à sa concentration dans le sang.

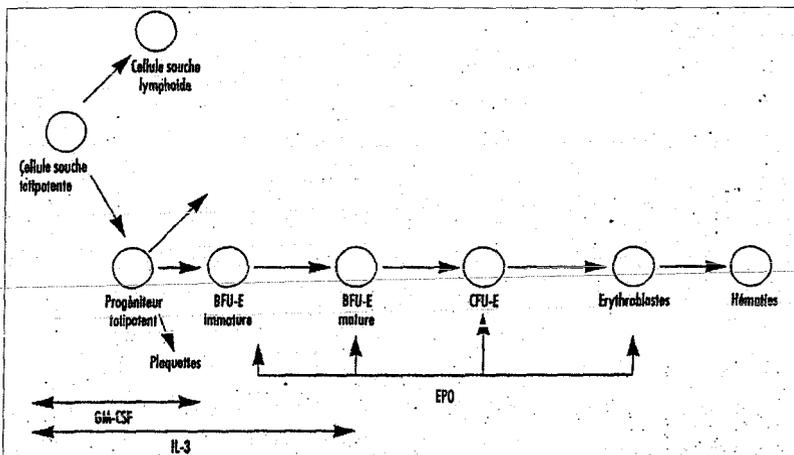


Figure 7 : Mécanisme général de l'érythropoïèse et rôle de l'EPO (d'après Bartheuf *et al.*, 1996).

Bibliographie

D'un point de vue moléculaire, la fixation de l'EPO sur son récepteur provoque la phosphorylation rapide de résidus tyrosine sur le récepteur lui-même bien que celui-ci ne possède aucune activité tyrosine kinase endogène. Plusieurs autres protéines sont également phosphorylées, c'est notamment le cas de la Janus kinase 2 (Jak2), des facteurs transcriptionnels de type STAT (signal transducers and activators of transcription), de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) ou encore de la Ras/MAP kinase (Lacombe et Mayeux, 1999). En outre, une augmentation de la quantité de calcium intracellulaire dans les cellules cibles est observée à la suite de la liaison de l'EPO à son récepteur (Jelkmann, 1992). Celui-ci a une structure multimérique de masse moléculaire totale de 330 kDa, la chaîne fixant l'EPO ayant une taille de 66 kDa. Comme les récepteurs d'autres facteurs de croissance hématopoïétiques, il présente un seul domaine transmembranaire, deux paires de cystéine, et le motif Trp-Ser-X-Trp-Ser dans son domaine extracellulaire (Barthomeuf *et al.*, 1996).

La production d'EPO est stimulée par la diminution du taux d'oxygène disponible pour les tissus (détectée par des récepteurs rénaux sensibles à la pression en oxygène); sa concentration sérique habituelle est d'environ 20 mU/ml mais peut monter à 10 000 en condition d'hypoxie. Sa demi-vie plasmatique, très variable d'une personne à l'autre, est de l'ordre d'une dizaine d'heures, et son élimination a ensuite lieu au niveau urinaire (Egrie, 1990 ; Flaharty, 1990 ; Jelkmann, 1992 ; Fisher, 1997).

Le clonage du gène de l'EPO humaine, simultanément réalisé en 1985 chez Amgen (Lin *et al.*, 1985) et Genetics Institute (Jacobs *et al.*, 1985), a permis de produire l'hormone recombinante par culture de cellules CHO. Celle-ci est commercialisée depuis 1988 sous deux formes, α (Epoegen, epoetin- α ou EPREX® par Amgen et Johnson&Johnson / Janssen-Cilag / Kirin Breweries) et β (epoetin- β , RECORMON®, NEORECORMON® ou EPOGIN® par Genetics Institute / Boehringer-Mannheim-Roche / Chugai Pharmaceutical) et est maintenant largement utilisée en thérapeutique humaine, notamment pour redresser les anémies secondaires aux insuffisances rénales chroniques (schéma de traitement classique : 3 injections intraveineuses ou sous-cutanées par semaine de 10 à 150 U/kg). Son action serait également très bénéfique dans plusieurs autres pathologies, telles que certains cancers (accord de la Food and Drug Administration - FDA), le SIDA (accord FDA), la polyarthrite rhumatoïde ou la myélodysplasie, ainsi que dans les cas de transfusions autologues et de transplantation de moelle osseuse (Flaharty, 1990; Jelkmann, 1992; Ben Ghanem, 1997; Fisher, 1997). Notons également qu'un analogue de l'EPO, la darbopoiétine α , est récemment arrivé sur le marché. Grâce à la modification par "glyco-engineering", de certains acides aminés de la chaîne peptidique

d'origine, des sites de glycosylation supplémentaires ont été générés et cette molécule comporte ainsi 5 chaînes N-glycanniques, ce qui lui permet d'avoir une activité biologique *in vivo* plus élevée et une durée d'action plus longue dans l'organisme ; le nombre de prises hebdomadaires du médicament par le patient s'en trouve par conséquent significativement réduit (Elliot *et al.*, 2003).

Mieux connue du grand public pour son utilisation détournée dans plusieurs sports d'endurance tels que le cyclisme ou le marathon, l'EPO permet en effet d'augmenter significativement la quantité d'oxygène transportée par les globules rouges vers les tissus musculaires. La chute de l'énergie disponible en conditions d'hypoxie et l'apparition d'acide lactique, responsable de la sensation de fatigue, y sont ainsi retardées. Plusieurs tests "anti-dopage" ont maintenant été mis au point, par électrophorèse à iso-électrofocalisation notamment, en tirant profit des différences de sialylation de l'EPO humaine naturelle et de la forme recombinante synthétisée par des cellules CHO (Lasne et de Ceaurriz, 2000 ; Lasne *et al.*, 2002).

2. Structure de l'EPO

L'EPO est une protéine fortement glycosylée puisque sa fraction glycannique représente environ 40% de sa composition globale (Figure 8). L'importante hétérogénéité de ses glycoformes explique ainsi que son poids moléculaire s'étende généralement de 34 à 39 kDa (Miyake *et al.*, 1977; Jacobs *et al.*, 1985; Lin *et al.*, 1985; Lai *et al.*, 1986; Egrie, 1990; Okano *et al.*, 1993). Cependant, certains auteurs rapportent des valeurs variant de 30 à 45 kDa (Cutler *et al.*, 1985; Davis *et al.*, 1987; Kung et Goldwasser, 1997), probablement en raison de techniques d'analyse ou procédés de production différents.

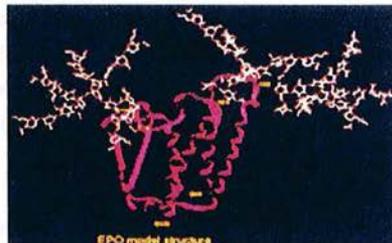


Figure 8 : Structure tridimensionnelle de l'EPO humaine (Kirin Inc.).

2.1. Chaîne peptidique

Contrairement à la composante glycanique, la structure de la chaîne peptidique est très stable pour toutes les molécules d'EPO d'une même espèce puisque sa biosynthèse est sous le contrôle d'un même gène. Le gène de la forme humaine code pour une séquence de 193 acides aminés, dont 27 constituent un peptide signal (ou "leader" hydrophobe) qui sera clivé avant sécrétion dans l'environnement extracellulaire. Au cours du passage de l'hormone dans la circulation, le résidu "arginine" de l'extrémité carboxyl-terminale, en position 166, est également perdu. L'EPO circulante est donc composée d'une chaîne de 165 acides aminés dont le poids moléculaire correspond à 18 kDa (Figure 9) (Miyake *et al.*, 1977 ; Lin *et al.*, 1985 ; Jacobs *et al.*, 1985 ; Okano *et al.*, 1993). Le clivage de cette Arg-166 peut également avoir lieu lors de la biosynthèse de la forme recombinante par les cellules CHO (Recny *et al.*, 1987 ; Imai *et al.*, 1990a) mais ceci n'est apparemment pas toujours le cas (Jacobs *et al.*, 1985 ; Lin *et al.*, 1985 ; Okano *et al.*, 1993 et Goto *et al.*, 1988).

En outre, les quatre cystéines de la séquence forment deux ponts disulfures, entre les positions 7 et 161, ainsi que 29 et 33. L'intégrité du pont 7-161 est particulièrement importante pour l'activité de l'EPO (Romanowski et Sytkowski, 1994).

L'analyse de la structure secondaire par dichroïsme circulaire indique que les hélices α représentent 50% de la structure, l'autre moitié aurait une configuration aléatoire; aucun feuillet β n'a été observé par cette technique alors que l'analyse prédictive par ordinateur en suggérerait la présence à hauteur de 25% (Lai *et al.*, 1986). Deux paires d'hélices α antiparallèles donneraient une structure globulaire à la protéine (Jelkmann, 1992).

La sérine Ser-126 constitue un site de O-glycosylation et les asparagines Asn-24, Asn-38 et Asn-83, trois sites de N-glycosylation (Flaharty, 1990 ; Jelkmann, 1992; Fisher, 1997). Lorsque l'EPO est exprimée par des cellules de mammifères, ces quatre sites sont tous glycosylés et aucun phénomène de macro-hétérogénéité (variations de l'état d'occupation des sites de glycosylation) n'a été rapporté.

Concernant l'EPO murine utilisée dans nos travaux, l'homologie de structure avec la forme humaine est de 80% en ce qui concerne la composition peptidique (76% pour la séquence d'ADN), ce qui est particulièrement élevé puisque cette valeur est de l'ordre de 40 à 60% pour les

divers IFN, l'interleukine-2 ou le GM-CSF (Romanowski et Sytkowski, 1994 ; Shoemaker et Mitscock, 1986). Les trois sites de N-glycosylation sont tous conservés, ainsi que le pont disulfure essentiel (Cys7-Cys161). Par contre, la sérine-126, site de O-glycosylation, et la cystéine-33, impliquée dans le deuxième pont disulfure, sont chacune substituées par des résidus proline (Romanowski et Sytkowski, 1994). L'activité biologique *in vivo* de la forme murine ne s'en trouve cependant pas diminuée (test sur souris); celle-ci étant également active sur les précurseurs érythroïdes humains (Shoemaker et Mitscock, 1986). En outre, selon Cutler *et al.* (1985), la masse moléculaire de l'EPO des deux espèces est similaire (40-45 kDa mesurée par gel filtration).

Le site de liaison de l'EPO à son récepteur semble localisé sur l'hélice la plus proche de l'extrémité carboxy-terminale de la molécule (Barthomeuf *et al.*, 1996).

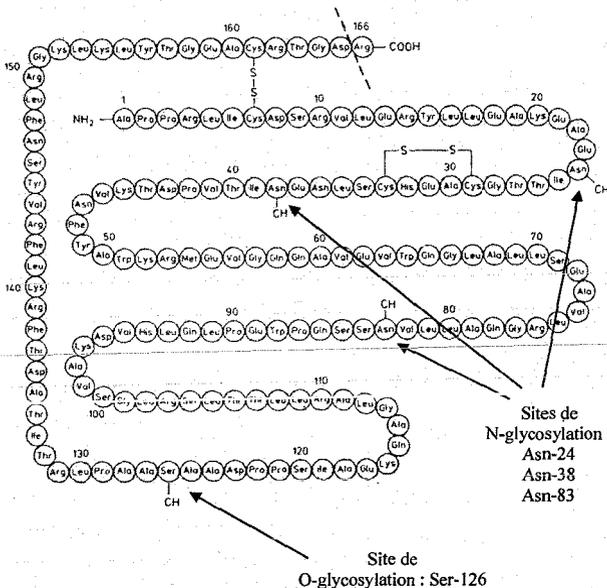


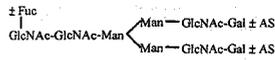
Figure 9 : Schéma de la structure peptidique de l'EPO humaine (d'après Jelkmann, 1992).

2.2. Glycosylation de l'EPO

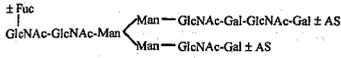
2.2.1. Structure des chaînes glycaniques de l'EPO

L'importante hétérogénéité caractérisant l'EPO provient de la grande diversité de structure des chaînes glycaniques qu'elle porte sur chacun de ses trois sites de N-glycosylation. De type complexe, elles sont composées de cinq monosaccharides principaux (mannose, galactose, N-acétylglucosamine, acide N-acétylneuraminique et fucose) organisés en structures multi-antennées. L'hétérogénéité repose principalement sur la taille des chaînes glycaniques et, en particulier, sur leur nombre d'antennes, de séquences N-acétyllactosamine Gal(β 1-4)GlcNAc, et de résidus sialylés terminaux. Un même site peut donc porter différentes chaînes d'une glycoforme à l'autre, et chacun des trois sites possède une glycosylation qui lui est propre. Ainsi, par exemple, le site N-24 est beaucoup moins sialylé que le site N-38 et le site N-83 ne présente quasiment que des chaînes tétra-antennées (94% selon Sasaki *et al.*, 1988). Pour illustrer ces données, la figure 10 présente la structure des différentes chaînes glycaniques de l'EPO rapportées dans la littérature (Sasaki *et al.*, 1987 et 1988). La distribution des différents types de chaînes glycaniques portées par l'EPO recombinante varie quelque peu selon les auteurs (Tableau 1) mais généralement, les formes tétra-antennées se trouvent très majoritaires (60 à 90%), les structures tri-antennées étant beaucoup moins nombreuses (10 à 25%) et les chaînes bi-antennées ne représentant qu'une proportion très faible (2 à 15%). Entre 20 et 35% des chaînes tétra-antennées portent une séquence N-acétyllactosaminique supplémentaire prolongeant une de leurs antennes (par une liaison β 1-3 au niveau d'un résidu de galactose terminal); une plus faible fraction en portent deux, voire trois parfois. Les chaînes tri-antennées peuvent également porter une séquence supplémentaire (Sasaki *et al.*, 1987 et 1988; Takeuchi *et al.*, 1988; Nimtz *et al.*, 1993; Watson *et al.*, 1994; Hokke *et al.*, 1995).

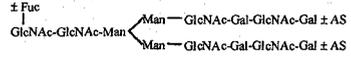
Le degré de sialylation de l'EPO recombinante représente un autre facteur important d'hétérogénéité puisqu'il apparaît assez variable d'un système à un autre (Sasaki *et al.*, 1987; Watson *et al.*, 1994). Plusieurs travaux rapportent néanmoins des proportions concordantes de chaînes glycaniques tétra, tri et bi-sialylées, de l'ordre de 50%, 35% et 15% respectivement; celles des formes mono et non sialylées sont généralement très minimes (Hokke *et al.*, 1995; Kanazawa *et al.*, 1999, Nimtz *et al.*, 1993). La fucosylation du résidu GlcNAc proximal (en α 1,6) des chaînes oligosaccharidiques est très fréquente, généralement dans 95 à 100% des cas (Watson *et al.*, 1994; Hokke *et al.*, 1995).



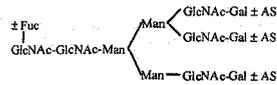
Chaîne bi-antennée



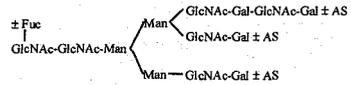
Chaîne bi-antennée-Lac1



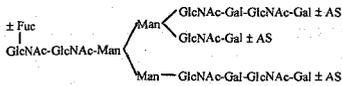
Chaîne bi-antennée-Lac2



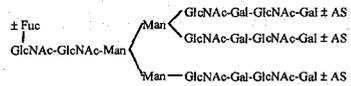
Chaîne tri-antennée



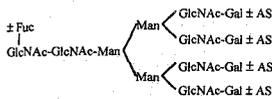
Chaîne tri-antennée-Lac1



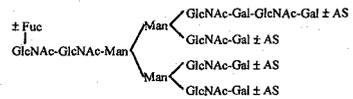
Chaîne tri-antennée-Lac2



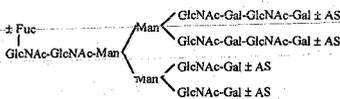
Chaîne tri-antennée-Lac3



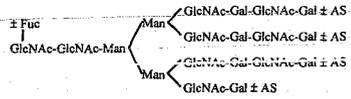
Chaîne tétra-antennée



Chaîne tétra-antennée-Lac1



Chaîne tétra-antennée-Lac2



Chaîne tétra-antennée-Lac3

Figure 10 : Principales structures de chaînes glycaniques décrites dans la littérature concernant l'EPO (d'après Sasaki *et al.*, 1987 et 1988). GlcNAc : N-acétylglucosamine; Gal : galactose; Man : mannose ; Fuc : fucose ; AS : acide sialique.

	Auteurs	Sasaki <i>et al.</i> , 1987	Sasaki <i>et al.</i> , 1988	Takeuchi <i>et al.</i> , 1988		Watson <i>et al.</i> , 1994	Hokke <i>et al.</i> , 1995	Nimtz <i>et al.</i> , 1993			
	Nature de l'EPO	EPO-u et EPO β (CHO) Chugai	EPO β (CHO) Chugai	EPO α (CHO) Kirin	EPO-u	EPO α (CHO) Amgen	EPO (CHO) Organon	EPO (BHK) Merckle			
Type de chaînes	Bi-ant..	5%	2%	6%	9%	7%	15%	5%			
	Tri-ant.	7%	11%	9%	13%	24%	11%	10%			
	Tri-Lac1	4%						-	10%		
	Tétra-ant.	32%	86%	90%	60%	46%	60%	56%			
	Tétra-Lac1	32%						22%	30%	7%	21%
	Tétra-Lac2	17%						6%	4%	1%	4%
	Tétra-Lac3	5%						2%	-	-	1%
					82%	62%	82%				

Tableau 1 : Structures des chaînes N-glycanniques de l'EPO urinaire (EPO-u) et recombinante (EPO α et β) selon la littérature.

Mentionnons également que des chaînes phosphorylées de type oligo-mannosidique ont déjà été observées sur de l'EPO produite par des cellules BHK (Nimtz *et al.*, 1995).

La chaîne oligosaccharidique liée en O, de type mucine, est nettement moins complexe. Selon Inoue *et al.* (1993), elle n'est en effet constituée, sur l'EPO urinaire, que d'un seul résidu GalNAc sialylé en $\alpha 2,6$ dans 30% des cas (par un résidu NeuAc). Par contre, trois types de chaînes O-glycosylées différentes ont été identifiées sur la forme recombinante (36%-32%-32%) : NeuAc($\alpha 2,3$)Gal($\beta 1,3$)NeuAc($\alpha 2,6$)GalNAc_{OH}, Gal($\beta 1,3$)NeuAc($\alpha 2,6$)GalNAc_{OH} et NeuAc($\alpha 2,3$)Gal($\beta 1,3$)GalNAc_{OH}. Notons toutefois que d'autres auteurs ont identifié la séquence NeuAc($\alpha 2,3$)Gal($\beta 1,3$)NeuAc($\alpha 2,6$)GalNAc_{OH} comme structure majoritairement rencontrée sur les deux formes d'EPO (Sasaki *et al.*, 1987).

En dépit de sa large utilisation en médecine humaine, l'EPO recombinante diffère quelque peu de la forme naturelle présente dans le sérum et l'urine. En effet, les cellules de hamster ne possèdent pas exactement le même équipement enzymatique que les cellules rénales humaines et la glycosylation de l'EPO recombinante est ainsi caractérisée par quelques particularités, notamment en ce qui concerne la sialylation. Son pI est moins acide que celui l'EPO naturelle, ce qui indique un degré de sialylation d'ensemble moins élevé (Lasne et de Ceaurriz, 2000). De plus, aucun acide neuraminique n'est lié en position $\alpha 2,6$ alors que 40% d'entre eux le sont sur l'EPO urinaire, les autres 60% étant liés en $\alpha 2,3$ comme sur la forme recombinante (Takeuchi *et al.*, 1988). Notons également qu'une petite fraction (2-3%) de ces résidus sialylés se trouvent

sous forme "glycolique" (Hokke *et al.*, 1990 et 1995). Par ailleurs, la distribution des différentes chaînes glycaniques pourrait présenter quelques variations entre les formes recombinante et naturelle (Takeuchi *et al.*, 1988). Contrairement à ce qui est généralement observé, une étude indique que cette dernière pourrait même être dépourvue de chaînes tétra-antennées (Skibeli *et al.*, 2001). Il faut cependant souligner que l'EPO naturelle est généralement analysée à partir d'échantillons provenant de sujets atteints d'anémie sévère présentant donc des concentrations élevées d'EPO circulante. Il est ainsi fort probable que la pathologie déclenchant l'augmentation de la synthèse d'EPO puisse aussi induire une modification significative de sa structure. Malgré ces légères différences de glycosylation, la forme recombinante possède une activité biologique *in vivo* équivalente à celle de l'EPO naturelle (Imai *et al.*, 1990a).

2.2.2. Rôles des chaînes glycaniques pour l'EPO

L'influence de la glycosylation sur les propriétés de l'EPO a fait l'objet de nombreuses études. La structure des chaînes N-glycaniques intervient en particulier sur l'activité biologique de la protéine. En effet, il a été montré que la N-déglycosylation entraînait la perte complète de son activité *in vivo*, alors que son activité *in vitro* restait inchangée ou pouvait même être augmentée. La structure glycanique apparaît donc ne pas intervenir sur les interactions entre la protéine et les cellules cibles de la moelle osseuse (Goldwasser *et al.*, 1974; Dordal *et al.*, 1985; Tsuda *et al.*, 1990; Takeuchi *et al.*, 1990; Imai *et al.*, 1990b; Wasley *et al.*, 1991; Yamaguchi *et al.*, 1991; Delorme *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1992). Par contre, le degré de sialylation s'avère être un facteur déterminant pour l'activité biologique *in vivo* en raison de son rôle dans l'élimination de la protéine au niveau hépatique (Briggs *et al.*, 1974; Fukuda *et al.*, 1989; Tsuda *et al.*, 1990; Wasley *et al.*, 1991). Une proportion élevée de chaînes glycaniques tétra-antennées permet également de ralentir son élimination hépatique (Fukuda *et al.*, 1989; Takeuchi *et al.*, 1989; Misaizu *et al.*, 1995). En outre, il a été montré que l'occupation des sites de N-glycosylation était essentielle pour que la sécrétion de l'EPO soit correcte (Dubé *et al.*, 1988; Delorme *et al.*, 1992). Enfin, les oligosaccharides ont également une fonction dans la conformation de la molécule et lui permettent en particulier de se stabiliser, notamment contre la dénaturation thermique (Tsuda *et al.*, 1990; Narhi *et al.*, 1991; Toyoda *et al.*, 2000). Par contre, la O-glycosylation, qui a fait l'objet de beaucoup moins d'études, ne semble pas avoir de rôle particulier concernant l'activité de l'EPO (Takeuchi *et al.*, 1990; Wasley *et al.*, 1991; Delorme *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1992).

2.2.3. Influence des conditions de culture sur la glycosylation de l'EPO

Les résultats concernant l'influence des conditions de culture sur la glycosylation spécifique de l'EPO sont assez récents et proviennent presque tous de la même équipe canadienne. L'hétérogénéité des glycoformes de l'EPO est notamment augmentée par une concentration élevée en ions ammoniums (>30 mM) qui induit la diminution simultanée de la sialylation terminale des N-glycannes, de la proportion de chaînes tétra-antennées et de la O-glycosylation dans son ensemble (Yang et Butler, 2000a, b et 2002). De plus, une concentration élevée en glucosamine dans le milieu de culture (>10 mM) accroît également l'hétérogénéité de l'EPO. Dans les deux cas, le phénomène semble lié à l'augmentation du pool intracellulaire des UDP-N-acétylhexosamines (UDP-GlcNAc et UDP-GalNAc), les précurseurs nucléotidiques des oligosaccharides (Yang et Butler, 2002). D'autre part, l'augmentation de l'hétérogénéité de l'EPO a également été observée en cours de culture (discontinue et sans sérum) en raison d'une dégradation protéolytique (analyses western-blot et IEF). Par contre, le profil glycanique global et la sialylation n'étaient pas modifiés et une augmentation de la supplémentation en glutamine (16-20 mM) permettait d'éviter cette dégradation (Yang et Butler, 2000c). Enfin, Yoon *et al.* (2003) ont produit une EPO recombinante par culture de cellules CHO à 33°C. Son profil glycanique, sa sialylation et son activité biologique *in vivo* se sont révélés comparables à ceux de la protéine produite à 37°C. Cependant, il est intéressant de noter que la concentration maximale atteinte à 33°C était supérieure d'un facteur 2,5.

3. Procédés de production d'EPO

3.1. Systèmes d'expression

Les cellules de hamster sont les hôtes de choix des différents procédés de production commerciale de l'EPO recombinante. En effet, les cellules CHO sont utilisées pour produire les deux formes pharmaceutiques principales (epoetin α et β), tandis que la 3^e forme (epoetin ω), plus récente, est synthétisée par des cellules BHK. Ces deux lignées cellulaires permettent d'obtenir les productivités les plus élevées tout en assurant une fidélité de glycosylation satisfaisante par rapport à l'hormone naturelle. D'autres systèmes d'expression ont également été mis au point pour produire de l'EPO recombinante à titre expérimental (Tableau 2).

3.2. Procédés de culture en masse pour la production d'EPO (cellules CHO ou BHK)

Plusieurs systèmes de culture en masse en bioréacteur ont été mis au point à l'échelle du laboratoire (Tableau 3). L'ensemble des données quantitatives est rarement disponible, ce qui rend la comparaison des résultats assez difficile (l'activité spécifique de l'EPO étant également variable, mais généralement de l'ordre de 50 à 200 U/ μ g).

Cellule hôte	Particularités	Références
Cellules CHO	Absence de sialylation en α 2,6 sur les résidus Gal terminaux (ST6 Gal I) Taux variable d'acide sialique de type NeuGc (0-80%) Production d'EPO en discontinu : 500 U/ml	Lin <i>et al.</i> , 1985 - Amgen Jacobs <i>et al.</i> , 1985 - Genetics Institute Yang et Butler, 2000a - Cangene
Cellules BHK	Absence de sialylation en α 2,6 sur les résidus Gal terminaux (ST6 Gal I) Présence de chaînes de type : Gal β 1-3GlcNAc β 1-noyau Production d'EPO en discontinu : 150 U/ml	Dubé <i>et al.</i> , 1988 Tsuda <i>et al.</i> , 1988 Fibi <i>et al.</i> , 1995 Goto <i>et al.</i> , 1988 - Snow Brand Milk Products
Cellules lymphoblastoïdes B humaines RPMI 1788 (non tumorale)	Glycosylation de type humain avec quelques structures inhabituelles Activité biologique <i>in vivo</i> équivalente à l'EPO-CHO et EPO-u Production d'EPO en discontinu : 1350 U/ml	Lopez <i>et al.</i> , 1994
Cellules Namalwa (lymphoblastoïdes B humaines tumorales)	Glycosylation de type humain Activité biologique <i>in vivo</i> équivalente à l'EPO-u	Yanagi <i>et al.</i> , 1989
Cellules Bowes (mélanome humain)	Activité biologique <i>in vivo</i> très faible (5-15%) Production d'EPO en discontinu : 100 U/ml	Keay <i>et al.</i> , 1990
Cellules Hela humaines (carcinome)	Glycosylation de type humain Activité biologique <i>in vivo</i> équivalente à l'EPO-CHO	Ohashi <i>et al.</i> , 1989
Cellules murines ψ 2 (NIH/3T3)	Sialylation de type NeuGc uniquement Degré de sialylation faible → activité biologique <i>in vivo</i> faible (25%) Production d'EPO en discontinu : 300 U/ml	Goto <i>et al.</i> , 1988
Cellules murines L929	Sialylation de type NeuGc uniquement Production d'EPO en discontinu : 8 U/ml	Terashima <i>et al.</i> , 1994
Cellules murines C127	Sialylation de type NeuGc uniquement Présence de résidus Gal en α 1,3	Tsuji <i>et al.</i> , 1990
Cellules de tabac BY2	Glycosylation de type végétal (absence de sialylation sur les résidus Gal terminaux) → pas d'activité biologique <i>in vivo</i>	Matsumoto <i>et al.</i> , 1995
Cellules d'insecte/baculovirus	Production d'EPO en discontinu : 500-2000 U/ml Glycosylation de type insecte (absence de sialylation sur les résidus Gal terminaux) → pas d'activité biologique <i>in vivo</i>	Wojchowski <i>et al.</i> , 1987a Quelle <i>et al.</i> , 1989

Tableau 2 : Les différents systèmes d'expression d'EPO recombinante rapportés dans la littérature.

Système de culture	Performances (selon les données publiées)	Références
Bioréacteur à lit fluidisé perfusé (Cytopilot 2 L - microporteurs - 0%svf)	Concentration max. : 980 U/ml Productivité spécifique : 125 U/10 ⁶ cell/j (max. : 200 U/10 ⁶ cell/j) Production de 28 000 kU après 48 jours	Wang <i>et al.</i> , 2002
Bioréacteur agité continu (0%svf)	Concentration max. : 394 U/ml Productivité spécifique : 98 U/10 ⁶ cell/j	
Bioréacteur agité discontinu (0%svf)	Concentration max. : 425 U/ml Productivité spécifique : 77 U/10 ⁶ cell/j	
Flacon agité (0%svf)	Concentration max. : 200 U/ml Productivité spécifique : 178 U/10 ⁶ cell/j	
Flacon de Roux (0%svf)	Concentration max. : 210 U/ml Productivité spécifique : 180 U/10 ⁶ cell/j	
Bioréacteur à fibres creuses et microporteurs (recirculation 2x2 L - 10%svf)	Concentration max.: 1550 U/ml Production de 450 µg après 14 jours	Inoue <i>et al.</i> , 1999a
Bioréacteur agité (semi-continu 1-1.2 L - 10%svf)	Concentration max.: 18 µg/ml Productivité spécifique max. : 30 µg/10 ⁶ cell/j Productivité spécifique moy. : 10 µg/10 ⁶ cell/j	Yu <i>et al.</i> , 1991
Bioréacteur à lit fixe à flux radial (continu 2 L - 5%svf)	Données confidentielles (unités relatives)	Yoshida <i>et al.</i> , 1991 (Kirin)
Flacons roulants en série (discontinu) phase de production : 0%svf	Données confidentielles (unités relatives)	Inoue <i>et al.</i> , 1995 (Kirin) Tsao <i>et al.</i> , 1992 (Johnson)

Tableau 3 : Procédés de culture en masse pour la production d'EPO décrits dans la littérature.

4. Procédés de purification et d'analyse de l'EPO

4.1. Purification de l'EPO

Plusieurs types de procédés de purification de l'EPO ont été mis au point. Ainsi, dans le cadre d'applications commerciales ou analytiques (spectrométrie de masse), des procédés de purification très poussée ont été nécessaires. La méthode de référence (Miyake *et al.*, 1977) comprend 7 étapes : chromatographie par échange d'anions (DEAE-agarose), précipitation à l'éthanol, traitement au phénol, chromatographie par échange de cations (sulfopropyl-sephadex), gel filtration (sephadex G-100) et chromatographie d'adsorption (hydroxylapatite). Grâce à un facteur de purification proche de 1000, cette technique permet d'obtenir une activité spécifique de 70 000 U/mg en récupérant 20% de l'EPO initiale.

Bibliographie

D'autres auteurs ont également décrit des procédés de purification conduisant à une EPO très pure. Par exemple, Krystal *et al.* (1986) atteignent une activité spécifique de 80 000 U/mg en utilisant un protocole en 5 étapes dont le rendement global de récupération est de 25% : chromatographie d'affinité (Affi-gel Blue), chromatographie à focalisation isoélectrique, chromatographie d'affinité sur lectine (Wheat germ lectin), HPLC en phase inverse et électrophorèse préparative (SDS-PAGE).

Des modes de chromatographie aussi divers que la phase inverse (Fibi *et al.*, 1991 ; Lee *et al.*, 1999), l'échange d'anions (Ben Ghanem *et al.*, 1994 ; Quelle *et al.*, 1989) ou l'interaction hydrophobe (Lee-Huang, 1980) ont aussi été utilisés, le plus souvent en complément d'autres techniques.

Notons également un nouveau procédé de purification de l'EPO à visée industrielle mettant à profit l'affinité du phenylboronate-agarose pour les oligosaccharides présents sur les glycoprotéines (grâce à leur fonction 1,2-*cis*-diol). Ce procédé associe aussi deux autres étapes chromatographiques, par échange d'anions, puis par exclusion de taille (Zanette *et al.*, 2003).

Pour les applications analytiques ne nécessitant pas un degré de pureté très élevé, la méthode de choix est en général l'immuno-purification (Yang and Butler, 2000b et c ; Schlenke *et al.*, 1999) car, précédée d'une étape de dessalement ou de concentration, elle permet par sa grande spécificité, de réduire le nombre d'étapes nécessaires à l'élimination des principaux contaminants.

4.2. Analyse de la glycosylation de l'EPO

L'EPO a fait l'objet de nombreux travaux concernant la structure de sa composante glycanique (Sasaki *et al.*, 1987 and 1988; Recny *et al.*, 1987; Takeuchi *et al.*, 1988 and 1991; Tsuda *et al.*, 1990; Hokke *et al.*, 1995). Plusieurs types de techniques d'analyse ont été utilisées pour cela ; certaines, généralement basées sur la chromatographie ou l'électrophorèse, permettent de fournir des profils caractéristiques de son état de glycosylation, d'autres, plus complexes telles que la spectrométrie de masse ou la résonance magnétique nucléaire, donnent accès à la séquence précise de ses chaînes oligosaccharidiques. Dans le cadre de l'étude de l'influence du procédé de culture sur la structure de l'EPO, il nous a semblé intéressant de nous orienter vers

l'électrophorèse capillaire ; en effet, cette technique permet de caractériser d'une manière simple et rapide la glycosylation de notre protéine produite dans différentes conditions de culture ; elle présente en outre l'avantage d'une capacité séparative élevée, et enfin, les quantités réduites de protéine qu'elle requiert sont compatibles avec les volumes de prélèvement limités qu'il est possible de faire en cours d'une culture.

4.2.1. L'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique très sensible qui a été introduite en 1965 mais qui ne s'est développée que dans les années 80' grâce aux acquis de la chromatographie "haute pression" (HPLC). Elle présente de nombreux atouts tels qu'une capacité de séparation élevée, une rapidité et une simplicité d'analyse et un coût de fonctionnement réduit, mais sa faible reproductibilité a longtemps nuit à son essor. Actuellement, son champ d'application est principalement celui de l'analyse de produits pharmaceutiques, en particulier l'identification des composés et la détection des impuretés (Nishi, 1999).

Son principe repose sur la migration dans un capillaire des espèces chargées en solution sous l'effet d'un champ électrique. Le capillaire est généralement constitué de verre de silice qui peut parfois être recouvert d'un revêtement particulier spécifique de certaines applications. Son diamètre très faible (15-150 μm) permet de réduire les phénomènes de diffusion rencontrés en chromatographie. Sa longueur peut atteindre 80 cm, la différence de potentiel appliquée aux électrodes est de l'ordre de 20-30 kV et l'intensité en résultant ne doit pas dépasser 100 μA afin d'éviter l'échauffement du capillaire.

Le procédé d'EC le plus courant est l'EC de zone (CZE) dans lequel le capillaire est traversé par l'électrolyte qui peut être un tampon acide (phosphate ou citrate), basique (borate) ou un ampholyte. L'EC micellaire (MEKC) est une variante du procédé précédent : un composé chargé (SDS par exemple) est ajouté à la phase mobile pour former des micelles chargées qui emprisonnent les composés neutres plus ou moins efficacement en fonction de leur affinité hydrophile/hydrophobe. L'EC sur gel (CGE) est la transposition au capillaire de l'électrophorèse sur gel de poly-acrylamide ou d'agarose. Le capillaire est rempli d'un électrolyte contenant un gel qui minimise les phénomènes de convection et de diffusion. Enfin, l'EC à iso-électrofocalisation (CIEF) permet de séparer des composés en fonction de leur point iso-électrique (pI) grâce à un gradient de pH stable et linéaire dans un capillaire à paroi traitée contenant un ampholyte et plongeant dans H_3PO_4 à l'anode et dans NaOH à la cathode.

Par ses divers modes de fonctionnement, l'EC offre donc de vastes possibilités d'analyse pour l'étude de la glycosylation de l'EPO.

4.2.1.1. Analyse de la protéine entière : séparation des glycoformes

La diversité de structure des chaînes glycaniques de l'EPO confère des propriétés physico-chimiques propres à chaque glycoforme de l'EPO. Ainsi, leur charge, facteur essentiel à la séparation électrophorétique, est particulièrement influencée par le nombre d'acides sialiques qu'elles portent, tandis que leur taille dépend directement du nombre de résidus oligosaccharidiques constituant leurs chaînes glycaniques.

Tran *et al.* (1991) ont défini des conditions opératoires de CZE (tampon acétate/phosphate pH 4, capillaire de silice pré-équilibré pendant 10 heures) permettant d'obtenir un profil caractéristique de 4 pics à partir d'échantillons de 0.1-0.3 mg/mL d'EPO recombinante commerciale. Un profil similaire a pu être retrouvé dans ces conditions par Zhou *et al.* (1998) en analysant une autre EPO recombinante (Figure 11).

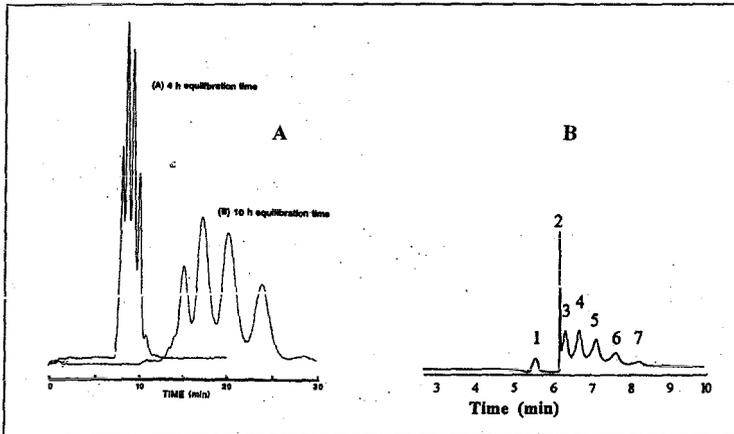


Figure 11 : Analyses d'EPO entières (recombinantes et commerciales) obtenus par CZE (tampon acétate/phosphate pH 4, capillaire de silice pré-équilibré pendant 10 h). A : Tran *et al.* (1991). B : Zhou *et al.* (1998).

En modifiant le tampon de migration (tricine/NaCl/1.4-diaminobutane/urée pH 6.2), Watson et Yao (1993) ont réussi à séparer 6 glycoformes différentes. La concentration d'EPO (qualité commerciale) utilisée était d'1 mg/mL mais la limite de sensibilité de la méthode a été évaluée à 0.01 mg/mL et son domaine de linéarité entre 0.03 et 1.9 mg/mL. Après désialylation de l'EPO (traitement par neuraminidase), il est intéressant d'observer une nette amélioration de la résolution du profil (9 pics distincts) (Figure 12). Par ailleurs, l'introduction supplémentaire de chlorure de nickel à ce tampon de migration permet la séparation complète de l'EPO et de l'albumine humaine, généralement présente dans les préparations d'EPO (Bietlot et Girard, 1997).

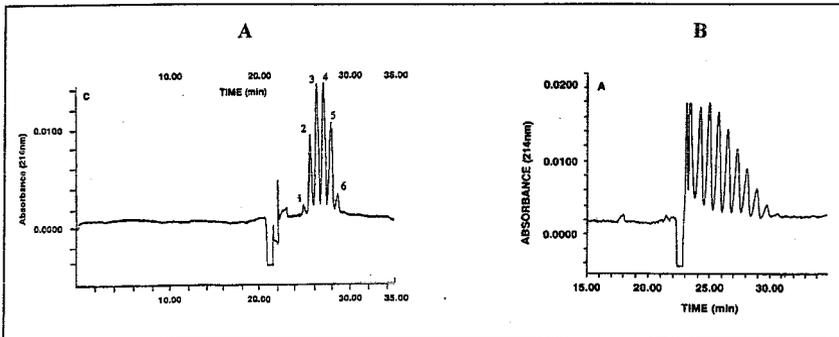


Figure 12 : Analyses d'EPO entière (recombinante et commerciale) par CZE (tampon tricine/NaCl/1.4-diaminobutane/urée pH 6.2, capillaire de silice), avant (A) et après (B) désialylation enzymatique (d'après Watson et Yao, 1993).

En utilisant un capillaire DB-1 muni d'un revêtement initialement prévu pour la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et en modifiant la nature du tampon de migration, Kinoshita *et al.* (2000) ont amélioré la qualité de cette méthode dont la résolution s'avérait diminuer très fortement après un nombre limité d'analyses. Dans ces nouvelles conditions, le nombre de pics séparés a pu être porté à 8 (Figure 13).

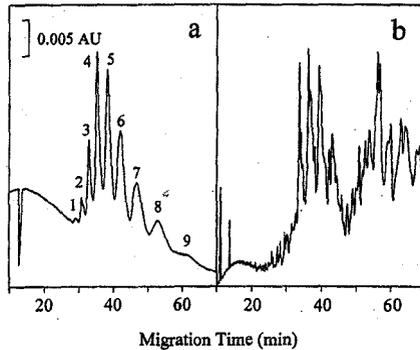


Figure 13 : Analyse de deux types d'EPO entières (recombinantes) par EC (tampon acétate 10 mM, pH 5.7 contenant 0.5% d'hydroxypropylmethylcellulose, capillaire DB-1). a : EPO produite par cellules BHK (purification non indiquée); b : préparation commerciale d'EPO contenant de la gélatine (pics de l'EPO situés entre 35 et 45 min.) (d'après Kinoshita *et al.*, 2000).

Enfin, sept glycoformes ont pu être séparées en cIEF par Cifuentes *et al.* (1999) à partir de 250 µg d'EPO pure (qualité Pharmacopée européenne), son pI ayant été observé entre 3.78 et 4.69. La méthode de CZE mise au point (tampon tricine/NaCl/acétate de sodium/urée/putrescine, pH 5.5, capillaire de silice) s'est révélée meilleure sur le plan de la reproductibilité bien que la résolution du profil et le temps d'analyse soient moins bons qu'en cIEF (Figure 14). Des essais préliminaires destinés à distinguer l'EPO urinaire de l'EPO recombinante ont été également effectués par CZE dans ces mêmes conditions d'analyse, mais le détecteur UV manque de sensibilité pour caractériser précisément les pics obtenus (De Frutos *et al.*, 2003).

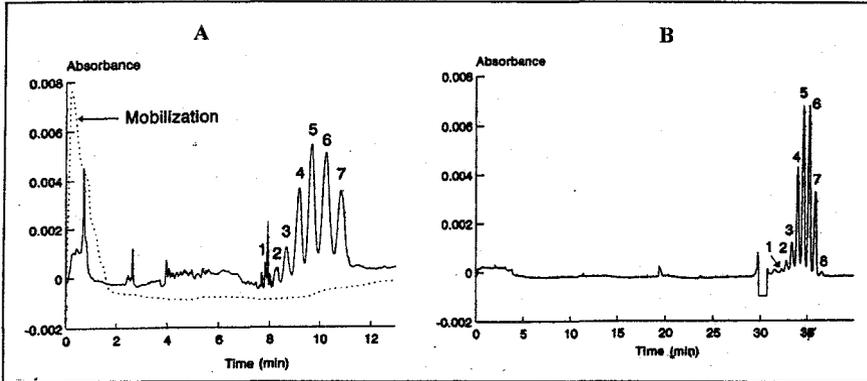


Figure 14 : Analyses d'EPO entière (recombinante) obtenus par cIEF (A) et CZE (B) (tampon tricine/NaCl/acétate de sodium/urée/putrescine, pH 5.5, capillaire de silice) (d'après Cifuentes *et al.*, 1999).

4.2.1.2. Analyse après digestion protéolytique : "peptide-mapping"

La micro-hétérogénéité de glycosylation de l'EPO peut également être caractérisée de façon rapide et sensible par "peptide mapping" après digestion protéolytique (trypsin). Par cette technique, il est possible de séparer 12 glycopeptides ainsi qu'une quinzaine de peptides non glycosylés à partir de quantités d'EPO de l'ordre de 200 μg (Rush *et al.*, 1993; Boss *et al.*, 1995) (Figure 15). De plus, il est intéressant de noter que pour cette application particulière, l'efficacité de séparation de l'EC a été estimée beaucoup plus élevée que celle de la HPLC (Zhou *et al.*, 1998).

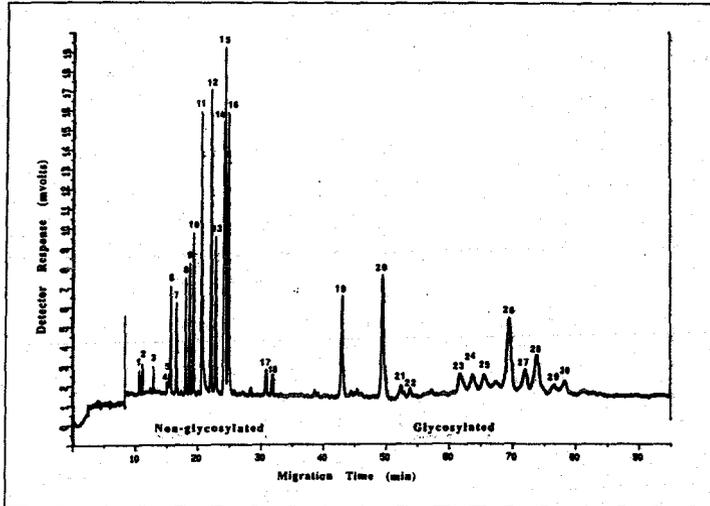


Figure 15 : "Peptide mapping" de l'EPO (recombinante) obtenu après digestion protéolytique par la trypsine et analyse par EC (3.75 mg/mL d'EPO, tampon phosphate 40 mM, pH 2.5 contenant 100 mM d'acide heptanesulfonique, capillaire de silice) (d'après Rush *et al.*, 1993).

4.2.1.3. Analyse après digestion glycosidasique : analyse des chaînes glycaniques

Enfin, la glycosylation de l'EPO peut être étudiée à travers l'analyse directe de ses chaînes glycaniques isolées après digestion par une glycosidase (PNGase F).

La méthode mise au point par Hermentin *et al.* (1994) s'est révélée très reproductible (CV<0.20%), les quantités de glycannes nécessaires ayant été évaluées à quelques femtomoles, environ 4000 fois moins qu'en HPAE-PAD (chromatographie par échange d'anions) et le profil des glycannes de l'EPO analysée (de qualité commerciale) présente 7 pics distincts (capillaire de silice, tampon sulfate d'ammonium / phosphate de sodium / 1.5-diaminopentane, pH 7.0, détection UV) (Figure 16).

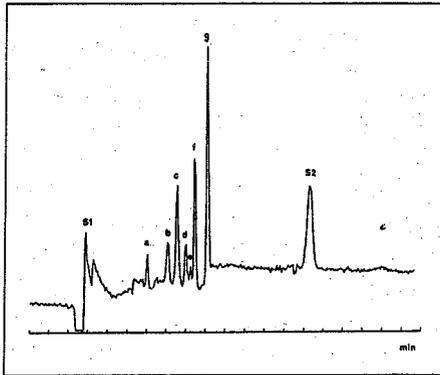


Figure 16 : Analyse par EC des chaînes glycaniques de l'EPO (recombinante) après digestion glycosidasique par la PNGase (tampon sulfate d'ammonium / phosphate de sodium / 1.5-diaminopentane, pH 7.0, capillaire de silice, détection UV) (d'après Hermentin *et al.*, 1994).

Le marquage fluorescent des glycanes clivés par la PNGase F permet d'améliorer encore le seuil de détection de la technique. Dans ces conditions (tampon acétate/ oxyde de polyéthylène, capillaire de silice), Chen et Evangelista (1998) ont obtenu, à partir de 100 µg d'EPO, un profil de glycosylation caractéristique d'une dizaine de pics rassemblés en 3 groupes principaux. La désialylation des glycanes (par hydrolyse douce) permet en outre d'améliorer la résolution du profil obtenu en diminuant la vitesse de migration des espèces en solution (cf. Résultats et discussion, Figure 45).

4.2.1.4. Couplage EC-spectrométrie de masse

Dans le cadre de la caractérisation de glycopeptides tels que l'EPO, le couplage de la spectrométrie de masse et de l'EC représente un outil d'analyse particulièrement puissant puisqu'il permet d'allier les capacités séparatives élevées de l'EC avec une technique d'identification très précise et très sensible. L'EPO a fait l'objet de ce type d'analyse sous forme entière ou après digestion protéasique; le profil des chaînes glycaniques, l'occupation et la micro-hétérogénéité spécifique de chaque site de glycosylation ont pu ainsi être déterminés (Zhou *et al.*, 1998 ; Boss *et al.*, 1998).

4.2.2. Les autres techniques : FACE, HPLC, HPAEC, IEF, SM, RMN

En alternative à l'électrophorèse capillaire, deux techniques ont également été utilisées pour l'analyse des chaînes glycaniques de l'EPO après clivage enzymatique : d'une part, la chromatographie par échange d'anions (HPAEC) permet de séparer les différentes chaînes de l'EPO selon leur degré de sialylation (Rice *et al.*, 1992 ; Nimtz *et al.*, 1993 ; Watson *et al.*, 1994 ; Yang et Butler, 2000b et c; Skibeli *et al.*, 2001), et d'autre part, l'électrophorèse sur gel couplée à une détection par fluorescence (FACE) permet de visualiser un profil de glycosylation de l'EPO basé sur la taille et la sialylation des différentes chaînes glycaniques (Morimoto *et al.*, 1999 ; Yang et Butler, 2000b et c) (Figure 17).

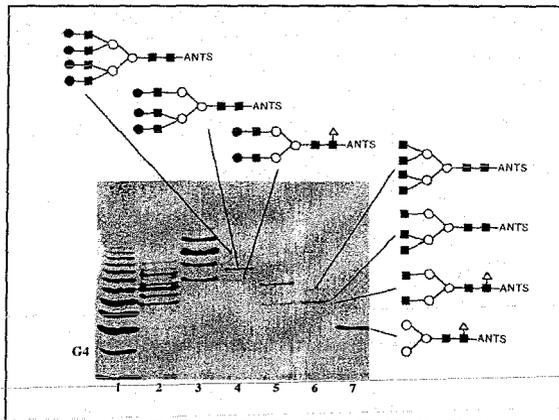


Figure 17 : Analyse des chaînes glycaniques de l'EPO (recombinante et commerciale) par FACE, avant (2) et après désialylation (3), ainsi qu'après traitement combiné neuraminidase+galactosidase (5); (1): marqueur de taille (unités glucose); (4), (6) et (7): standards d'oligosaccharides marqués par l'ANTS (acide amino-naphtalène-1,3,6-trisulphonique) (Δ : Fuc, ■ : GlcNAc, ● : Gal, ○ : Man) (d'après Morimoto *et al.*, 1999).

Bibliographie

En outre, l'iso-électrofocalisation (IEF) représente une technique particulièrement adaptée à l'étude de la sialylation de l'EPO puisque le point iso-électrique (pI) de chaque glycoforme est étroitement dépendant de son contenu en acides sialiques. Ainsi, Gokana *et al.* (1997) ont réussi à séparer plus de 14 isoformes de l'EPO par électrophorèse sur gel à iso-électrofocalisation (PAGIF). Cette technique a également été utilisée pour comparer les formes (humaine, recombinante et murine) de la protéine (Imai *et al.*, 1990a ; Tam *et al.*, 1991 ; Cifuentes *et al.*, 1999 ; Lasne et de Ceaurriz, 2000 ; Lasne *et al.*, 2002) et son couplage à l'électrophorèse sur gel classique (électrophorèse à deux dimensions) constitue un moyen simple et rapide d'évaluer l'hétérogénéité de taille et de sialylation de l'EPO (Wimmer *et al.*, 1994 ; Yang et Butler, 2000a ; Skibeli *et al.*, 2001) (Figure 18).

Enfin, la séquence précise des oligosaccharides composant les chaînes glycaniques, ainsi que la distribution quantitative des différents glycoformes de l'EPO peuvent être déterminées par les deux techniques très performantes que sont la spectrométrie de masse (SM) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) ; cependant, leur complexité et le matériel qu'elles requièrent ne sont pas comparables avec celles des techniques précédemment citées. Le plus souvent, elles sont utilisées en couplage avec une technique chromatographique de fractionnement préliminaire (HPLC ou HPAEC) permettant de simplifier l'analyse en réduisant le nombre d'espèces en présence (Sasaki *et al.*, 1987 et 1988 ; Nimitz *et al.*, 1993 ; Watson *et al.*, 1994 ; Hokke *et al.*, 1995 ; Rush *et al.*, 1995 ; Kanazawa *et al.*, 1999 ; Kawasaki *et al.*, 2000 ; Skibeli *et al.*, 2001 ; Zhou *et al.*, 1998 ; Stanley et Poljak, 2003).

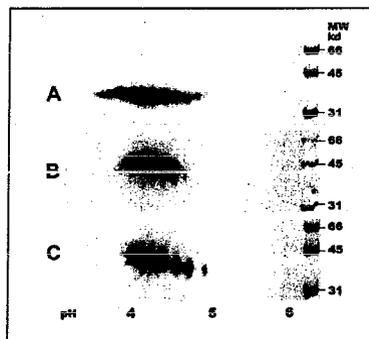


Figure 18 : Electrophorèse bi-dimensionnelle (SDS-PAGE et IEF) de l'EPO humaine sérique (A) et de deux EPO recombinantes, α (B) et β (C) (d'après Skibeli *et al.*, 2001).

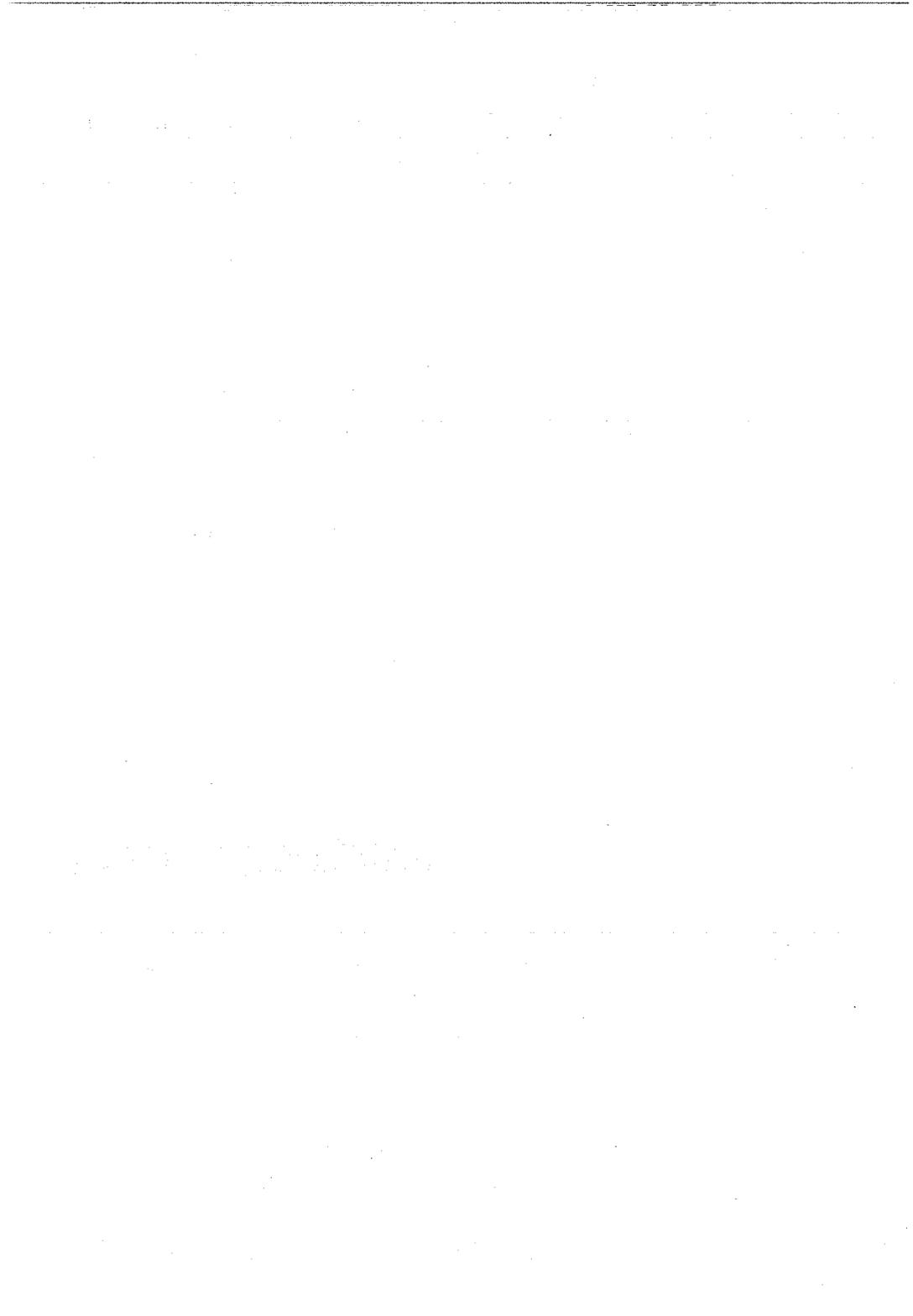
IV. Positionnement de l'étude

La glycosylation des protéines n'étant pas encore suffisamment maîtrisée pour concevoir des procédés de production assurant la synthèse de glycoformes déterminées, en particulier celles dont l'activité biologique est maximale, nous avons souhaité étudier l'influence du procédé de culture en mode discontinu (durée de culture et adaptation sans sérum) sur la glycosylation des protéines recombinantes.

L'érythropoïétine a été choisie comme molécule "modèle" pour notre travail en raison de sa forte composante glycanique. En outre, comme nous venons de le voir, cette protéine recombinante est commercialisée depuis 1988, et fait donc l'objet d'une littérature abondante, permettant de fournir une base pour la mise au point ou l'adaptation des techniques de purification et d'analyse, ainsi que pour la discussion de nos résultats. De plus, nous avons retenu les cellules CHO comme système d'expression. En effet, ce sont les cellules les plus utilisées pour la production de glycoprotéines recombinantes, en particulier pour l'EPO, car elles associent rendements élevés et qualité de glycosylation. Concernant la technique de purification, notre choix s'est porté sur l'immuno-affinité, dont la haute spécificité permet d'obtenir un degré de pureté élevé tout en limitant le nombre d'étapes du procédé. Enfin, l'analyse de la glycosylation de l'EPO a été réalisée par électrophorèse capillaire en raison de son important pouvoir de résolution et de sa grande sensibilité. Nous avons préféré analyser les chaînes glycaniques de l'EPO (après digestion glycosidasique) plutôt que la protéine entière, car les profils ainsi obtenus fournissent des informations plus précises sur la composition oligosaccharidique (degré de sialylation et longueur des chaînes en particulier).



MATERIELS ET METHODES



MATERIELS ET METHODES

I. Génération du clone CHO recombiné producteur d'EPO

1. Construction moléculaire du vecteur d'expression eucaryotique

Le gène de l'érythropoïétine murine nous a été fourni par notre partenaire industriel (Aventis Pharma, Vitry sur Seine) sous la forme d'un plasmide contenant une cassette d'expression constitué d'un promoteur CMV modifié, du gène codant pour l'EPO murine, et d'une séquence poly-adényl (pCMV-epo-polyA).

Afin de pouvoir être exprimée de façon stable par des cellules animales, la cassette pCMV-epo-polyA (1.5 kb) a été insérée dans un vecteur d'expression eucaryotique commercial pSV40/zeo (3.4 kb) (Invitrogen – réf. V50420) conférant la résistance à la zéocine (Figure 19).

Pour cela, la cassette a été extraite du plasmide d'origine par restriction enzymatique au niveau de deux sites uniques : *EcoR* I et *Hind* III. De plus, le vecteur d'accueil a été digéré par ces mêmes enzymes afin de lui conférer des extrémités complémentaires à celles de l'insert. Les enzymes de restriction (Biolabs) ont été utilisées à raison de 5 à 10 UI / μg d'ADN (incubation à 37°C pendant 3 h).

La taille des différents produits obtenus a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (Sigma) dans un tampon TBE 0.5x (0.045 M Tris-borate / 0.001 M EDTA) et après coloration au bromure d'éthidium qui s'intercale entre les bases de l'ADN. Après migration sous une tension de 60 à 100 V, la visualisation a été effectuée sous lumière UV par comparaison avec un marqueur de taille (Biolabs).

L'insert et le vecteur ont ensuite été purifiés par extraction (kit QIAEX II Agarose Gel Extraction - Quiagen) après électrophorèse sur gel d'agarose de type "préparatif", à 1% également.

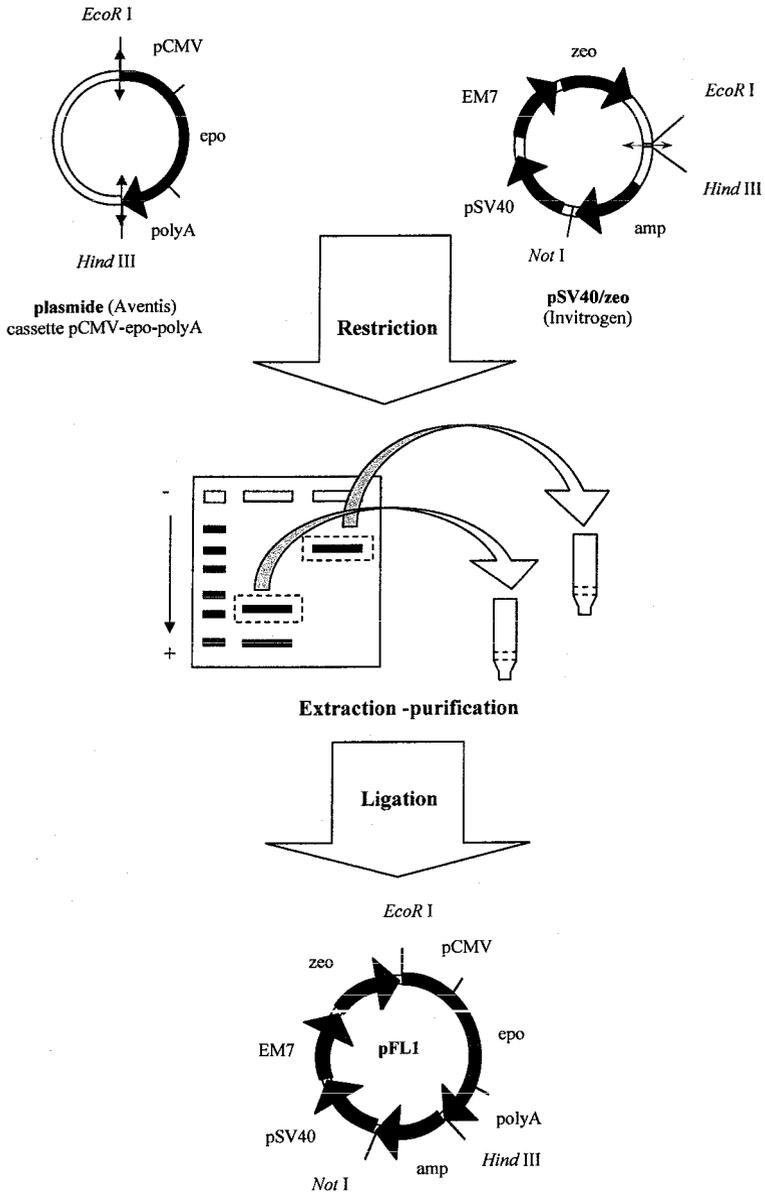


Figure 19 : Etapes de la construction du vecteur d'expression eucaryotique de l'EPO.

La ligation enzymatique de l'insert et du vecteur ainsi purifiés a été réalisée en présence d'une ligase (T4 ligase - Boehringer) à 16°C pendant une nuit. Le rapport molaire utilisé était de 4 en faveur de l'insert (60 ng de vecteur pour 100 ng d'insert).

Les produits de la ligation ont ensuite été précipités à -20°C en présence d'éthanol absolu (100%) et d'acétate de sodium 3 M (10%), avant d'être lavés à l'éthanol à 70%, séchés et redissous dans l'eau.

2. Transformation bactérienne

Le mélange obtenu après ligation enzymatique a ensuite été utilisé directement pour transformer des bactéries (*Escherichia coli* DH5 α) rendues perméables à l'ADN ("électro-compétentes") par traitement à l'eau froide (4°C) et au glycérol (10%).

L'électroporation a été réalisée en mettant en présence l'ADN provenant de la ligation et des bactéries électro-compétentes en croissance exponentielle dans une cuvette (BioRad) (50 μ L de solution bactérienne en milieu SOC : glucose 20 mM, bacto-tryptone 2%, extrait de levure 0.5%, NaCl 100 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM). Une décharge électrique (2.5 kV, 25 μ F et 200 Ω) a ensuite été appliquée aux bactéries (appareils Gene Pulser et Gene Controller - BioRad). Après une incubation de 45 min à 37°C en milieu SOC sans antibiotique, celles-ci ont été remises en culture sur milieu solide LB (milieu Luria-Bertani + Agar 2% : bacto-tryptone 10 g/L, Bactoyeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.5 - Sigma) contenant l'antibiotique de sélection des clones recombinants (ampicilline à 50 μ g/mL - Boehringer).

Plusieurs clones bactériens positifs se sont développés et ont été conservés à -80°C dans un milieu glycérol-LB (50%-50%).

Parmi ceux-ci, un clone présentant un fort contenu plasmidique (évaluation par observation sur gel après pré-culture en suspension à 200 tr/min) a ensuite été cultivé sous un volume de 150 mL en milieu sélectif (LB + ampicilline) afin de produire une quantité de vecteur pFL1 suffisante aux essais de transfection de cellules CHO (250 μ g). Ainsi, après lyse cellulaire alcaline et précipitation de l'ADN chromosomique, des ARN et des protéines, l'ADN plasmidique a été extrait (Hybaid Quick Flow Plasmid kit), précipité à l'éthanol absolu, puis redissous dans l'eau (500 μ L). La concentration finale a été évaluée à 0.5-1 μ g/ μ L par électrophorèse sur gel.

3. Transfection de cellules CHO

Afin de contrôler l'étape de transfection des cellules CHO par le plasmide pFL1, un deuxième vecteur d'expression eucaryotique, pSAC1, contenant le gène de l' α 1,3/1,4 fucosyltransférase III (FUT-III) a également été utilisé (Tahrat-Benslimane, 2002) (Figure 20).

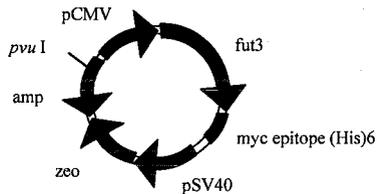


Figure 20 : Représentation schématique du plasmide pSAC1 contenant le gène de la FUT-III.

Les deux vecteurs ont été linéarisés par restriction enzymatique : pFL1 par *Not* I, et pSAC1 par *Pvu* I à raison de 30 UI d'enzyme (Biolabs) pour 15 μ g d'ADN.

Après vérification par électrophorèse sur gel d'agarose de la linéarisation effective des deux vecteurs, ces derniers ont été purifiés au phénol-chloroforme, puis précipité à l'éthanol 100% (3 volumes), lavés à l'éthanol 70%, et redissous dans l'eau milliQ ; ces trois dernières étapes ont été réalisées stérilement sous hotte à flux d'air laminaire.

La transfection a été réalisée par électroporation, en mettant en présence 10 μ g d'ADN linéarisé et 0.8 mL de suspension cellulaire en phase de croissance exponentielle ($1 \cdot 10^7$ cell./mL dans du tampon PBS) dans une cuvette de 0.4 cm (Gene Pulser cuvette - BioRad – réf. 165-2088). Après une incubation de 10 min dans la glace, la cuvette a ensuite été placée dans l'appareil d'électroporation (Gene Pulser et Gene Controller - BioRad), et une décharge électrique (1.4 kV et 25 μ F, résistance à l'infini) a été appliquée aux cellules. Puis, celles-ci ont été remises en culture en milieu sélectif (zéocine à 500 μ g/mL – Invitrogen – réf. R250-01) à raison d'un à quatre millions de cellules par boîte de Petri afin de sélectionner les clones recombinants.

Matériels et méthodes

Une centaine de clones positifs ont ensuite pu être isolés grâce à des cylindres spécialement conçus à cet effet (Figure 21). La culture sur antibiotique a été prolongée sur une durée de 6 semaines au total afin de s'assurer que les clones résistants avaient effectivement incorporé le plasmide d'intérêt dans leur génome et qu'ils étaient donc capables d'exprimer la protéine d'intérêt de façon permanente.

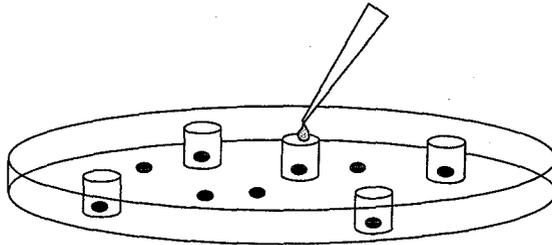


Figure 21 : Isolement des clones CHO positifs par cylindres de clonage : élimination du milieu de culture, puis lavage au PBS et ajout de trypsine dans les cylindres afin de détacher les cellules de la surface de la boîte de Petri.

II. Culture cellulaire

1. Lignées cellulaires d'origine

Deux lignées de cellules CHO ayant déjà été utilisées au laboratoire pour l'expression de diverses protéines recombinantes (IFN- γ , FUT) ont été testées pour la production d'EPO.

1.1. Lignée CHO UH-1

La lignée "hôte universel de 1^{ère} génération" a été établie par transfection de l'ADN_C codant pour l' α 2,6-sialyltransférase (ST6 Gal I) dans la lignée CHO Dux-B11 dhfr^r (Monaco *et al.*, 1994). Cette lignée CHO "humanisée" a ainsi la capacité spécifique de fixer des acides sialiques en position α 2,6 et présente donc un intérêt certain pour l'expression de protéines recombinantes thérapeutiques humaines. En outre, elle a été adaptée à la culture en suspension au cours de travaux précédents (Lamotte, 1997).

1.2. Lignée CHO TAG

Cette sous-lignée de cellules CHO a été sélectionnée de façon à ne pas produire d' α 1,3/1,4-fucosyltransférase endogène et à résister à la géniticine (G418) (P. Stanley, College of Medicine A. Einstein, New York). De plus, elle exprime l'antigène T (Large T Antigen) qui lui confère des capacités de croissance et de résistance accrues.

2. Culture et propagation des cellules

2.1. Cellules adhérentes

L'étape de transfection de la lignée CHO-UH1 (déjà adaptée à la culture en suspension) par le vecteur pFL1 a été réalisée en culture statique afin de réduire les effets traumatisants du choc

électrique sur les cellules. Les travaux ultérieurs (pré-sélection des meilleurs clones producteurs d'EPO) ont donc été poursuivis sous ce même mode de culture jusqu'à la phase de ré-adaptation du clone finalement sélectionné, à la culture en suspension.

Les cellules ont donc été propagées en mode "adhérent" en flacons de Roux, en présence de milieu α MEM supplémenté de 5% de sérum de veau fœtal. Les flacons de Roux de 25, 75 et 182 cm² (Greiner), ont été inoculés à raison de 2.10⁴ cell./cm² puis placés dans un incubateur régulé à 37°C et 5% de CO₂ (Jouan EG 1101R). Les bouchons des flacons sont percés et munis de filtres de manière à permettre les échanges gazeux à l'intérieur de l'incubateur. Quand la confluence était atteinte (ou après 5 jours au maximum), le surnageant a été éliminé et le tapis cellulaire rincé à l'aide de tampon PBS ne contenant ni calcium ni magnésium. Les cellules ont été détachées par protéolyse à l'aide d'une solution de trypsine (trypsine 0.05 g/L, EDTA 0.02 g/L, NaCl 0.85 g/L - GibcoBRL) et incubées pendant trois minutes à 37°C. L'action de la trypsine était stoppée par l'addition de milieu de culture frais contenant du sérum. La suspension a alors été centrifugée dans un tube conique (800 tr/min - 5 min) et le culot cellulaire, repris dans du milieu frais pour être propagé à nouveau en flacons de Roux.

2.2. Cellules en suspension

Les cellules adaptées à la culture en suspension ont été propagées en fiole d'Erlenmeyer de polycarbonate et à usage unique, de 250 ou 125 mL (Corning - réf. 25600). La densité d'inoculation était généralement de 2 à 2.5 x10⁵ cellules/mL. Le ciel de la fiole a alors été rempli durant trois minutes d'un mélange gazeux constitué de 5% de CO₂ et 95% d'air. La fiole a ensuite été bouchée et déposée sur une table d'agitation (IKA - réf. KS 501) placée dans une étuve régulée à 37°C. La vitesse d'agitation a été réglée à 70 tr/min. Le volume utile de la culture est le cinquième de la contenance maximale de la fiole (25 mL pour la fiole de 125 mL). Un volume utile supérieur perturbe l'agitation du milieu et peut engendrer la création d'agrégats cellulaires. Après 48 à 72 heures de culture, la suspension cellulaire était centrifugée dans un tube conique (5 min à 800 tr/min), puis le culot cellulaire était resuspendu dans du milieu frais pour ensemercer de nouveaux flacons.

Des flacons agités cylindriques de type "spinner" (Techne) ont également été utilisés pour les cinétiques de culture en suspension. Ces flacons, de 200 mL de volume utile, sont en verre borosilicaté et pourvus d'une tige aimantée centrale dont l'extrémité supérieure est fixée au

bouchon. Ils étaient placés sur une table d'agitation magnétique (Techne Mcs 1045) dont la vitesse était fixée à 40 tr/min, cette table étant elle-même située dans un incubateur réglé à 37°C et 5% de CO₂ (Jouan EG 1101R). Les bouchons latéraux des flacons étaient légèrement dévissés afin de permettre les échanges gazeux à l'intérieur de l'incubateur, l'oxygénation de la culture se faisant par transfert à l'interface liquide-gaz.

2.3. Culture en bioréacteur réglé et parfaitement agité

Un bioréacteur de 4 L a également été utilisé (Inceltech SGI). La culture a été réalisée en mode discontinu : après ensemencement, aucun ajout ni soutirage de milieu n'est réalisé, à l'exception de la prise d'échantillons.

Le bioréacteur est un système de culture particulièrement bénéfique car il permet la régulation de plusieurs paramètres opératoires importants.

Le pH est contrôlé par un système de type PID (régulation 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 de pH 7. Le système de régulation PID commande l'arrivée d'acide, en l'occurrence le CO₂ pour la dissociation de H₂CO₃ en H⁺ et HCO₃⁻, si le pH mesuré est supérieur à la valeur de consigne. Dans le cas contraire, la régulation actionne l'injection de soude 0.2 N (isotonique) vers le réacteur à l'aide d'une pompe péristaltique. La valeur de consigne appliquée au cours de la culture était de 7.3.

De plus, le taux d'oxygène dissous (pO₂) est également contrôlé par un système PID couplé à une sonde stérilisable (Ingold) qui est étalonnée avant stérilisation. Les valeurs 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 a été assurée par un diffuseur de gaz ("sparger") situé en fond de cuve, ou par le ciel du réacteur en raison de l'apparition importante de mousse. L'injection d'oxygène est soumise à l'ouverture d'une électrovanne pilotée par le système de régulation PID. La valeur de la consigne de pO₂ avait été fixée à 50% de saturation de l'air.

Enfin, la température est maintenue constante dans le réacteur par un système de chauffage à air chaud soufflé dans une enveloppe présente autour de la cuve. La valeur de consigne de température a été réglée à 37°C.

La vitesse d'agitation a été fixée à 40 tr/min.

Avant la mise en œuvre de la culture, la stérilisation du réacteur contenant du PBS a été réalisée en autoclave (30 min, 121°C, 1 bar). Le PBS a ensuite été soutiré stérilement avant ensemencement. L'inoculum, constitué de cellules dans le milieu frais, a été introduit stérilement dans le réacteur par surpression à l'aide d'air contenant 5% de CO₂. En début de culture, l'ajout de CO₂ est privilégié, puis, seule intervient la régulation de pH par ajout de soude, le métabolisme cellulaire acidifiant le milieu. Les prélèvements pour comptage et dosage ont été réalisés directement dans le bioréacteur environ toutes les douze heures.

3. Conservation des lignées

3.1. Congélation des cellules

Les cellules ont été conservées dans l'azote liquide (-196°C) en cryules de matière plastique (Nalgene) contenant 1 à $4 \cdot 10^7$ cellules sous un volume de 1 mL. L'appareil Nicool LM 10 (Produits Oxygénés) permet de programmer la baisse de température selon le programme suivant : 25 min à -11,5°C, 10 min à -61°C, puis immersion pendant une minute dans l'azote liquide.

Pour les cellules sérum-dépendantes, le milieu de congélation était le milieu α MEM supplémenté avec 20% de sérum de veau fœtal et 10% de diméthyl-sulfoxyde (DMSO). Après adaptation à la culture sans sérum, les cellules ont été congelées sans sérum (mais toujours en présence de DMSO).

3.2. Décongélation des cellules

Les cellules ont été décongelées en plaçant la cryule dans un bain-marie régulé à 37°C. Après décongélation totale, le contenu de la cryule était repris dans 10 mL de milieu de culture, puis centrifugé durant 5 min à 800 tr/min. Après élimination du surnageant, le culot cellulaire était remis en suspension dans 5 à 25 mL de milieu de culture de façon à obtenir une concentration de $2 \text{ à } 8 \cdot 10^5$ cell./mL puis placé en flacon de Roux ou en fiole d'Erlenmeyer agitées suivant le mode de culture désiré.

4. Numération cellulaire

Le dénombrement des cellules a été réalisé par observation microscopique à l'aide d'une cellule de Thoma (hématocytomètre). Les densités cellulaires présentées ici correspondent à la moyenne obtenue par comptage 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 a été déterminée par coloration à l'aide d'une solution de bleu trypan (Sigma – réf. T-8154) diluée à 10%_{v/v} (0.1 mL de la solution bleu trypan étant ajouté 0.9 mL de suspension cellulaire). Cette molécule pénètre à l'intérieur des cellules dont la membrane est endommagée et les cellules colorées en bleu sont donc considérées comme mortes.

5. Milieux de culture

Les cellules sérum-dépendantes ont été cultivées en milieu α MEM (GibcoBRL - réf. 11900) contenant 10 mg/L de nucléosides et supplémenté par 5% de sérum non décomplémenté (lot unique – JRH) et 4 mM de glutamine (GibcoBRL).

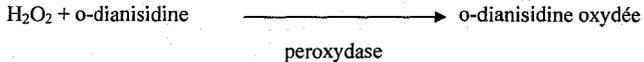
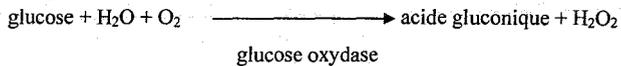
Après adaptation à la culture sans sérum, les cellules ont été cultivées dans deux milieux sans sérum : SFX (HyQ SFX-CHO - HyClone - réf. SH30220) et SFM (CHO-SFM - Sigma - réf. C8099) dont le contenu en protéines totales étaient respectivement de 10 et 100 mg/L. Le milieu sans protéine PF (HyQ PF-CHO - HyClone - réf. SH30187), ne contenant pas de peptide de taille supérieure à 10 kDa a également été testé. Ces trois milieux (ne contenant ni thymidine, ni hypoxanthine) étaient supplémentés par 4 mM de glutamine, 50 mg/L de glycine et 10 mg/L de ribo- et désoxyribonucléosides.

La pression de sélection a été maintenue tout au long des travaux par la présence de 500 μ g/mL de zéocine (Invitrogen – réf. R250-01) dans les différents milieux de culture utilisés.

6. Analyse des constituants du milieu

6.1. Le glucose

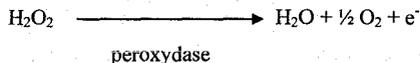
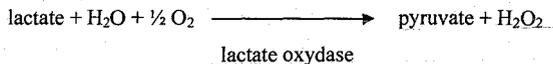
Le dosage du glucose est réalisé sur micro-plaques de 96 puits à l'aide d'un kit commercial (Sigma – réf. 510-A). Il est basé sur les réactions enzymatiques suivantes :



L'intensité de la coloration brune, mesurée à 450 nm (spectrophotomètre Multiskan MCC/340 Titertek), est proportionnelle à la concentration de glucose dans l'échantillon. L'erreur de dosage est inférieure à 10%.

6.2. Le lactate

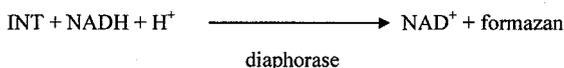
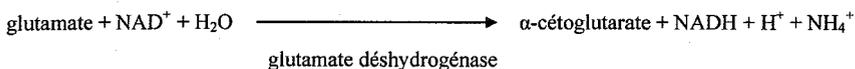
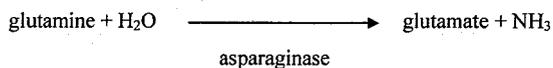
Le dosage du lactate est réalisé sur micro-plaques de 96 puits à l'aide d'un kit enzymatique commercial (Sigma – réf. 735-10). Son principe est le suivant :



L'électron libéré oxyde un substrat chromogène pour produire une coloration bleue mesurée à 540 nm (spectrophotomètre Multiskan MCC/340 Titertek), proportionnelle à la concentration de lactate dans l'échantillon. L'erreur de dosage est de 10 à 20 % (Cherlet, 1995).

6.3. La glutamine

Le dosage est basé sur le dosage du glutamate. Dans un premier temps, la glutamine est transformée en glutamate à l'aide d'une asparaginase (Roche - réf. 102 903). Le glutamate est ensuite dosé par méthode enzymatique sur micro-plaques de 96 puits à l'aide du kit commercial Roche (réf. 139 092). Les réactions du dosage du glutamate sont les suivantes :



L'apparition de formazan est détectée à 492 nm (spectrophotomètre Multiskan MCC/340 Titertek). La concentration en glutamine est déterminée par différence, en dosant d'une part le glutamate seul, et d'autre part l'ensemble glutamate+glutamine après transformation par l'asparaginase. L'erreur de dosage est de l'ordre de 20% (Cherlet, 1995).

6.4. Les ions ammonium

Le dosage des ions ammonium est réalisé grâce à 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 :



L'équilibre est déplacé vers la droite par addition de 3 mL de soude 0.5 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 :

$$E = E_0 - S \cdot \log [\text{NH}_3]$$

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 (0.5 à 20 mM) en traçant le logarithme de la concentration $[\text{NH}_4\text{Cl}]$ en fonction du potentiel de l'électrode (mV). L'erreur de dosage est de 10% (Cherlet, 1995).

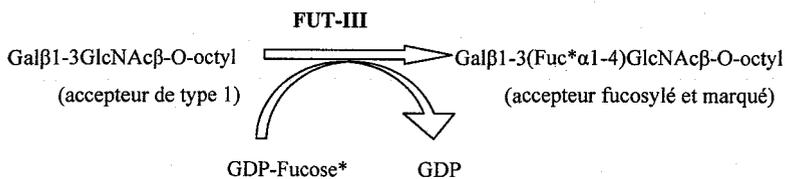
7. Analyse de l'activité sialidasique dans le surnageant de culture

L'activité sialidasique dans le surnageant de culture a été déterminée par la méthode de dosage par fluorescence décrite par Gramer (2000) en utilisant l'acide 4-methylumbelliferyl- α -D-N-acétylneuraminique comme substrat.

Après élimination complète des débris cellulaire par centrifugation à 10 000 g pendant 10 min, les surnageants de culture ont été concentrés 15 fois à 4°C par ultrafiltration (Nanosep 10 kDa – Pall). Le dosage est réalisé à 37°C en présence de 188 μL d'acide 4-methylumbelliferyl- α -D-N-acétylneuraminique (4 mM), 119 μL de tampon phosphate (1 M, pH 6.2), 119 μL d'eau distillée et de 325 μL de surnageant concentré 15 fois. Après incubation de 30 min, 250 μL du mélange réactionnel sont prélevés et redilués dans 2250 μL de tampon glycine/KOH (1 M, pH 10.4) afin d'arrêter la réaction enzymatique. Après excitation à 360 nm, l'intensité de fluorescence émise à 450 nm est mesurée à l'aide d'un spectrofluorophotomètre (Safas, Monaco). La 4-methylumbelliféron est utilisée comme standard. La précision de la méthode est d'environ 15%.

8. Dosage de l'activité α 1,4 fucosyltransférase

L'activité de la FUT-III a été mesurée par une méthode radioactive basée sur le transfert du substrat (^{14}C)GDP-fucose sur un substrat accepteur présentant une partie hydrophobe (Deparis, 2001) :



(*) : marqué au ^{14}C

Un mélange réactionnel de 50 μL contenant 20 μL d'échantillon (surnageant de culture), du GDP-fucose (non marqué ou marqué au ^{14}C) et un substrat accepteur de type 1 (Gal β 1-3GlcNAc β -O-octyl) est incubé pendant 20 min à 37°C. après l'arrêt de la réaction par addition de 1 mL d'eau froide, le mélange réactionnel est appliqué sur une colonne de chromatographie de phase inverse (colonne C18, Seppak, Waters). La colonne est lavée avec 20 mL d'eau. Seul le substrat accepteur est retenu par le biais de sa partie hydrophobe (octyl). L'éluion est réalisée à l'aide de 10 mL de méthanol. La radioactivité des différentes fractions (lavages et éluion) est mesurée après addition de liquide de scintillation (Insta-Gel Plus, Packard) dans un compteur à scintillation (TRI-CARB 2100 TR, Packard).

Le GDP-fucose non marqué et l'accepteur de type 1 nous ont été fournis par Claudine Augé (Laboratoire de Chimie Organique Multifonctionnelle, URA CNRS-Chimie 462, Orsay, France). Le (^{14}C)GDP-fucose provient d'Amersham (CFB 149).

Une unité de FUT-III est définie comme la quantité d'enzyme transférant 1 μmole de fucose par minute à 37°C sur un substrat accepteur.

Le temps d'incubation de 30 min a été choisi afin de se placer dans des conditions où la vitesse de la réaction enzymatique est à sa valeur initiale. Une étude antérieure a montré que la vitesse de réaction ne diminue pas jusqu'à 20 min en présence d'une quantité de FUT-III au moins égale à celle mesurées dans notre étude (Tahrat, 2002).

9. Exploitation des résultats : calculs des paramètres cinétiques

9.1. Vitesse spécifique de croissance

Si r_x et r_d sont respectivement les vitesses de croissance et de décès cellulaire, X_V , la concentration de cellules viables (cellules non colorées par le bleu trypan), et X_M , la concentration de cellules mortes (cellules colorées par le bleu trypan), le bilan de matière en système discontinu s'écrit de la manière suivante :

$$r_x - r_d = dX_V / dt$$

Les vitesses spécifiques de croissance apparente, μ_{app} , et de décès cellulaire, k_d , sont respectivement définies par :

$$\mu_{app} = r_x / X_V \quad \text{et} \quad k_d = r_d / X_V$$

La valeur de la vitesse spécifique de croissance réelle, $\mu_{réel}$, est déterminée à l'aide de μ_{app} et de k_d par la relation suivante :

$$\mu_{app} = \mu_{réel} - k_d = (dX_V / dt) / X_V$$

Les vitesses spécifiques μ_{app} et k_d sont elles-mêmes calculées à partir des valeurs expérimentales de X_V et de X_M . Les points expérimentaux (prélèvements de surnageant toutes les 12 h pendant la phase de croissance cellulaire, puis toutes les 24 h ensuite), sont interpolés par des polynômes de degré 3 à 6, à l'aide du logiciel Excel, afin de calculer des points théoriques espacés de 5 h sur les courbes de densités cellulaires, et ainsi, d'estimer plus précisément la vitesse apparente spécifique de croissance μ_{app} :

$$\mu_{app(i)} = ((X_{Vi+1} - X_{Vi-1}) / (t_{i+1} - t_{i-1})) / X_{Vi}$$

9.2. Vitesses spécifiques d'utilisation des substrats et de formation des produits

Si r_s et r_p sont respectivement les vitesses d'utilisation d'un substrat S et de formation d'un produit P par unité de volume et à un temps t, les vitesses spécifiques correspondantes sont données par les formules suivantes en système discontinu, aucun élément n'étant ajouté ni soutiré durant la culture :

$$q_s = r_s / X_V \quad \text{et} \quad q_p = r_p / X_V$$

avec $r_s = - dS / dt$ et $r_p = dP / dt$

Les données expérimentales correspondant aux substrats ou produits sont lissées par la méthode déjà utilisée pour estimer les vitesses spécifiques de croissance et de décès cellulaires (calcul de points théoriques par interpolation à l'aide de polynômes de degré 3 à 6).

III. Immuno-purification de l'EPO

La purification de l'EPO produite par culture de cellules CHO a été réalisée par immuno-affinité : un anticorps monoclonal anti-EPO humaine (R&D Systems – réf. MAB287), celui qui permet la première étape de fixation de l'EPO lors du dosage ELISA décrit plus haut, a été couplé à un gel de sépharose-CNBr (Sigma) de façon covalente, à raison d'1 mg d'anticorps pour 150 mg (ou 0.5 mL) de gel. La fixation complète des anticorps a été vérifiée par dosage des protéines par la technique de Bradford (BioRad). L'épitope de cet anticorps (IgG₁) étant localisé sur la chaîne polypeptidique de l'EPO, la purification est indépendante de l'état de glycosylation de la protéine. Notons également que, selon le fournisseur, cet anticorps anti-EPO humaine réagit de façon croisée avec l'EPO murine, et que ceci a été vérifié ultérieurement.

Afin d'éliminer les débris cellulaires, les surnageants de culture ont été centrifugés (5 min à 800 tr/min), puis mis en contact avec le gel d'immuno-affinité activé par les anticorps anti-EPO pendant une nuit, à 4°C, sous agitation douce. Le gel a ensuite été séparé du surnageant par centrifugation douce (3 min à 3000 tr/min). Afin d'éliminer au mieux les molécules non fixées aux anticorps, le gel a ensuite subi trois lavages successifs par les tampons suivants : PBS (20 volumes), PBS/Tween₂₀ (20 volumes) et NH₄OH / NaCl 1 M, pH 10.3 (2 volumes). L'EPO a ensuite été éluée en deux étapes, à pH 11.5 puis à pH 11.8 (tampon NH₄OH / NaCl 1 M). Après neutralisation rapide du pH par ajout de tampon TrisHCl 4 M, les deux fractions d'éluion ont été rassemblées, puis concentrées et dialysées en utilisant un système d'ultrafiltration (10 kDa) Centricon YM-10 (Millipore).

IV. Caractérisation de l'EPO

1. Western-blot

L'analyse Western-blot de l'EPO consiste à séparer les différentes protéines d'un échantillon selon leur taille par électrophorèse sur gel, à les transférer sur une membrane et enfin à révéler spécifiquement l'EPO par immuno-marquage.

L'électrophorèse sur gel est réalisée en condition dénaturante selon la méthode de Laemmli (1970). L'appareil utilisé est le Mini-Protean III (Bio-Rad). Un gel d'acrylamide à 5% (pH 6.8) en tête de gel permet la concentration des protéines tandis que le gel principal de séparation est composé de 10% d'acrylamide (pH 8.8).

Après dénaturation (5 min à 100°C), les échantillons (20 à 500 ng d'EPO) sont déposés sous un volume de 20 µL, auxquels sont ajoutés 5 µL de tampon de charge. La migration est induite par un courant de 30 mA (gel de concentration) puis 60 mA (gel de séparation).

Les protéines sont ensuite transférées du gel sur une membrane en PVDF (Immobilon-P, Millipore – réf. IPVH 00010), par application d'une tension constante de 18 V pendant 1 h à l'aide d'un appareil de transfert en milieu semi-sec (Transblot SD, BioRad). Avant le transfert, le gel et la membrane sont imbibés de tampon de transfert (Tris-base 3 g/L, glycine 14.4 g/L).

La membrane est ensuite soumise à une série de bains successifs sous agitation. Dans un premier temps, elle est saturée en protéines par une solution d'albumine à 3% (dans un tampon TBS : 50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) pendant 1 h à température ambiante. Après 3 lavages par un tampon TBST (TBS + Tween20 à 0.01%), la membrane est incubée 2 h à 37°C en présence d'1 µg/mL d'anticorps polyclonaux anti-EPO de lapin (R&D Systems – réf. AB-286-NA) en solution dans un tampon TBST + 1% d'albumine.

Après 3 nouveaux lavages (tampon TBST), une deuxième incubation (1h30) est réalisée à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire (anti-IgG de lapin conjugué à la phosphatase alcaline - Sigma – réf. A3687), dilué au 1/20000 dans le tampon TBST + 1% d'albumine. Trois autres lavages (tampon TBST) sont ensuite effectués avant que l'EPO puisse être révélée en présence du substrat de la phosphatase alcaline BICP/NBT (Sigma Fast tablets - Sigma - réf. B5655).

Afin d'estimer la taille de l'EPO analysée, ainsi que son hétérogénéité, plusieurs marqueurs de masse moléculaire commerciaux ont été utilisés (pré-colorés ou non) dans notre étude :

- Prestained protein ladder (GibcoBRL - réf. 10748-010)
- Prestained protein molecular weight marker (MBI Fermentas - réf. SM0441)
- 10 kDa Protein Ladder (GibcoBRL - réf.10064-012)

La limite de détection de cette méthode est de l'ordre de 10 à 50 ng d'EPO, mais la quantification précise de l'EPO est difficile.

2. Quantification de l'EPO par test ELISA

La mesure de la concentration de l'EPO dans les surnageants de culture a été réalisée par dosage ELISA en utilisant le kit commercial Quantikine IVD (R&D Systems – réf. DEP00) destiné à la quantification de l'EPO humaine. Cependant, ce kit peut également être utilisé pour la détection de l'EPO murine en raison de l'importante homologie de séquence des chaînes polypeptidiques des formes humaine et murine de la protéine (80% d'homologie selon Shoemacher et Mitscock, 1986); la réaction croisée des anticorps du kit vis à vis de l'EPO murine a d'ailleurs été vérifiée par le fournisseur. Les différentes étapes du test sont présentées sur la figure 22.

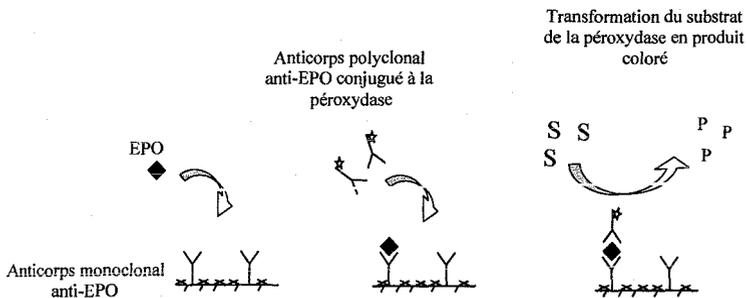


Figure 22 : Principe du test ELISA utilisé pour quantifier l'EPO.

Matériels et méthodes

La concentration d'EPO a été obtenue en confrontant l'intensité de coloration (mesurée à 540 nm) des échantillons avec celles des étalons d'EPO (humaine et déglycosylée – origine : *E.coli*) du kit (2.5 à 200 mU/mL), ainsi qu'avec celle d'un échantillon d'EPO humaine commerciale (R&D Systems – réf. 287-TC – origine : CHO) de concentration connue (100 000 U/mg), que nous avons utilisée comme référence. Selon le fournisseur, l'activité de cette EPO de référence a été calibrée contre le deuxième étalon de référence international (Annable *et al.*, 1972) dont l'activité biologique a été mesurée *in vivo* par test de prolifération cellulaire (Kitamura *et al.*, 1989). La limite de détection de la technique est d'environ 1 ng d'EPO, et sa précision, de l'ordre de $\pm 20\%$.

3. Analyse de la glycosylation de l'EPO par électrophorèse capillaire

3.1. Matériel

L'appareil P/ACE 5000 (Beckman-Coulter) à détecteur LIF (Laser Induced Fluorescence) a été utilisé avec un kit commercial spécialement conçu pour l'analyse des oligosaccharides en solution (eCAP™ N-linked oligosaccharides Profiling kit, Beckman-Coulter). Celui-ci comprend en particulier un gel de migration PEO (tampon acétate, pH 4.75 contenant 0.4% d'oxyde de polyéthylène) et un capillaire (50 μm x 57 cm) muni d'un revêtement de polyvinyl-alcool (N-CHO) spécialement adaptés à la séparation de ce type de molécules.

Le contrôle de l'instrument, l'acquisition des données et l'analyse des électrophorégrammes ont été réalisés avec le logiciel "P/ACE Station" (Beckman-Coulter).

3.2. Analyse des chaînes glycaniques provenant de glycoprotéines

La méthode utilisée est inspirée de celle décrite par Chen et Evangelista (1998). La glycoprotéine est d'abord soumise à un clivage enzymatique (PNGase) pour libérer ses chaînes glycaniques liées sur des résidus asparagine; ces chaînes sont ensuite marquées par un agent fluorescent, puis séparées par électrophorèse capillaire sur gel, avant et après désialylation chimique.

Matériels et méthodes

Dans un premier temps, la glycoprotéine (10 à 200 µg) est séchée sous vide dans un évaporateur (Speed-Vac, Eppendorf) puis soumise à l'action d'une peptidase-N-glycosidase F (PNGase F) afin de couper ses chaînes glycaniques (2 µL d'enzyme dans 45 µL de tampon - solutions du kit). Ce clivage enzymatique est réalisée après dénaturation (incubation 5 min à 95°C en présence de 0.1% de SDS et de 50 mM de β-mercapto-éthanol), à 37°C pendant une nuit et en présence de 0.75% de Nonidet P40. Les composantes protéique et glycanique sont ensuite séparées par précipitation à l'éthanol absolu à -20°C (150µL). Les oligosaccharides contenus dans le surnageant sont enfin séchés par concentrateur sous vide.

Naturellement, la plupart des sucres ne sont ni fluorescents, ni n'absorbent la lumière UV ; leur détection nécessite donc une dérivation. Le marqueur fluorescent utilisé ici est l'APTS (8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate). La stœchiométrie de la réaction est telle qu'une molécule d'APTS se lie à une molécule d'oligosaccharide (sur le résidu N-acétylglucosamine proximal). Un étalon interne de maltose (2 nmoles) est ajouté à l'échantillon avant séchage sous vide afin de contrôler cette étape de marquage.

Les oligosaccharides séchés sont resuspendus dans 1.5 µL d'APTS (100 mg/mL dans de l'acide acétique à 15%) et 1.5 µL de cyanoborohydrate de sodium NaBH₃CN (1 M) en solution dans du THF (tetrahydrofuran), puis incubés pendant une nuit à 37°C. La réaction de marquage est stoppée par l'ajout de 47 µL d'eau distillée. Une dilution au 1/10 dans de l'eau distillée est ensuite effectuée.

Pour l'analyse des chaînes glycaniques désialylées, une hydrolyse douce est ensuite effectuée en incubant 4 µL de la solution contenant les oligosaccharides marqués en présence de 36 µL d'acide acétique glacial (Sigma – réf. A 6283) pendant 1 h à 80°C.

Les essais préliminaires de désialylation enzymatique ont été réalisés avec la sialidase de *Vibrio cholerae* (Oxford Glycosystems - réf. 477623).

Les chaînes oligosaccharidiques, entières ou désialylées, ont ensuite été introduites dans le capillaire par injection sous pression de 0.5 psi pendant 20 s. L'électrophorèse a ensuite été réalisée sous une tension de 25 kV et une intensité de 12 µA environ. A la sortie du capillaire, les oligosaccharides marqués ont été détectés par fluorescence à 520 nm après excitation à 488 nm (détecteur LIF - Laser Induced Fluorescence).

L'analyse de 5 profils glycaniques obtenus après des injections successives a montré que l'erreur moyenne calculée sur l'aire relative des pics était inférieure à 10%.



RESULTATS ET DISCUSSION

I. DE LA CONSTRUCTION GENETIQUE A L'ANALYSE DE LA PROTEINE PURIFIEE



RESULTATS ET DISCUSSION

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

Ce chapitre est destiné à présenter les différents outils (système de production d'EPO, techniques de purification et d'analyse de la protéine) mis au point et/ou adaptés de la littérature, dans le but de pouvoir ensuite étudier l'influence que pouvait avoir le procédé de culture sur la glycosylation d'une protéine recombinante.

1. Génération d'une lignée cellulaire CHO productrice d'EPO

Nous avons vu dans la partie bibliographique qu'en raison de sa forte composante glycanique (40%_op/p), l'EPO représente un modèle particulièrement intéressant pour l'étude de la glycosylation d'une protéine recombinante au cours du procédé et des différents facteurs pouvant l'influencer.

Parmi les différents systèmes de production de protéines recombinantes, les cellules de mammifères, et en particulier la lignée CHO, constituent généralement les hôtes de choix pour l'expression de protéines glycosylées, principalement en raison de leurs capacités de maturation post-traductionnelle et de sécrétion. Ces cellules possèdent en effet une machinerie de glycosylation capable de synthétiser des chaînes glycaniques complexes de structure proche de celles des cellules humaines. Cependant, certaines différences existent, en particulier en ce qui concerne la nature de la sialylation terminale. Ainsi, les cellules humaines peuvent fixer les acides sialiques sur le carbone 3 ou 6 des résidus galactose de leurs chaînes glycaniques, alors que les cellules CHO ne sont capables de les lier que sur le carbone 3.

En raison du rôle clef que les acides sialiques jouent dans les propriétés des glycoprotéines, il est important que les procédés de production de glycoprotéines recombinantes reproduisent le plus fidèlement possible l'état de sialylation des molécules naturelles.

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

Ainsi, dans le but de synthétiser des glycoprotéines "humanisées", la lignée CHO UH-1 ("hôte universel de 1^{ère} génération"), pré-sélectionnée pour ces travaux, a été précédemment modifiée génétiquement afin de lui conférer la capacité d'exprimer l' α 2,6 sialyltransférase (ST6 Gal I de rat), enzyme de glycosylation dont les cellules CHO sont dépourvues à l'origine (Monaco *et al.*, 1996).

1.1. Construction du vecteur plasmidique d'expression eucaryotique (pFL1)

La première étape a été la construction d'un vecteur plasmidique comprenant le gène de l'EPO pouvant être exprimé de façon stable par les cellules CHO.

Une cassette d'expression contenant le gène de l'EPO murine, précédé d'un promoteur fort CMV (optimisé par notre partenaire industriel pour l'expression transitoire) et suivi d'une séquence "polyA" stabilisatrice, a d'abord été extraite du plasmide qui nous avait été fourni (Aventis), puis a été introduite au niveau des sites de restriction *EcoR* I et *Hind* III dans le plasmide pSV40/zeo (Invitrogen) (cf. Matériels et méthodes, Figure 19). En raison de son promoteur SV40, différent (et plus faible), ce plasmide permettait d'utiliser le promoteur CMV optimisé de la cassette d'intérêt sans risque d'interférence entre les deux promoteurs. En outre, il possédait les gènes de résistance à l'ampicilline et à la zéocine pour la sélection ultérieure de clones positifs de type bactérien et eucaryote.

La ligation de l'insert (cassette) et du vecteur (plasmide) linéarisé a conduit à la formation d'un nouveau vecteur de 4.9 kb, d'expression eucaryotique (pFL1). Celui-ci a ensuite été introduit dans des bactéries électro-compétentes (*Escherichia coli*) par électroporation. Après culture sur milieu sélectif (ampicilline), plusieurs clones positifs ont été obtenus et l'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose après extraction plasmidique a montré que ces clones avaient bien un contenu différent du vecteur seul (Figure 23). La taille du plasmide pFL1, ainsi que la présence effective de l'insert et du vecteur ont finalement été vérifiées après digestion par les enzymes de restriction *Not* I d'une part, et *EcoR* I et *Hind* III d'autre part (Figure 24).

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

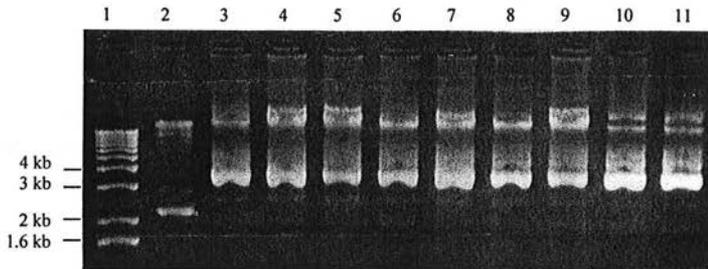


Figure 23 : Visualisation par électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN plasmidique (non digéré) contenu dans les clones positifs après électroporation. Colonnes #1 : marqueur de taille ; #2 : vecteur pSV40/zeo non digéré ; #3-11 : ADN plasmidique non digéré extrait de 9 clones positifs.

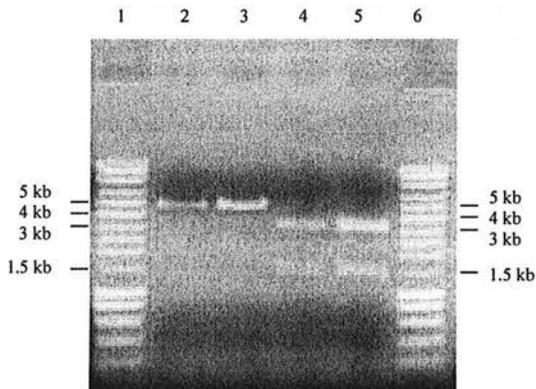


Figure 24 : Vérification par électrophorèse sur gel d'agarose de la présence dans le clone retenu du plasmide pFL1 (4.9 kb) contenant le vecteur d'origine pSV40/zeo (3.4 kb) et l'insert (1.5 kb). Colonnes #1 et #6 : marqueur de taille ; #2 et #3 : pFL1 linéarisé par *Not* I ; #4 et #5 : pFL1 digéré par *EcoR* I et *Hind* III.

1.2. Transfections des cellules CHO

La lignée cellulaire CHO UH-1 a été choisie comme hôte d'expression de l'EPO en raison de la sialylation améliorée qu'elle confère aux glycoprotéines qu'elle synthétise, et parallèlement, une deuxième lignée de cellules CHO (TAg) a également été testée comme témoin. Cette dernière avait été sélectionnée de façon à ne pas produire d' α 1,3/1,4-fucosyltransférase endogène et avait été modifiée génétiquement afin de résister à la généticine et d'exprimer l'antigène T (Large T Antigen) lui conférant des capacités de croissance et de résistance accrues ; elle a été utilisée avec succès au laboratoire pour la production d' α 1,3/1,4-fucosyltransférase III recombinante (FUT-III) (Tahrat-Benslimane, 2002).

Dans le but de compléter cette étude de l'influence de la lignée cellulaire sur l'efficacité de la transfection, des cellules CHO UH-1 ont également été électroporées en présence du vecteur d'expression de la FUT-III (pSAC1, utilisé pour la génération de la lignée CHO-TAg-FUT).

En outre, un des objectifs ultérieurs de notre projet étant d'adapter la future lignée productrice d'EPO à la culture en milieu sans sérum, une des priorités industrielles actuelles majeures, il a également été procédé à la transfection de cellules CHO UH-1 déjà adaptées à la culture à faible taux de sérum (0.3% au lieu de 5%).

L'ensemble de ces manipulations est schématisé sur la figure 25.

Les essais de transfections de vecteur pFL1 ont permis d'isoler plus de 80 clones producteurs d'EPO (UH-1 et TAg) après sélection sur zéocine (500 μ g/mL), la plupart d'entre-eux se sont révélés viables en culture en plaque à 24 puits.

Parallèlement, 18 clones CHO UH-1 producteurs de FUT-III ont été isolés après la transfection de contrôle. Les analyses effectuées par Western-blot sur les surnageants de culture de plusieurs de ces clones ainsi que du clone "témoin" CHO TAg, montrent que les protéines produites par les deux lignées sont de nature très similaire (distance de migration et taille des bandes identiques). En outre, l'intensité équivalente des bandes observées pour chacune des deux lignées indique que, du point de vue quantitatif également, les performances de la lignée CHO UH-1 sont comparables à celles obtenues avec la lignée CHO TAg (Figure 26).

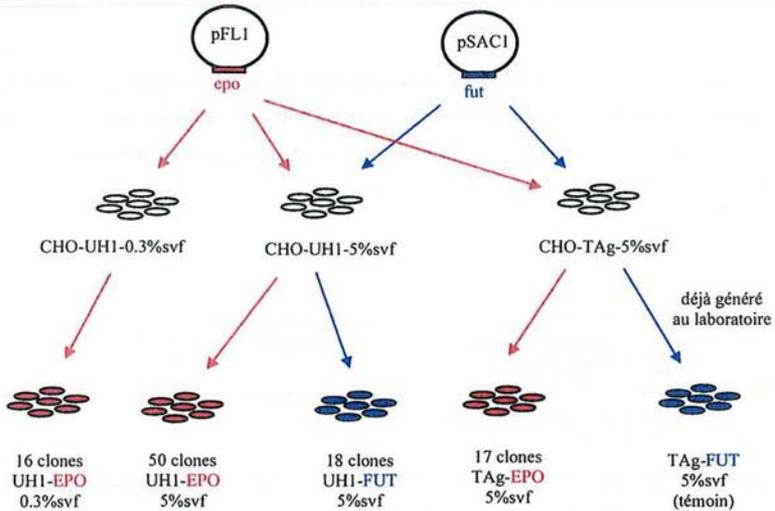


Figure 25 : Schéma récapitulatif des différentes transfections croisées réalisées dans le but de comparer les performances des lignées CHO UH-1 et CHO TAG comme hôtes d'expression de protéines recombinantes.

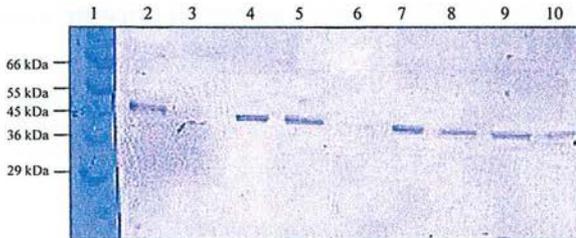


Figure 26 : Western-blot réalisé sur les surnageants de culture de clones CHO-TAG-FUT et CHO-UH1-FUT. (Anticorps primaire anti-FUT : sérum de lapin fourni par A. Maftah - Université de Limoges). Colonnes #1 : Marqueur de taille ; #2 : surnageant de culture d'un clone CHO-TAG-FUT (contrôle positif) ; #3 : milieu de culture frais (contrôle négatif) ; #4-10 : surnageant de culture de 7 clones CHO-UH1-FUT (#1, #2, #3, #4, #5, #6 et #7).

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

De plus, des mesures plus précises d'activité de la FUT-III par test enzymatique à l'aide d'un substrat radio-marqué (Tahrat-Benslimane, 2002) ont été réalisées sur trois clones CHO-UH1-FUT et ont montré que leurs performances étaient légèrement inférieures à celle du témoin CHO-TAg-FUT (Tableau 4).

Clone (culture non optimisée)	Activité de la FUT-III (mU/ml)
CHO-UH1-FUT #1	4
CHO-UH1-FUT #2	3.3
CHO-UH1-FUT #3	2.5
CHO-TAg-FUT (témoin)	10

Tableau 4 : Activités enzymatiques de la FUT-III mesurées dans les surnageants de culture des 3 clones CHO-UH1-FUT après 72 h de culture, comparées avec celle du clone CHO-TAg-FUT témoin.

Ainsi, par cette première comparaison des deux lignées cellulaires, ces transfections croisées ont permis de vérifier que la lignée CHO UH-1 avait des performances comparables à celles de la lignée témoin CHO TAg.

1.3. Sélection du meilleur clone CHO producteur d'EPO

Une pré-sélection de clones producteurs d'EPO a été réalisée à partir des clones isolés ; 76 clones ont été testés par Western-blot (plus économique que le test ELISA réalisé avec un kit commercial), dont 50 clones UH1-EPO-5%svf, 17 clones TAg-EPO-5%svf et 9 clones UH1-EPO-0.3%svf (Figure 27).

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

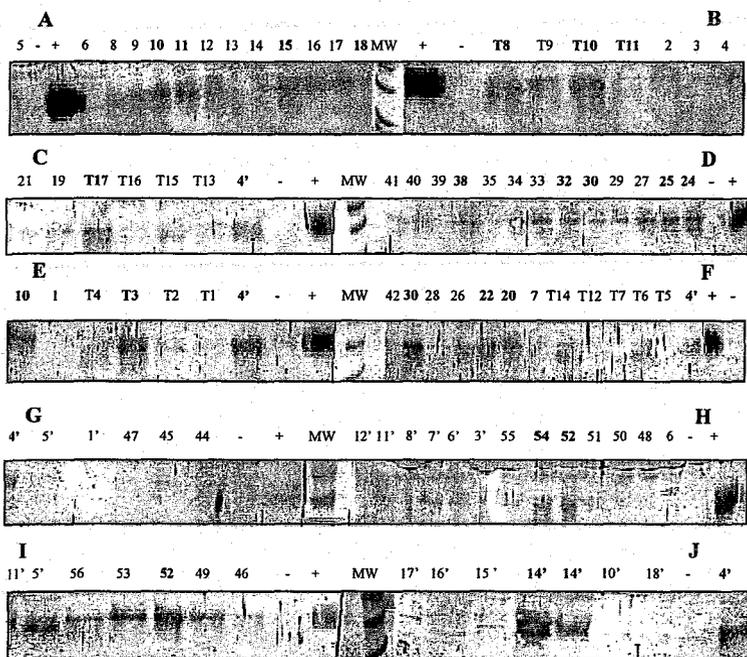


Figure 27 : Western-blot réalisés sur les surnageants de culture des clones positifs après transfection de cellules CHO par le vecteur pFL1 pour la sélection du meilleur clone producteur d'EPO. "T" pour les clones CHO-TAg ; " " pour les clones CHO-UH1-0.3%svf ; "MW" pour le marqueur de taille ; "+" pour le contrôle positif (hEPO de référence) ; "-" pour le contrôle négatif (milieu de culture frais).

Ces analyses ont conduit à sélectionner une vingtaine de clones prometteurs sur la base de l'intensité de la bande correspondant à l'EPO estimée visuellement sur les membranes (même si les densités cellulaires sur plaque à 24 puits n'ont pas été strictement identiques pour tous les clones testés) pour une évaluation plus précise de leurs capacités de production d'EPO par test ELISA après culture pendant 6 jours en flacon de Roux (mode discontinu).

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

Les résultats des 13 clones UH1-EPO-5%svf, 5 clones TAg-EPO-5%svf et 2 clones UH1-EPO-0.3%svf indiquent à nouveau que les deux lignées cellulaires CHO UH-1 et CHO TAg permettent d'obtenir des clones ayant des performances du même ordre (Tableau 5).

Clones	Concentration d'EPO (mg/L)
CHO UH-1 - 5% svf	
10	0.02
11	0.04
15	0.02
18	0.04
20	0.09
22	0.04
24	0.14
25	0.01
30	0.07
32	0.02
38	0.04
52	0.06
54	0.10
CHO TAg - 5% svf	
T3	0.07
T8	0.01
T10	0.20
T11	0.23
T17	0.11
CHO UH-1 - 0.3% svf	
14'	0.05
4'	0.11

Tableau 5 : Concentrations d'EPO mesurées par test ELISA dans les surnageants de culture des 20 clones pré-sélectionnés par Western-blot après 6 jours de culture en flacon de Roux (25 cm² -ensemencement initial : 2.10⁵ cell./mL).

A la suite de cette procédure de sélection, 3 clones (UH-1 #24 et TAg #T10 et #T11) ont été retenus pour l'étude plus approfondie de leurs cinétiques de croissance et de production, en culture statique (cellules adhérentes) mais également après ré-adaptation à la culture en suspension. Notons que les lignées UH-1 et TAg d'origine étaient déjà adaptées à la suspension mais il a été jugé préférable de réaliser l'étape de transfection, assez traumatisante pour les cellules, en culture statique.

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

Des cultures comparatives en flacon de Roux (25 cm² - 5 mL) ont donc tout d'abord été réalisées avec les 3 clones retenus (Figure 28). Conformément aux résultats obtenus lors de l'étape précédente de pré-sélection des clones (Tableau 5), les performances de production d'EPO et de croissance (densité cellulaire maximale) des deux clones CHO TAG se sont révélées légèrement supérieures à celles du clone CHO UH-1 en culture statique.

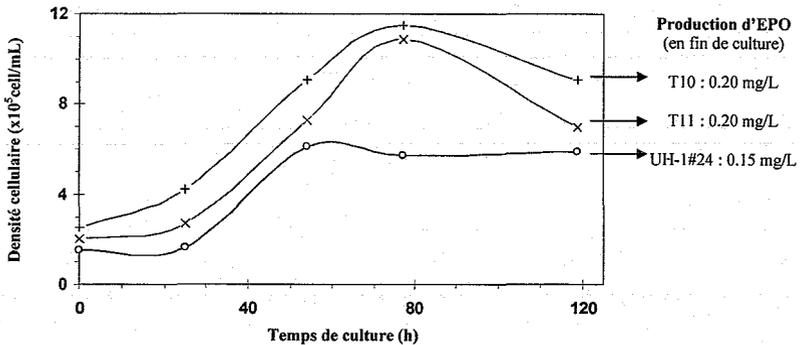


Figure 28 : Cinétique de croissance et production d'EPO en culture statique des 3 clones CHO retenus (flacon de Roux de 25 cm² - 5 mL de milieu α MEM + 5%svf + ribo- et désoxyribonucléosides 10 mg/L + zéocine 500 μ g/mL).

Les 3 clones CHO ont ensuite été cultivés en suspension, et après 6 semaines d'adaptation, une nouvelle étude cinétique a été effectuée pour évaluer leurs performances respectives dans ces nouvelles conditions de culture (en fiole d'Erlenmeyer de 25 mL de volume utile). Les résultats obtenus se sont révélés particulièrement intéressants puisque les capacités de production d'EPO du clone UH-1#24 ont été 3 fois supérieures à celles observées en culture statique tandis que celles du clone TAG #11 ont diminué de 75% (Figure 29).

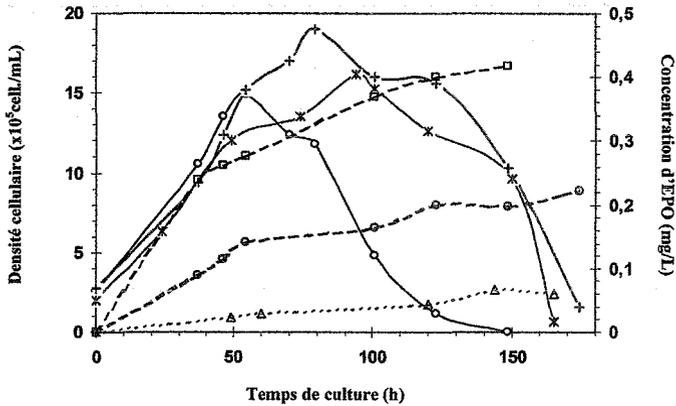


Figure 29 : Cinétique de croissance et de production d'EPO en culture en suspension des 3 clones CHO retenus (Fioles d'Erlenmeyer de 25 mL de milieu α MEM + 5%svf + ribo- et désoxyribonucléosides 10 mg/L + zéocine 500 μ g/mL). Densités cellulaires (traits continus) : "o" pour le clone UH-1#24, "+" pour le clone TAG#T10 et "x" pour le clone TAG#T11. Concentrations d'EPO (pointillés) : "□" pour le clone UH-1#24, "o" pour le clone TAG#T10 et "Δ" pour le clone TAG#T11.

Le clone UH-1 #24 s'est donc avéré être le clone le mieux adapté à la production d'EPO en culture en suspension et a donc été retenu pour les études ultérieures ; ses caractéristiques cinétiques sont présentées ci-dessous (Tableau 6).

Densité cellulaire _{max}	15 .10 ⁵ cell./mL
μ _{max}	0.04 h ⁻¹
EPO _{max}	0.45 mg/L
π _{max}	0.013 μ g/10 ⁶ cell./h

Tableau 6 : Paramètres cinétiques caractéristiques du clone CHO UH-1 #24 en culture en suspension en milieu α MEM + 5%svf + ribo- et désoxy-ribonucléosides 10 mg/L + zéocine 500 μ g/mL.

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

En conclusion, après plusieurs étapes, allant de la construction d'un vecteur plasmidique d'expression eucaryotique de l'EPO murine, utilisé ensuite pour transfecter des cellules CHO, à la sélection du clone le plus producteur et à son adaptation à la culture en suspension, nous avons pu établir un système de production d'EPO recombinante par culture de cellules de mammifères.

2. Mise au point de l'immuno-purification de l'EPO

Après avoir construit un système de production d'EPO, la deuxième étape a consisté à mettre au point une technique de purification permettant l'analyse de sa glycosylation.

Le principal objectif était donc de séparer l'EPO des autres molécules potentiellement présentes dans le surnageant de culture et en particulier, de celles comportant des structures de type saccharidique (sucres, glycoprotéines).

En raison de sa spécificité particulièrement élevée, la purification par immuno-affinité permet de limiter le nombre d'étapes nécessaires à l'obtention d'un degré de pureté compatible avec les contraintes d'applications analytiques telles que l'électrophorèse capillaire.

Contrairement aux lectines qui ont une affinité particulière pour certaines séquences oligosaccharidiques, l'anticorps monoclonal retenu présente une spécificité pour la composante peptidique de l'EPO, ce qui permet de retenir l'ensemble des molécules d'EPO, y compris celles qui pourraient comporter d'éventuelles structures glycaniques inhabituelles.

2.1. Capacités de couplage de l'anticorps sur différents gels d'immuno-affinité

Dans un premier temps, une étude du couplage de l'anticorps sur différents gels commerciaux a été réalisée ; les capacités maximales de fixation se sont révélées assez variables, les meilleurs résultats étant obtenus avec le gel CNBr (Tableau 7). Il est intéressant de noter que Gokana *et al.* (1997) ont également utilisé ce gel en fixant 5.5 µg d'anticorps / µL de gel, et que le fournisseur indique une capacité de fixation de 5 à 10 µg d'anticorps / µL de gel (la nature de ces anticorps étant cependant différente dans chacun des cas).

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

Gels commerciaux	Capacités maximales de couplage (μg d'anticorps / μL de gel)
CNBr-sépharose	9.5
NHS-sépharose	4.5
Affigel-10	2
ProtéineA-sépharose	3.5

Tableau 7 : Capacités de couplage de l'anticorps monoclonal anti-EPO humaine sur les différents gels commerciaux testés. Dosage de la quantité d'anticorps en solution, avant et après incubation des gels d'affinité en présence d'un excès d'anticorps (test de Bradford).

2.2. Capacités de fixation de l'EPO sur le gel CNBr activé

Les capacités de fixation de l'EPO sur le gel sélectionné ont ensuite été évaluées. Afin d'éviter les problèmes d'encombrement stérique lors de la fixation de l'EPO, le gel CNBr activé a été utilisé en dessous de sa demi-saturation ($2 \mu\text{g}$ d'anticorps / μL de gel).

L'EPO provenant de nos surnageants de culture s'est révélée se fixer nettement moins efficacement que l'EPO de référence utilisée (10 contre $150 \mu\text{g}$ d'EPO / mg d'anticorps), cette dernière étant reconstituée dans une solution saline (tampon PBS, dont le pH 7.4 est proche de celui du surnageant de culture) en présence d'albumine uniquement (Tableau 8). Le surnageant de culture représente donc probablement un environnement moins favorable en raison de la présence de nombreuses autres protéines susceptibles de se fixer aux anticorps de façon non spécifique. En effet, selon le fournisseur, l'anticorps utilisé (anti-EPO humaine) réagit de façon croisée avec l'EPO murine. A titre de comparaison, Gokana *et al.* (1997) mentionnent un ratio du même ordre ($50 \mu\text{g}$ d'EPO / mg d'anticorps).

Type d'EPO	Capacités maximales de fixation d'EPO (μg d'EPO / mg d'anticorps)
EPO de référence (humaine)	150
EPO-surnageant (murine)	10

Tableau 8 : Capacités maximales de fixation de l'EPO de référence (R&D Systems – origine CHO) et de l'EPO-surnageant sur le gel CNBr activé, estimées par dosage ELISA de la quantité d'EPO en solution avant et après incubation du gel activé en présence d'un excès d'EPO.

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

2.3. Choix du tampon d'élué

Classiquement, les protéines fixées sur gel d'immuno-affinité sont éluées par élution acide, à pH 2-3, en présence de glycine qui possède un pouvoir tampon particulier dans cette zone (pKa : 2.34). Plusieurs essais ont montré que ce pH acide engendrait une dégradation significative de la molécule, même après neutralisation rapide (Figure 30), ainsi que d'importantes interférences sur le test ELISA utilisé pour évaluer la concentration d'EPO (Figure 31).

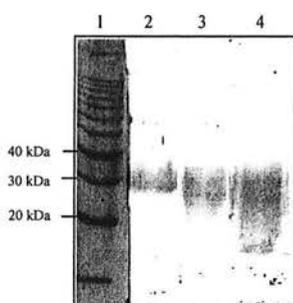


Figure 30 : Visualisation par Western-blot de la dégradation de l'EPO par l'élution acide. (Incubation de 12 mL de surnageant contenant 0.5 µg/mL d'EPO, avec de 60 µL de gel activé par 250 µg d'anticorps). Colonne #1: marqueur de taille; #2: EPO de référence (humaine); #3: EPO-surnageant (murine - clone CHO-UH1#24); #4: EPO-surnageant après immunopurification et élution acide (pH 3.3) et neutralisation rapide du pH.

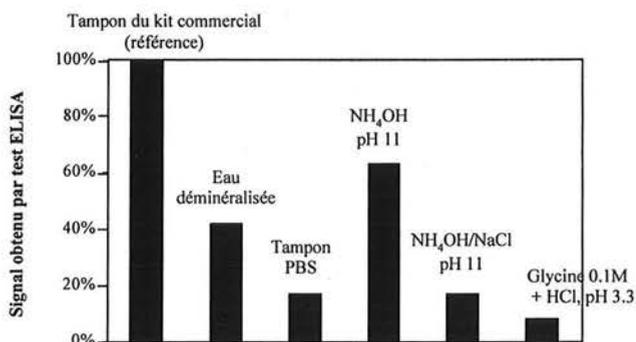


Figure 31 : Interférences de différents tampons sur la quantification de l'EPO par test ELISA (EPO de référence diluée 1/50 dans le tampon à tester, puis 1/50 dans le tampon du kit commercial).

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

La littérature ne mentionne pas ce type de phénomène concernant l'élution acide (avec l'acide acétique 0.1 M, pH 2.5 pour Miyazaki *et al.*, 1988) mais il est intéressant de noter que plusieurs auteurs ont étudié des méthodes d'élution différentes pour l'immuno-purification de l'EPO (KSCN 3 M, pH 7.0 pour Yang et Butler, 2000b et c ; MgCl₂ 4 M, pH 7.5 pour Wojchowski *et al.*, 1987b). D'autres tampons d'élution ont donc été testés afin de minimiser la dégradation de la protéine. Les essais en présence de SDS et borate (50 mM) ne se sont pas révélés satisfaisants (Figure 32), alors que l'élution basique (pH 11) par l'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) a montré qu'elle permettait de limiter les phénomènes de dégradation et d'interférences décrits précédemment (Figures 31 et 33). Cette méthode d'élution a donc été retenue pour la suite des travaux.

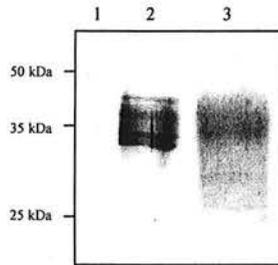


Figure 32 : Visualisation par Western-blot de la dégradation de l'EPO après élution par le tampon SDS/borate (50 mM). (Incubation de 26 mL de surnageant contenant 0.2 µg/mL d'EPO, avec de 100 µL de gel activé par 500 µg d'anticorps). Colonne #1 : marqueur de taille ; #2 : EPO-surnageant ; #3 : EPO-surnageant après immuno-purification et élution (SDS/borate 50 mM).

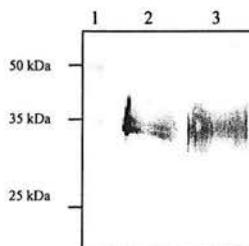


Figure 33 : Visualisation par Western-blot de la faible dégradation de l'EPO après l'élution basique (NH₄OH/NaCl, pH 11) et neutralisation rapide du pH (Tris). (Incubation de 6 mL de surnageant contenant 0.5 µg/mL d'EPO, avec de 60 µL de gel activé par 250 µg d'anticorps). Colonne #1 : marqueur de taille ; #2 : EPO-surnageant ; #3 : EPO-surnageant après immuno-purification et élution basique.

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

2.4. Etude de la qualité de la méthode

Dans un premier temps, la présence effective de l'EPO sur le gel CNBr activé ainsi que sa disparition après élution, ont été vérifiées en analysant directement le contenu du gel CNBr activé par Western-blot après fixation de l'EPO et après élution basique (Figure 34). Cependant, sur le plan quantitatif, l'EPO fixée sur le gel avant élution (puit #5) ne se retrouve pas complètement dans les fractions d'élution, en raison de pertes lors des lavages, et probablement également de prélèvements non homogènes (volumes très faibles : 15 μ L sur 300 μ L de mélange réactionnel).

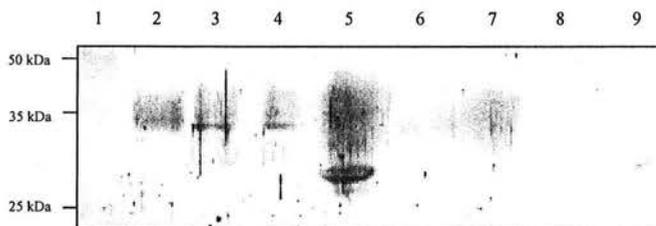


Figure 34 : Analyse par Western-blot du contenu du gel activé lors des différentes étapes de l'immuno-purification de l'EPO (après dénaturation). (Incubation de 20 mL de surnageant contenant 0.2 μ g/mL d'EPO, avec de 100 μ L de gel activé par 500 μ g d'anticorps). Colonne #1 : marqueur de taille ; #2 : EPO humaine de référence (25 ng) ; #3 : EPO-surnageant (20 ng – 0.5% v/v du volume réactionnel) ; #4 : EPO non fixée par sur le gel (0.5% v/v du volume réactionnel) ; #5 : EPO fixée sur le gel avant élution, détachée par la dénaturation avant analyse (5% v/v du mélange réactionnel) ; #6 : fraction de lavage à pH 10 par NH_4OH , NaCl 1 M (5% v/v du mélange réactionnel) ; #7 : fraction éluee à pH 11.5 (5% v/v du mélange réactionnel) ; #8 : fraction éluee à pH 11.8 par NH_4OH , NaCl 1 M (5% v/v du mélange réactionnel) et #9 : gel après élution (5% v/v du mélange réactionnel).

Afin d'évaluer la qualité des lavages et la pureté de l'EPO éluee, le contenu protéique des différentes fractions de lavage et d'élution a ensuite été analysé par coloration des protéines au nitrate d'argent après électrophorèse sur gel et par Western-blot (Figures 35 et 36).

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

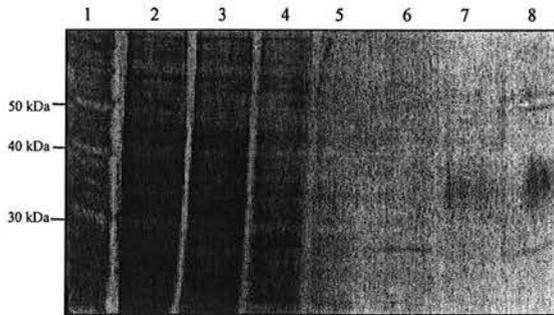


Figure 35 : Analyse du contenu protéique (coloration au nitrate d'argent) des différentes fractions d'immuno-purification de l'EPO. (Incubation de 20 mL de surnageant contenant 0.4 $\mu\text{g/mL}$ d'EPO, avec de 500 μL de gel activé par 1000 μg d'anticorps). Colonne #1 : Marqueur de taille ; #2 : surnageant à purifier (EPO initiale) ; #3 : surnageant après purification ; #4 : lavage PBST ; #5 : lavage PBS ; #6 : lavage pH 10 (NH_4OH , NaCl 1 M) ; #7 élution pH 11 (NH_4OH , NaCl 1 M) ; #8 élution pH 11.5 (NH_4OH , NaCl 1 M).

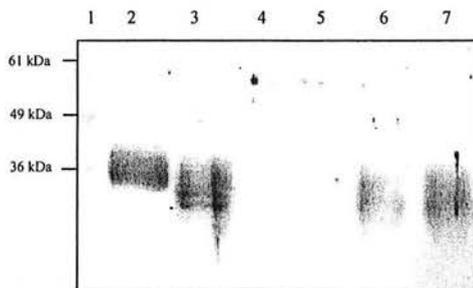


Figure 36 : Analyse par Western-blot des différentes fractions d'immuno-purification de l'EPO. (Incubation de 20 mL de surnageant contenant 0.4 $\mu\text{g/mL}$ d'EPO, avec de 500 μL de gel activé par 1000 μg d'anticorps). Colonne #1 : Marqueur de taille ; #2 : d'EPO humaine de référence (20 ng) ; #3 : surnageant à purifier (EPO initiale) ; #4 : surnageant après purification ; #5 : lavage pH 10 (NH_4OH , NaCl 1 M) ; #6 élution pH 11 (NH_4OH , NaCl 1 M) ; #7 élution pH 11.5 (NH_4OH , NaCl 1 M).

Les nombreuses protéines présentes dans le surnageant de culture sont donc très largement éliminées lors des différentes étapes de lavage ; une petite quantité d'albumine (bande à 60 kDa) se retrouve néanmoins dans les fractions d'élution, probablement en raison d'une fixation non

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

spécifique sur les anticorps. Cependant, nous avons considéré que l'EPO obtenue présentait un degré de purification suffisant pour la suite de nos travaux dans la mesure où l'albumine n'est pas une protéine glycosylée (ce qui a été confirmé par le fournisseur).

Ces différents essais ont donc conduit à la détermination de conditions de purification (Figure 37) permettant de fixer, puis d'éluer l'EPO présente dans le surnageant de culture, en la séparant des autres constituants susceptibles d'interférer avec l'étude ultérieure de sa glycosylation tout en minimisant sa dégradation.

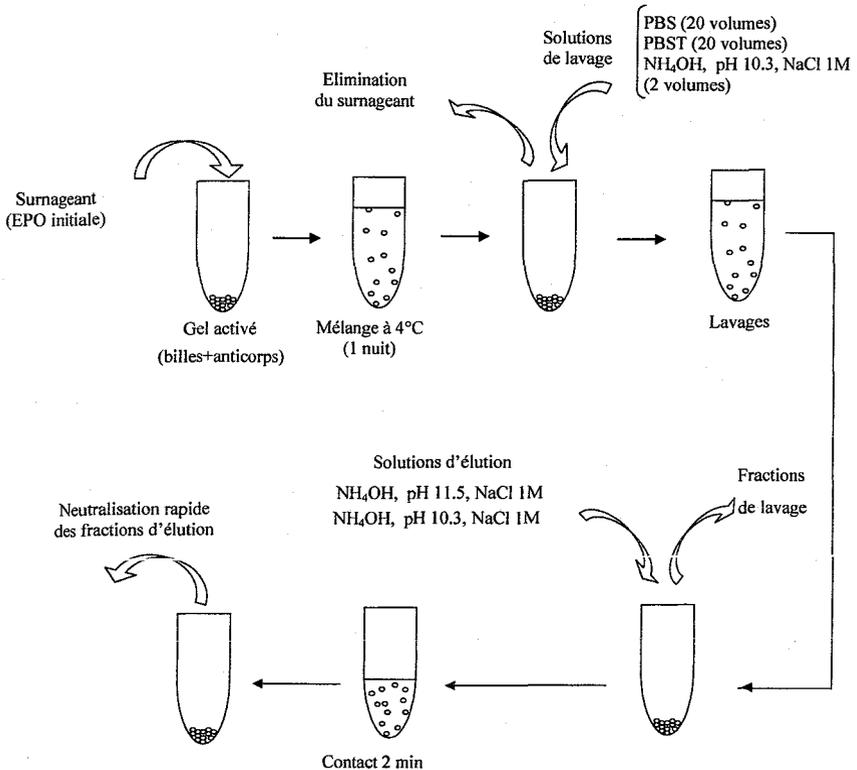


Figure 37 : Conditions opératoires de l'immuno-purification de l'EPO.

3. Analyse des chaînes glycaniques de l'EPO par électrophorèse capillaire

La glycosylation de l'EPO produite au cours des différents procédés a été étudiée en analysant son profil glycanique par électrophorèse capillaire. La technique utilisée permet de séparer les chaînes oligosaccharidiques de la partie peptidique par clivage enzymatique préalable, de les marquer par une molécule fluorescente, puis de les séparer par électrophorèse capillaire selon leur charge et leur taille.

3.1. Adaptation du protocole d'analyse des glycanes aux contraintes du suivi de la glycosylation de protéines recombinantes en cours de procédé

Selon le fournisseur, le kit d'analyse des oligosaccharides par électrophorèse capillaire est proposé pour l'analyse d'environ 150 à 200 µg de protéine, cette quantité pouvant varier en fonction du contenu glycanique de la glycoprotéine étudiée.

Afin d'appliquer cette méthode d'analyse à notre système de production d'EPO, et en particulier dans le but du suivi de sa glycosylation en cours de culture, il a été indispensable de réduire la quantité de protéine nécessaire à l'analyse par électrophorèse capillaire.

En effet, le suivi de la glycosylation en cours de culture implique des prélèvements de surnageant répétés et la faible concentration de protéines d'intérêt dans les surnageants de culture de cellules animales conduit généralement à prélever des volumes importants.

Plusieurs essais ont donc été réalisés dans ce but en utilisant la protéine de référence du kit, à savoir la ribonucléase B, dont la partie glycosylée ne représente que 10%_{p/p}. La qualité de son profil glycanique est assez facile à évaluer puisque, dans les conditions préconisées par le fournisseur (160 µg), il se présente sous forme de quatre pics de tailles décroissantes (M5, M6, M8 et M9) séparés par un petit triplet (M7), correspondants aux chaînes glycaniques de la ribonucléase B, composées d'un noyau commun de deux résidus N-acétylglucosamine sur lequel sont greffés 5 à 9 résidus mannose.

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

Dans un premier temps, la limite de sensibilité de la technique a été évaluée en analysant des quantités décroissantes de ribonucléase selon les conditions opératoires proposées par le fournisseur (Figure 38). Les profils électrophorétiques obtenus se sont révélés satisfaisants jusqu'à des quantités de 10 µg de ribonucléase (Figure 39).

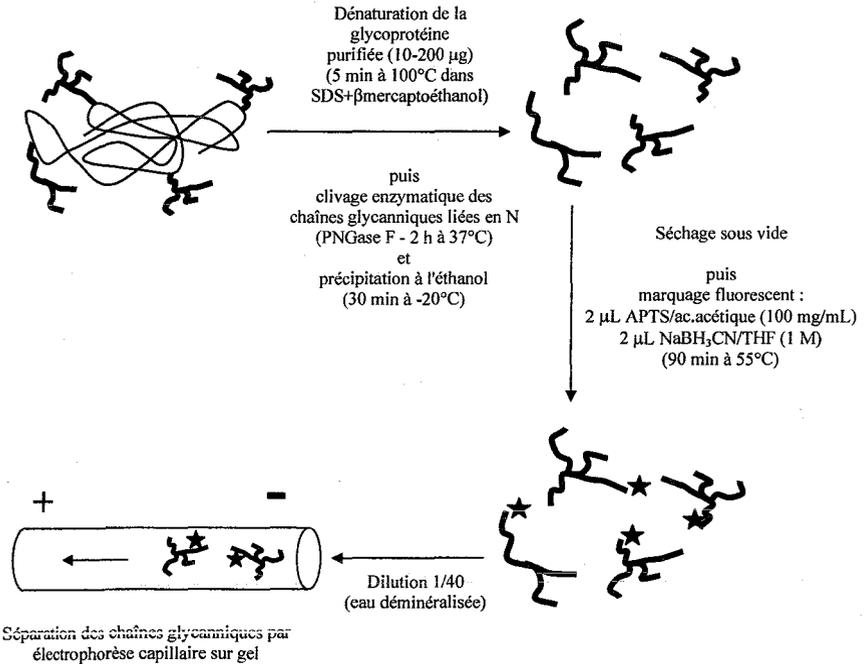


Figure 38 : Schéma simplifié du protocole d'analyse des chaînes glycaniques par électrophorèse capillaire (proposé par le fournisseur).

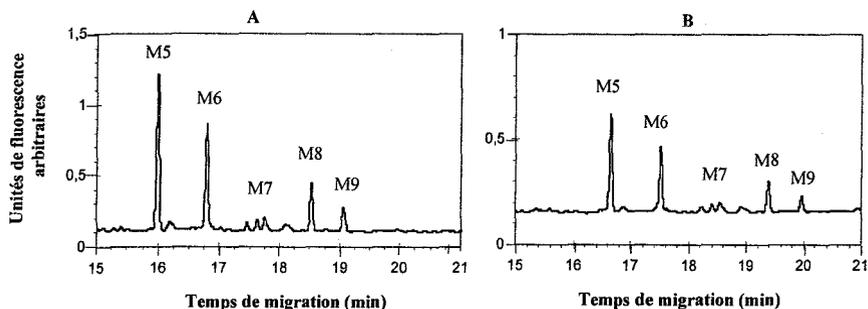


Figure 39 : Essais de diminution de la quantité de protéine analysée par électrophorèse capillaire. A : profil glycanique obtenu à partir de 60 µg de ribonucléase B (injection : 5 s) – B: profil glycanique obtenu à partir de 10 µg de ribonucléase B (injection : 15 s).

L'allongement du temps d'injection, de 5 à 30 s a permis d'augmenter sensiblement la quantité de ribonucléase analysée mais celle-ci s'est avérée limitée par l'excès de marqueur fluorescent (APTS) libre conduisant à la saturation du détecteur LIF (Laser Induced Fluorescence).

Afin de contourner ce facteur limitant, des essais de modification du protocole opératoire ont été envisagés. Ainsi, des essais de marquage fluorescent ont été effectués en diminuant la quantité d'APTS utilisée. La dilution finale a pu être réduite (de 1/40 à 1/2) tout en évitant la saturation du détecteur LIF mais des pics parasites sont apparus au cours de l'analyse : la concentration de certaines molécules (en particulier, les aldéhydes contenus dans l'acide acétique) s'est trouvée probablement amplifiée également par la moindre dilution réalisée (Figure 40).

Les conditions opératoires proposées par le fournisseur se sont donc avérées assez difficiles à optimiser. Cependant, dans les cas de très faibles quantités de protéine, la diminution de 2 à 1.5 µL d'APTS (100 mg/mL) et de cyanoborohydrate de sodium (1 M) pour le marquage fluorescent s'est révélée envisageable afin d'allonger au maximum la durée d'injection sans changer la dilution finale préconisée de 1/40. Ces conditions sont celles qui ont été finalement retenues pour analyser l'EPO murine produite par notre clone d'étude (Tableau 9).

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

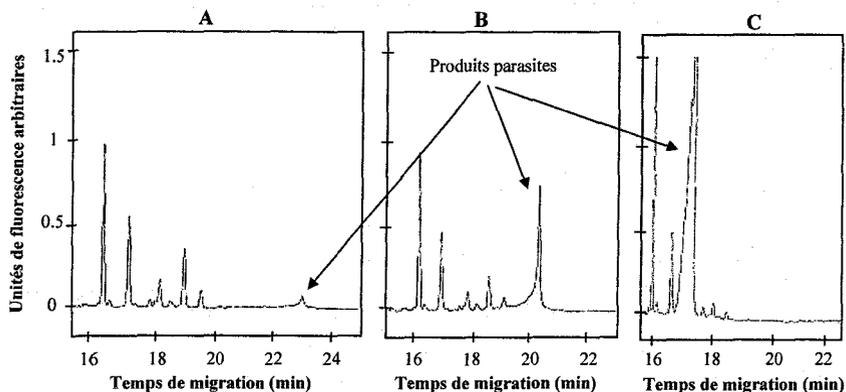


Figure 40 : Analyse par électrophorèse capillaire de la ribonucléase B (100 µg) après différentes conditions de préparation et d'injection. A : conditions de référence : APTS dans acide acétique 15% : 2 µL, dilution : 1/40, injection : 20 s - B : APTS dans acide acétique 15% : 1 µL + acide acétique : 1 µL, dilution : ½, injection : 5 s - C : APTS dans acide acétique 15% : 0.5 µL + acide acétique : 1.5 µL, dilution : ½, injection : 15 s.

Étapes	Conditions expérimentales
Dénaturation	5 min à 100°C (en présence de SDS et β-mercaptoéthanol)
Digestion glycosidase	PNGase F (2 µL) : incubation 1 nuit à 37°C (en présence de Nonidet NP-40)
Précipitation de la chaîne peptidique	Ethanol 100% (150 µL) : 30 min à -20°C
Marquage fluorescent	APTS/ac.acétique (100 mg/mL) : 1.5 µL NaBH ₃ CN/THF (1M) : 1.5 µL 90 min à 55°C
Dilution finale pour analyse par EC	1/10 (Eau déminéralisée)

Tableau 9 : Conditions opératoires finalement retenues pour l'analyse des chaînes glycaniques par électrophorèse capillaire.

3.2. Analyse des chaînes glycaniques de l'EPO par électrophorèse capillaire

L'analyse d'une EPO humaine recombinante commerciale (R&D Systems) a été réalisée afin de constituer une référence en prévision de l'étude de l'EPO produite par notre système, et de valider l'adaptation de la technique d'analyse à ses contraintes (faible quantité de protéine à analyser). Grâce aux essais réalisés avec la ribonucléase B, la quantité de glycoprotéine nécessaire à l'analyse par électrophorèse capillaire a pu être largement diminuée par rapport aux 200 µg préconisés par le fournisseur du kit d'analyse des oligosaccharides. L'analyse de 15 µg d'EPO humaine a donc été envisagée, cette quantité étant compatible avec les contraintes liées au volume de surnageant pouvant être prélevé lors d'un suivi en cours de culture, à la faible concentration de protéine produite et surtout au coût des anticorps utilisés lors de l'étape de purification.

3.2.1. Précisions méthodologiques

Afin de réduire les variations de migration provoquées par les possibles différences de conditions opératoires d'une analyse à une autre, et ainsi pouvoir comparer plus précisément différents profils glycaniques, il est d'usage de normer les temps de migration des pics obtenus par rapport à une "échelle de glucose" que représente une maltodextrine constituée d'un mélange d'oligomères d'une à vingt unités "glucose" (G1 à G20) (Figure 41).

On peut observer que le marqueur fluorescent libre (APTS) se présente sous forme de pics multiples rapprochés en début de profil, probablement en raison de produits liés à sa dégradation, ces pics étant également observés dans la littérature (Chen et Evangelista, 1998).

Ainsi, dans un but de clarté, le début des électrophorégrammes ne sera donc plus présenté, d'autant que la littérature ne mentionne pas de structures susceptibles d'apparaître avant 2 ou 3 unités "glucose" (G2 ou G3). Cet usage est d'ailleurs classiquement adopté pour présenter les profils glycaniques de ce type (Guttman, 1996 et 1997b ; Guttman *et al.*, 1996a et b ; Chen et Evangelista, 1998).

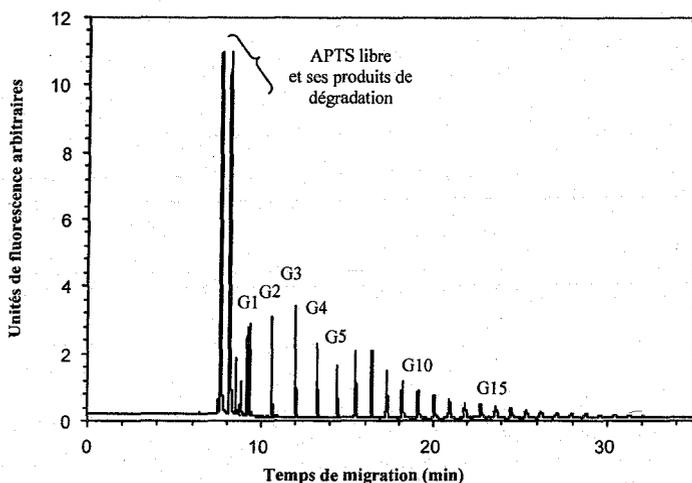


Figure 41 : Profil caractéristique de l'échelle de glucose obtenu par EC (mélange d'oligomères d'une à 20 unités de glucose).

Par ailleurs, rappelons que la composante glycanique des glycoprotéines produites par les cellules de mammifères est de structure principalement complexe, constituée de chaînes plus ou moins ramifiées (une à quatre branches) comprenant une quinzaine d'unités monosaccharidiques, la dernière étant généralement un acide sialique (cf. Bibliographie, Figure 10).

D'autre part, la vitesse de migration des molécules en électrophorèse capillaire est fortement dépendante du rapport charge / masse. Dans le cas du couplage de cette technique à un système de détection par LIF, chaque oligosaccharide est marqué par une molécule d'APTS fluorescente qui apporte trois charges négatives par ses trois groupements acides sulfoniques (Figure 42).

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

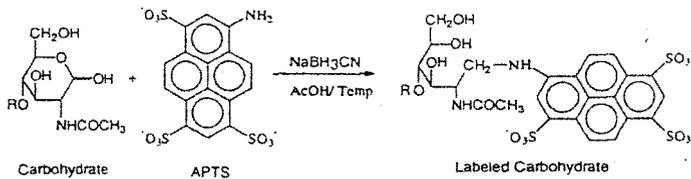


Figure 42 : Marquage fluorescent d'un oligosaccharide par l'APTS (9-aminopyrene-1,4,6-trisulfonate).

Lors de l'analyse des chaînes glycaniques complètes provenant de glycoprotéines, la vitesse de migration est fortement augmentée par le nombre d'acides sialiques que ces chaînes portent, chacun représentant une charge négative supplémentaire pour la molécule (Guttman, 1996 ; Guttman *et al.*, 1996a). En effet, au pH du tampon de migration utilisé (pH 4.75), les acides sialiques se présentent sous forme complètement ionisée en raison de leur totale dissociation induite par la valeur de leur pK de 2.6 (plus de 2 unités pH d'écart).

La séparation des espèces sialylées s'avère donc plus difficile puisque la migration des glycanes dépend également de leur degré de sialylation ; en outre, l'augmentation de la vitesse de migration due à la présence de ses acides sialiques, provoque un écrasement prononcé du profil électrophorétique.

La désialylation des chaînes glycaniques par action d'une sialidase ou par hydrolyse acide douce permettra donc d'améliorer la résolution de l'analyse par électrophorèse capillaire.

Ainsi, l'analyse des chaînes complètes apportera des informations sur leur sialylation, et l'analyse après désialylation permettra quant à elle de fournir des informations plus précises sur leur taille.

3.2.2. Caractérisation du profil de glycosylation d'une EPO humaine de référence

L'EPO humaine utilisée comme référence dans nos travaux est une forme recombinante produite par cellule CHO (R&D Systems). Elle se présente sous forme lyophilisée associée à de l'albumine (BSA).

Le profil de ses chaînes glycaniques entières (non désialylée chimiquement), obtenu par électrophorèse capillaire, est constitué de trois groupes de pics principaux dont les temps de migration relatifs (par rapport à l'échelle de glucose) sont respectivement de 4.8, 5.8 et 7.0 unités "glucose" (GU) (Figure 43).

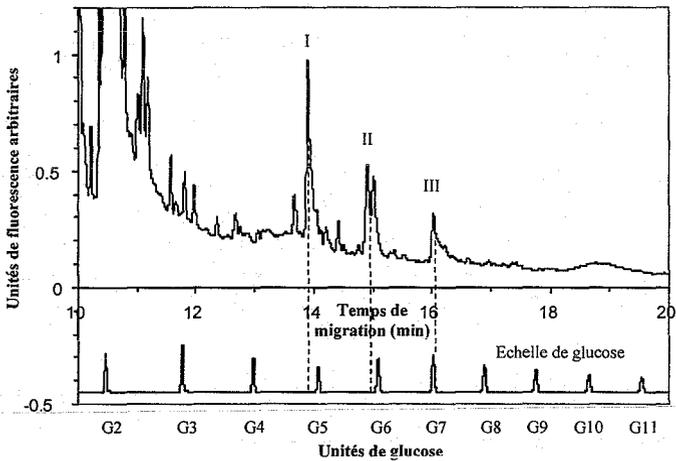


Figure 43 : Analyse par EC des chaînes glycaniques complètes de l'EPO humaine de référence, non désialylée et marquée à l'APTS. Echelle de glucose : mélange d'oligomères d'1 à 20 unités de glucose.

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

La désialylation des oligosaccharides obtenus a ensuite été réalisée afin de mieux caractériser leur taille. Une méthode enzymatique (sialidase de *Vibrio cholerae*) et deux conditions d'hydrolyse douce ont alors été testées : (1) sialidase : 18 h à 37°C, (2) acide acétique 0.5 M et (3) TFA 0.1 N : 1 h à 80°C.

Il s'avère que les trois méthodes conduisent à des profils similaires (Figure 44). La résolution obtenue avec le TFA est cependant moins bonne et la sialidase est plus contraignante à utiliser (temps d'action et coût plus élevés). Le traitement à l'acide acétique apparaît donc comme le meilleur mode de désialylation et a été retenu pour les analyses suivantes.

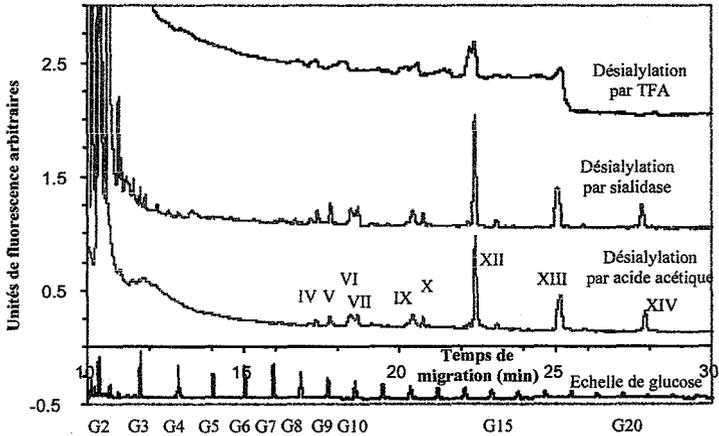


Figure 44 : Analyse par EC des chaînes glycaniques de l'EPO humaine de référence, désialylées par trois méthodes différentes (acide acétique 0.5 M, sialidase et TFA 0.1 N) et marquées à l'APTS.

Le profil glycanique de l'EPO humaine obtenu après désialylation montre que le nombre d'espèces pouvant être séparées est plus important qu'avant désialylation et que leurs temps de migration s'en trouvent allongés (de 9 à plus de 20 GU).

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

Comparativement à la littérature, ces profils apparaissent très similaires aux résultats décrits par Chen et Evangelista (1998) (Figure 45). Ces travaux constituent les seules références disponibles concernant l'analyse du profil glycanique de l'EPO par CE-LIF, et ont été obtenus à partir de 100 µg de protéine (d'origine recombinante) et d'un capillaire de silice nue.

Le capillaire N-CHO® utilisé pour nos analyses, était muni d'un revêtement neutre (polyvinyl-alcool) spécifiquement conçu pour réduire le flux électro-osmotique et donc le temps de migration (Guttman *et al.*, 1996a et b). Néanmoins, en comparant les profils glycaniques de fétuine décrits dans la littérature avec ces deux types de capillaire, on peut vérifier que les temps de migration relatifs (normés par rapport à l'échelle de glucose) sont assez comparables puisque les deux doublets caractéristiques migrent au niveau de 3 et 4 unités "glucose" (GU) dans les deux cas (Guttman *et al.*, 1996a ; Chen et Evangelista, 1998).

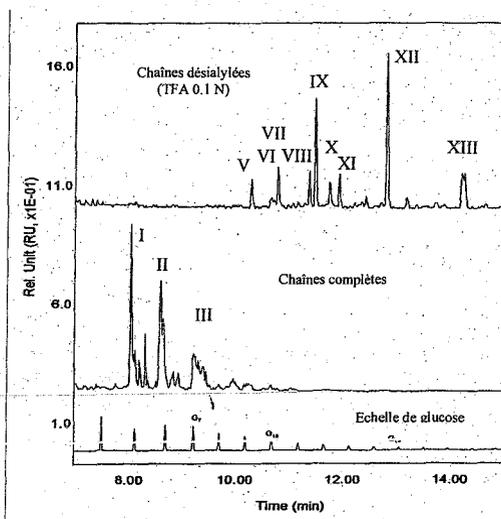


Figure 45 : Profils de glycosylation de l'EPO-h (100 µg) obtenus par EC, décrits dans la littérature. Capillaire : silice nue - Tampon de migration : acétate 25 mM, pH 4.75, contenant 0.4% d'oxyde de polyéthylène (PEO) (d'après Chen et Evangelista, 1998).

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

Par contre, dans le but de comparer nos résultats à ceux de la littérature, il est nécessaire de s'assurer que la composition du tampon de migration est bien identique car son pH et sa teneur en agent gélifiant (PEO) sont en effet susceptibles de modifier significativement les temps de migration relatifs de diverses espèces (Guttman *et al.*, 1996b). En particulier, la charge des chaînes sialylées pourra être très influencée par le pH du tampon de migration puisque l'état de dissociation des acides sialiques qu'elles portent est directement lié à l'écart de pH existant par rapport à leur pK de 2.6.

La comparaison des temps de migration relatifs des chaînes glycaniques, entières (sans désialylation chimique) et désialylées, permet de vérifier plus précisément la similitude des profils de l'EPO humaine de référence et de ceux rapportés par Chen et Evangelista (1998) (Tableaux 10 et 11).

Groupes de pics (#)	Temps de migration relatifs des chaînes glycaniques entières de l'EPO humaine (GU)		
	I	II	III
EPO humaine de référence	4.8	5.8 et 5.9	7.0
EPO humaine Chen et Evangelista (1998)	4.9	5.9	7.1

Tableau 10 : Comparaison des principaux groupes de pics du profil glycanique entier de l'EPO humaine de référence et de celui décrit par Chen et Evangelista (1998).

Pics (#)	Temps de migration relatifs des chaînes glycaniques désialylées de l'EPO humaine (GU)										
	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
EPO-h de référence	8.5	9.0	9.8	10.0		12.0	12.4		14.3	17.4	20.7
EPO-h Chen et Evangelista (1998)		9.3		10.4	11.5	11.8	12.5	12.9	14.6	17.7	

Tableau 11 : Comparaison des principaux pics du profil glycanique désialylé de l'EPO humaine de référence et de celui décrit par Chen et Evangelista (1998).

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

Quelques différences concernant la taille et le temps de migration relatifs des pics sont cependant perceptibles, mais ceci n'est pas surprenant puisque les deux EPO analysées proviennent de fournisseurs différents et qu'il est largement admis que la structure glycanique des glycoprotéines est susceptible d'être influencée par des conditions de production différentes (cf. Bibliographie).

La qualité des profils obtenus et leur conformité avec la référence disponible permettent donc de vérifier qu'il est possible de réduire de 150 à 15 µg la quantité de glycoprotéine nécessaire à l'analyse des chaînes glycaniques par EC, tout en conservant un profil satisfaisant, permettant de les caractériser précisément.

3.2.3. Nature des chaînes glycaniques de l'EPO-h de référence

L'EPO humaine recombinante est principalement constituée de chaînes glycaniques complexes bi-, tri- et tétra-antennées, dont la sialylation, quoique souvent importante, peut être variable (Sasaki *et al.*, 1987; Watson *et al.*, 1994). L'identification de tous les pics présents sur les profils électrophorétiques avant et après désialylation nécessiterait l'analyse des standards d'oligosaccharide correspondants. Ceci n'a pas été possible en raison de la grande diversité de structures potentielles et de l'indisponibilité de standards pour plusieurs de celles-ci.

L'analyse de standards d'oligosaccharides tri- et tétra-antennés, non-fucosylés et ne contenant qu'une seule structure lactosamine sur chaque branche, a cependant été réalisée afin de vérifier que les résultats de la littérature pouvaient être utilisés pour l'analyse plus précise des profils obtenus avec nos conditions opératoires (Figure 46). Ainsi, le temps de migration relatif du standard tri-antenné a été trouvé égal à 11.5 GU et celui du standard tétra-antenné à 13.5 GU. Ils sont du même ordre que les résultats indiqués par le fournisseur (Glyko) qui propose 11.6 et 13.5 GU pour ces mêmes molécules, ainsi que 10,1 GU pour le standard bi-antenné fucosylé. Selon les résultats rapportés par Chen et Evangelista (1998), le temps de migration relatif de ce standard a pu être évalué à 10,3 GU environ, et d'après les résultats publiés par Guttman *et al.* (1996b), celui du standard tri-antenné, à 11,3 GU; ceci confirme les données indiquées par le fournisseur (Tableau 12).

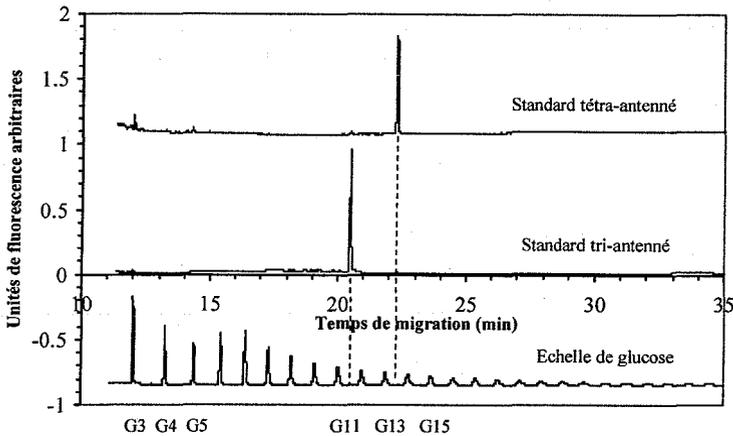


Figure 46 : Analyse par EC des standards d'oligosaccharides tri- et tétra-antennés (non fucosylés).

Standards d'oligosaccharides	Temps de migration relatifs (GU)		
	Analyses EC	Littérature	Fournisseur
Bi-antenné fucosylé (NA2F)		10.3 (Chen et Evangelista, 1998)	10.1
Tri-antenné (NA3)	11.5	11.3 (Guttman <i>et al.</i> , 1996b)	11.6
Tétra-antenné (NA4)	13.5		13.5

Tableau 12 : Synthèse des résultats concernant les standards d'oligosaccharides (analyses EC, littérature et fournisseur).

Notons également que les chaînes glycaniques sont potentiellement "fucosylées" sur leur unité GlcNAc initiale, ce qui est susceptible d'augmenter leur temps de migration, d'environ 0.7 GU pour les espèces non sialylées d'après les résultats donnés par le fournisseur.

Par ailleurs, la littérature concernant la glycosylation de l'EPO décrit la présence de formes portant un ou plusieurs résidus "lactosamine" (GlcNAc-Gal) supplémentaires. Il est intéressant de souligner que les standards tri- et tétra-antennés "simples" analysés précédemment diffèrent également d'un résidu de ce type (Figure 10); il est donc envisageable de penser que chaque

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

résidu "lactosamine" puisse induire une augmentation du temps de migration du même ordre, c'est à dire proche de 2 GU, ce qui peut expliquer la présence de pics au dessus de 15 GU sur notre électrophorogramme.

Ainsi, même si l'analyse de tous les standards d'oligosaccharides nécessaires à l'identification précise des pics observés n'a pu être effectuée, diverses hypothèses peuvent être formulées quant aux structures glycaniques qu'il est envisageable d'attribuer aux différents pics du profil glycanique de l'EPO désialylée de la figure 44 (Tableau 13).

Pics (#)	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	
	Temps de migration relatif (GU)											
EPO-h de référence	8.5	9.0	9.8	10.0		12.0	12.4		14.3	17.4	20.7	
EPO-h Chen et Evangelista (1998)		9.3		10.4	11.5	11.8	12.5	12.9	14.6	17.7		
	Structures glycaniques potentielles											
	Bi-antennée		Bi-antennée fucosylée		Tri-antennée		Tri-antennée fucosylée		Tétra-antennée fucosylée		Tétra-antennée fucosylée Lac1	Tétra-antennée fucosylée Lac2

Tableau 13 : Structures glycaniques possibles correspondant aux différents pics du profil de l'EPO désialylée de la figure 44.

Concernant l'analyse des chaînes glycaniques complètes (non désialylées chimiquement), nous avons vu que la migration ne dépendait pas uniquement de la taille des oligosaccharides présents, mais aussi et surtout de leur niveau de sialylation, ce qui réduit considérablement la résolution du profil obtenu. Ainsi, selon Guttman *et al.* (1996a) et Chen et Evangelista (1998), les chaînes tri-antennées tri- et tétra-sialylées de la févine migrent respectivement vers 3 et 4 GU et le standard di-antenné di-sialylé autour de 4.7 GU selon sa fucosylation. Les données proposées par le fournisseur sont identiques pour les formes di-sialylées, les espèces mono-antennées mono-sialylées étant annoncées vers 6.0-6.5 GU, toujours en fonction d'une éventuelle fucosylation. Il est intéressant de noter que la présence d'un résidu "fucose" a un effet d'autant moins important que la molécule est plus sialylée, l'augmentation induite étant d'environ 0.7 GU pour les molécules non sialylées, 0.5 et 0.2 GU pour les espèces mono- et di-sialylées. Ceci confirme la forte influence de la charge des résidus sialylés sur la vitesse de migration.

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

Les pics observés sur le profil de l'EPO humaine de référence paraissent ne pas correspondre exactement aux standards d'oligosaccharides sialylés présentés dans la littérature. Ceux-ci sont en effet entièrement sialylés (autant de résidus sialylés que d'antennes), ce qui n'est pas toujours le cas des chaînes présentes sur l'EPO (Watson *et al.*, 1994).

Ainsi, par exemple, il est probable qu'une espèce tétra-antennée di-sialylée comportant plusieurs structures "lactosamine" supplémentaires migre beaucoup plus lentement que le standard di-antenné di-sialylé "simple" et apparaisse donc plus proche du standard mono-sialylé. Les effets respectifs de la taille et de la charge des espèces se conjuguent donc et rendent très difficile la lecture du profil glycanique non désialylé (Tableau 14).

Groupes de pics (#)	Temps de migration relatifs (GU)		
	I	II	III
EPO humaine de référence	4.8	5.8 et 5.9	7.0
EPO humaine Chen et Evangelista (1998)	4.9	5.9	7.1
Structures glycaniques potentielles			
	Tetra-, tri- et di-sialylés	Di- et mono-sialylés	

Tableau 14 : Structures potentielles des différents groupes de pics du profil glycanique complet de l'EPO obtenu par EC.

Comme l'EPO analysée par Chen et Evangelista (1998) (Figure 45), l'EPO que nous avons utilisée comme référence, ne présente probablement pas de pics correspondant à des glycanes en deçà de 4 GU. En effet, les pics mineurs apparus entre G2 et G4 sur notre analyse (Figure 43) doivent probablement correspondre à des petites chaînes glycaniques dégradées et non à des formes hautement sialylées car ces pics semblent également être présents sur le profil après désialylation par la sialidase (Figure 44).

La littérature indique que les formes tétra-sialylées sont généralement très majoritaires sur l'EPO (Sasaki *et al.*, 1987; Watson *et al.*, 1994) et il serait surprenant qu'elles ne soient pas présentes sur les profils de notre EPO de référence, ni dans celui de l'EPO analysée par Chen et Evangelista (1998). Une hypothèse pouvant expliquer l'absence de pics nets vers 3 et 4 GU serait que la présence des structures "lactosamine" supplémentaires induit un allongement important du temps de migration, d'environ 1.5 à 2 GU.

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

En conclusion, nos analyses par électrophorèse capillaire montrent que la composante glycanique de l'EPO humaine utilisée comme référence dans nos travaux, est majoritairement constituée de chaînes glycaniques tétra-antennées, portant toutes au moins un résidu sialylé terminal ; toutefois, leur degré de sialylation apparaît très variable.

Plus généralement, ces résultats confirment que la technique d'analyse de l'EPO que nous avons retenue et adaptée à nos contraintes, permet d'analyser des quantités de protéines de l'ordre de 15 µg. Ainsi, après la génération d'un clone CHO producteur d'EPO murine, son adaptation à la culture en suspension, et la mise au point d'une méthode de purification simple et rapide, l'analyse par EC des oligosaccharides de l'EPO vient compléter le système que nous souhaitons établir pour étudier l'influence du procédé de culture sur la glycosylation d'une protéine recombinante (Figure 47).

I. De la construction génétique à l'analyse de la protéine purifiée

Construction de la cellule CHO recombinée productrice d'EPO

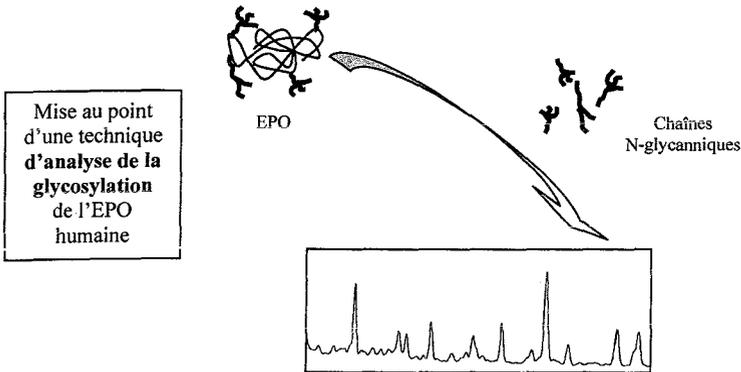
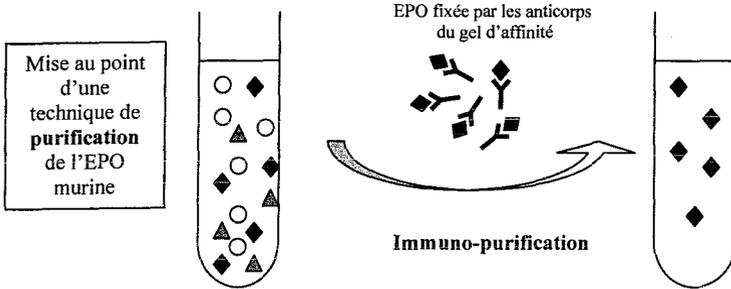
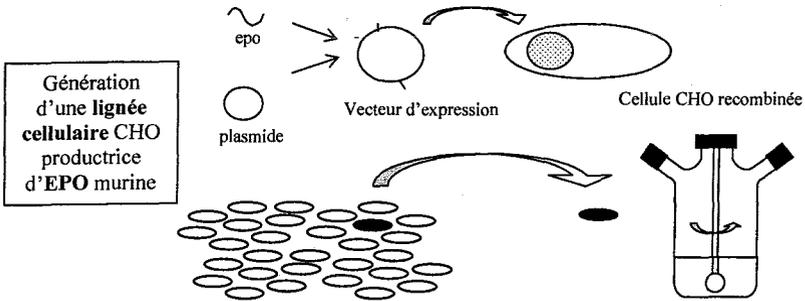


Figure 47 : Schéma présentant les différentes étapes réalisées pour analyser la structure glycanique de l'EPO produite par cellules CHO sous différentes conditions de culture.

RESULTATS ET DISCUSSION

II. SUIVI CINETIQUE DE LA GLYCOSYLATION DE L'EPO



II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO murine produite par culture discontinue de cellules CHO

Grâce aux différents outils mis au point (cellule CHO productrice d'EPO-m, immuno-purification et analyse des chaînes N-glycanniques par EC), l'analyse de l'EPO-m produite par culture de cellules CHO, puis immuno-purifiée, a pu être envisagée au cours de procédés discontinus.

1. Analyse des chaînes glycanniques de l'EPO-m et comparaison avec l'EPO-h

1.1. Identification des pics parasites induits par le milieu de culture

Parce que la mise au point de la méthode de purification a été réalisée selon des critères de spécificité, mais également de simplicité (limitation du nombre d'étapes en particulier, le but n'étant pas d'atteindre un degré de pureté de 100% mais d'éliminer au maximum les protéines du surnageant de culture pouvant interférer avec l'analyse de la glycosylation de l'EPO), la pureté de l'EPO après immuno-purification n'est pas parfaite. De façon à identifier les parasites qui seraient issus de la glycosylation d'autres protéines du milieu de culture, un témoin négatif a été effectuée en purifiant un surnageant de culture de cellules CHO non productrices d'EPO (de la même lignée d'origine UH-1).

Notons d'ores et déjà que pour des raisons ultérieurement présentées (comparaisons entre cultures plus précises), l'EPO murine analysée par EC a été produite par notre clone d'étude dans le milieu de culture SFX (HyClone), supplémenté par 5% de sérum. C'est donc ce même milieu qui a été utilisé comme témoin négatif ici.

Il apparaît qu'un certain nombre de pics sont effectivement présents et donc susceptibles d'interférer avec l'analyse des chaînes glycanniques de l'EPO (Figure 48). Par comparaison des profils avant et après désialylation, il semble que la plupart d'entre eux correspondent à des oligosaccharides non sialylés de petite taille. Cependant, il existe également quelques espèces

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

sialylées puisque certains pics, comme par exemple les pics # 12, 13 et 16, apparaissent modifiés par la désialylation (disparaissant et apparaissant sur le profil après désialylation).

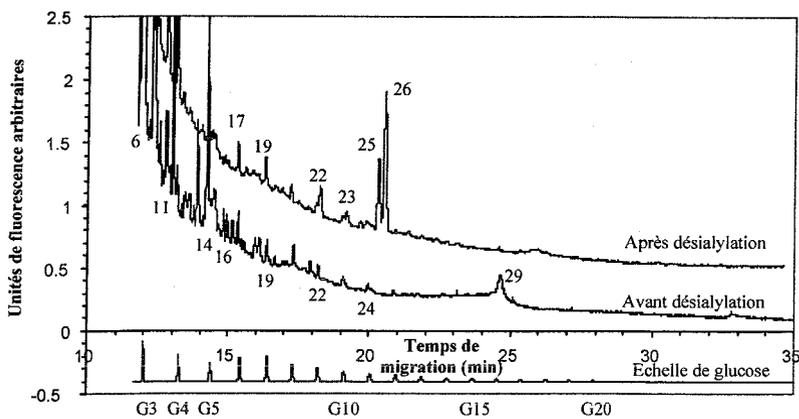


Figure 48 : Profil obtenu par EC du témoin négatif (6 mL de surnageant d'une culture de cellules CHO-UH1 non productrices d'EPO).

La caractérisation précise de tous ces pics d'interférence par leur temps de migration relatif permettra, lors de l'analyse des profils d'EPO-m, de différencier les chaînes provenant effectivement de celle-ci, de celles provenant d'autres molécules (glycoprotéines sécrétées ou relarguées par les cellules) présentes dans le surnageant de culture (Tableaux 15 et 16).

Le profil électrophorétique des chaînes glycaniques complètes de l'EPO-m produite par culture cellulaire puis immuno-purifiée, apparaît assez chargé mais plusieurs pics situés entre 2 et 4 GU étaient déjà présents dans le profil du témoin négatif et ne doivent donc pas être pris en compte pour l'analyse (Figure 49). C'est notamment le cas des pics # 1 à 12 (Tableau 15).

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

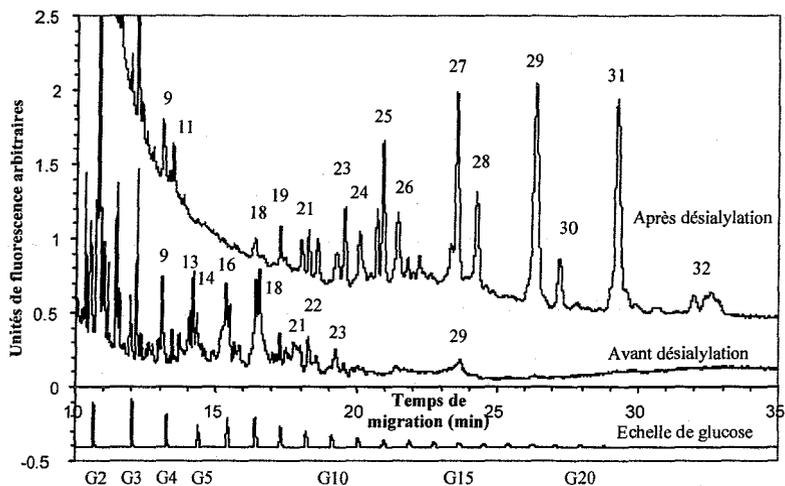


Figure 49 : Profils glycaniques de l'EPO-m produite par cellules CHO en mode discontinu, avant et après désialylation chimique.

Pics #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Témoin	2.2	2.3	2.5	2.5	2.8	3.0	3.2	3.3	3.7	3.9	4.0	4.2
EPO-m	2.1	2.2	2.5	2.5	2.8	3.0	3.2	3.3	3.7	3.9	4.0	4.2

Tableau 15 : Temps de migration relatifs des pics communs aux profils de l'EPO-m et du témoin négatif (avant désialylation).

Par contre, les temps de migration relatifs des groupes de pics #13, 14, 16 et 18 présentent une grande similitude avec ceux des trois groupes de pics présents sur le profil de l'EPO-h de référence de la figure 43 (Tableau 16).

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

Pics #	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Témoin -	4.5	5.0	5.2	5.5	6.0	6.2	7.0	7.5	8.0	9.0	9.8	10.7	11.3	11.5	11.7	12.6	14.9
EPO-m	4.6	4.8	5.3	5.7	6.1	6.8	7.7	7.9	8.3	8.8	9.9						14.7
Pics #	I			II			III										
EPO-h (réf.)	4,8			5,8 5,9			7,0										

Tableau 16 : Comparaison des profils de l'EPO-m, de l'EPO-h et du témoin négatif avant désialylation (pics supérieurs à 4.5 GU).

De plus, les pics # 16 et 18 se différencient assez franchement de ceux du témoin négatif, tant en ce qui concerne le temps de migration, signe d'une différence de structure, que de la taille, ce qui indique alors une augmentation de la quantité d'une chaîne glycanique déjà présente dans le témoin négatif.

Il est plus difficile de se prononcer sur les pics # 13 et 14 car les temps de migration sont proches, mais la taille des pics, assez sensiblement augmentée, suggère cependant qu'ils correspondent au moins partiellement à des chaînes provenant de l'EPO-m.

En ce qui concerne le profil glycanique de l'EPO-m obtenu après désialylation par hydrolyse acide, les pics majoritaires, de taille supérieure à 12 GU, sont absents du profil du témoin négatif et ont donc clairement pour origine l'EPO-m analysée.

D'autre part, les pics de moindre importance # 18, 19, 21, 22, 23 et 24 ont une taille ou un temps de migration différent de ceux du témoin négatif et proviennent donc également, pour une large part au moins, de l'EPO-m. De plus, les temps de migration caractérisant certains de ces pics (les majoritaires en particulier) sont très similaires avec ceux des pics de l'EPO-h de référence désialylée, ce qui renforce l'hypothèse de leur origine. (Tableau 17).

Par contre, le doublet correspondant à 11.4 et 11.6 GU se retrouve dans le profil du témoin négatif, en proportion comparable, et provient donc très probablement de glycoprotéines ou d'oligosaccharides présents dans le milieu de culture. Il en est de même pour les pics # 2 à 12 situés entre 2 et 4 GU dont les pics du témoin négatif correspondants sont de taille supérieure (ce qui pourrait indiquer une quantité de surnageant analysée supérieure pour le témoin négatif).

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

Pics #	14	17	18	19	21	22	23		24	25	26	27	28	29	30	31	32
Témoin -	5.0	6.0		7.0	8.0	9.1	10.0		10.7	11.3	11.5						
EPO-m			6.8	7.7	8.5	8.8	9.9		10.8	11.7	12.5	14.6	15.4	17.8	18.7	21.1	14.4
Pics #					IV	V	VI	VII		X	XI	XII		XIII		XIV	
EPO-h (réf.)					8.5	9.0	9.8	10.0		12.0	12.4	14.3		17.4		20.7	

Tableau 17 : Comparaison des profils de l'EPO-m, de l'EPO-h et du témoin négatif après désialylation (pics supérieurs à 4.5 GU).

Ainsi, la comparaison des profils de l'EPO-m produite par notre système avec ceux du témoin négatif et de l'EPO-h de référence permet de différencier les principaux pics issus effectivement de l'EPO-m de ceux provenant de molécules interférentes présentes dans le surnageant de culture.

1.2. Identification des pics correspondant aux chaînes sialylées de l'EPO-m

Les principaux pics d'interférence ayant pu être localisés, l'étape suivante consiste à analyser plus précisément la structure des chaînes glycaniques de l'EPO-m, et en particulier, leur état de sialylation. La comparaison des profils de l'EPO-m avant et après désialylation par hydrolyse chimique permet d'identifier les pics correspondant aux structures sialylées : les pics n'apparaissant sur le profil qu'après désialylation correspondent à des structures sialylées ayant perdu leurs acides sialiques terminaux au cours de l'hydrolyse acide douce.

Par contre, les pics non modifiés par l'étape de désialylation chimique correspondent à des chaînes glycaniques non sialylées qui sont généralement très minoritaires dans le cas de l'EPO (Sasaki *et al.*, 1987; Watson *et al.*, 1994). Une proportion plus importante de ce type de structures peut cependant s'observer quand une lignée cellulaire ou des conditions de culture particulières conduisent à une dégradation glycosidasique ou à une glycosylation anormale.

Ainsi, selon notre raisonnement, particulièrement mis en évidence par la figure 50, les pics # 13 à 18, 20 et 21 de l'EPO-m correspondent probablement à des chaînes sialylées, à l'origine de l'apparition des pics # 24 à 32 après désialylation, tandis que les pics # 19, 22 et 23 peu modifiés

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

par l'hydrolyse acide douce et inexistantes sur les profils de l'EPO-h de référence (Tableaux 16 et 17) correspondent, eux, à des oligosaccharides non sialylés.

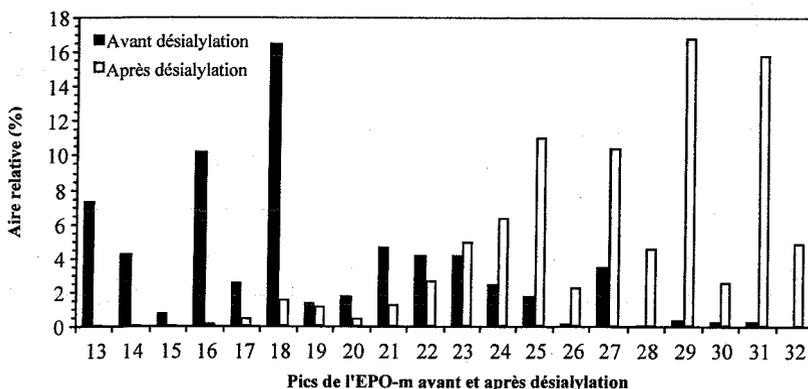


Figure 50 : Aire relative des pics de l'EPO-m avant et après désialylation (rapport entre l'aire particulière de chaque pic et l'aire totale de l'ensemble des pics du profil glycanique).

1.3. Discussion sur la nature des chaînes glycaniques de l'EPO-m

Plusieurs pics de l'EPO-m se retrouvent sur les profils de l'EPO-h avec des temps de migration relatifs similaires et ont donc déjà fait précédemment l'objet d'une analyse concernant la nature des structures auxquelles ils sont susceptibles de se rapporter. Ainsi, les groupes de pics # 13 à 18 correspondent probablement à des chaînes glycaniques tétra-, tri-, bi- et mono-sialylées, et les pics # 24 à 32, à des structures désialylées bi-, tri- et tétra-antennées.

Selon Guttman *et al.* (1996b), le type de sialylation (l'acide sialique pouvant être lié en position $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$ sur le résidu galactose sub-terminal de l'oligosaccharide) influe sensiblement sur le comportement électrophorétique des molécules et pourrait expliquer que les pics # 13, 14, 16 et 18 de l'EPO-m se présentent sous la forme de multiplets plus complexes que sur le profil de l'EPO-h. En effet, l'EPO-h de référence provient d'une lignée CHO classique dont les capacités de glycosylation ne permettent qu'une sialylation en position $\alpha 2,3$ tandis que la lignée CHO

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

ayant produit l'EPO-m a été génétiquement modifiée pour exprimer également l' α 2,6-sialyltransférase.

De plus, il faut noter que les cellules CHO peuvent synthétiser des acides sialiques de deux types, NeuAc (N-acétylneuraminique) ou NeuGc (N-glycolylneuraminique), dont le ratio est très variable d'une lignée cellulaire à une autre. La proportion des acides sialiques de type NeuGc (3% pour la lignée CHO UH-1) présents sur les chaînes glycaniques d'une glycoprotéine donnée, est donc également un facteur supplémentaire susceptible de faire varier son profil électrophorétique.

Les pics situés entre 7.5 et 11 GU (#19 à 24) sont très peu modifiés par la désialylation et ne sont pas présents sur l'EPO-h de référence. Ils correspondent probablement à des chaînes non sialylées de petite taille, probablement tronquées par une dégradation glycosidique, ou provenant d'une glycosylation inhabituelle pour l'EPO.

Les pics # 31 et 32 obtenus après désialylation sont présents en proportion plus importante que sur le profil de l'EPO-h de référence et correspondent à de longues chaînes glycaniques probablement tétra-antennées comportant 2 ou 3 structures de type "lactosamine" supplémentaires.

L'analyse de la glycosylation de l'EPO-m montre donc une grande similitude avec celle de l'EPO-h. Il est vrai que ces deux molécules ont été produites chacune par culture de cellules CHO et que leur composante peptidique présente une homologie importante (80%). Les différences de nature et de proportion relative des diverses chaînes glycaniques observées sont probablement liées à la lignée cellulaire et aux conditions opératoires utilisées, deux paramètres très importants dans le processus de glycosylation.

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

2. Suivi de la glycosylation de l'EPO-m sécrétée au cours d'une culture discontinue de cellules CHO

Les différents outils mis au point pour l'analyse de la glycosylation de l'EPO par électrophorèse capillaire ont permis d'envisager l'étude de l'influence que pouvait avoir le procédé de culture sur la qualité de la protéine produite.

Lors de la culture en mode discontinu, l'état physiologique des cellules évolue en permanence, principalement, en raison du changement des conditions environnementales au fur et à mesure de la consommation des nutriments et de la production de déchets cellulaires. Comme nous l'avons vu précédemment, les chaînes glycaniques des glycoprotéines sont synthétisées au cours de nombreux mécanismes enzymatiques intracellulaires. Les facteurs susceptibles d'influencer le métabolisme des cellules, tel que la durée de culture, peuvent par conséquent, modifier le processus de glycosylation. Nous avons donc étudié, dans un premier temps, la glycosylation de l'EPO synthétisée par notre clone d'étude (CHO-UH1#24) tout au long d'une culture discontinue. Comme nous le verrons ultérieurement (Chapitre III), soulignons que ce clone a été adapté à la culture en milieu sans sérum (SFX), et qu'afin de comparer différentes cultures le plus précisément possible, nous avons cherché à limiter les changements de conditions opératoires de notre procédé. Le milieu de culture SFX a donc également été utilisé ici pour des cultures supplémentées en sérum.

Ce chapitre est présenté sous forme d'un projet de publication.

HPCE-monitoring of the N-glycosylation pattern and sialylation of murine erythropoietin produced by CHO cells in batch processes

François LE FLOCH^{1,2,§}, Bertrand TESSIER¹, Sébastien CHENUET¹, Jean-Marc GUILLAUME², Pierre CANS², Annie MARC and Jean-Louis GOERGEN^{1}*

¹Laboratoire des Sciences du Génie Chimique – CNRS. Institut National Polytechnique de Lorraine – ENSAIA – 2, avenue de la Forêt-de-Haye, BP 172, F-54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

²Aventis Pharma – 13, quai Jules Guesde, 94400 Vitry sur Seine, France

[§]present address : MolMed SpA. – Via Olgettina 58, 20132 Milan, Italy

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

Abstract

Using capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence (HPCE-LIF), it was possible to profile N-linked oligosaccharides from EPO, including sialic acid-containing species, during the course of batch cultures performed either in serum-free or serum containing medium. Although an unusual high heterogeneity of the N-linked oligosaccharides was observed by both SDS-PAGE and HPCE analysis, the patterns of mEPO glycans after desialylation by mild acid hydrolysis were found to be quite constant over the course of the cultures either with or without serum supplementation. In contrast, when the protein was analyzed by HPCE without acidic desialylation, fingerprints of N-linked oligosaccharides changed with time in serum-containing conditions. This phenomenon appeared to be mainly due to the desialylation of mEPO as a result of a sialidase activity released upon cell lysis. These results demonstrate that though a higher EPO titer was obtained in serum supplemented conditions, sialylation of EPO was severely affected by the presence of serum in the culture medium.

Key words : capillary electrophoresis, murine recombinant EPO, N-glycosylation, sialylation, serum.

Introduction

A number of recombinant cytokines used as pharmaceuticals, including erythropoietin (EPO), γ -interferon or macrophage stimulating factors, are glycosylated proteins. While the polypeptide structure of these glycoproteins is generally invariant, the carbohydrate moiety is typically found to be quite heterogeneous, particularly concerning the terminal sialyl residues content and the branching pattern, inducing the presence of a number of distinct glycoforms. It has been widely reported that the oligosaccharide structure could play an important role with respect to the antigenicity (1, 2, 3), the *in vivo* half-life and the biological efficacy of those therapeutic agents (4, 5, 6, 7, 8). In particular, EPO desialylation causes a complete loss of its activity *in vivo* (7, 9). Thus, the characterization of carbohydrate structures during a recombinant protein production process is particularly important.

Regarding the culture process, a number of parameters have been shown to affect glycosylation, including host-cell line (10, 11, 12, 13, 14), process time and cultivation mode (15), ammonia accumulation (15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22), glucose depletion (23, 24, 25), glucosamine supplementation (26), growth rate (27), lipid availability (28) and dissolved oxygen (29, 30, 31). Moreover, some factors are known to act in an opposite way on glycoprotein structure depending on the production system used; for example, presence of serum may induce a decrease or an increase in the level of galactosylation of antibodies produced by a mouse hybridoma or by CHO cells (32). In addition, extracellular degradation by glycosidases or proteases may affect the glycosylation of the recombinant protein when excreted in the culture medium (33, 34). Therefore, it is essential to understand how the different parameters of the bioprocess affect the glycan structure to control the quality of the final product and to maximize the titer of desired glycoforms.

EPO is a particularly suitable model for studying glycosylation because of its highly glycosylated structure which represents 40% of its molecular weight. Murine and human forms are very similar molecules since both the coding DNA and the amino acid sequences are 80% conserved between the two species. Both mature proteins contains 166 amino acids and the three N-linked glycosylation sites are conserved in the mouse form (35). Besides, the two molecules have been showed to exhibit similar molecular weights (36).

N-glycan moieties of EPO were shown to affect both physical and biological properties of the protein such as secretion, half life, active conformation and homing to the bone marrow (4, 37, 38). For example, Asn-38 and Asn-83 of the human EPO play an essential role in EPO secretion,

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

since site-directed mutagenesis removing one of these glycosylation sites prevents EPO secretion (39, 40) and capping of external Galactose residues by sialic acids prevents the recognition of EPO by the asialo glycoprotein binding protein of the liver (41, 42). Characterization of the glycoforms of the commercial form of human EPO obtained from recombinant CHO cells have been highly documented (37, 38, 43, 44, 45, 46, 47). However, data on the influence of the culture conditions on the glycosylation of this protein remain very sparse. High concentrations of ammonia have been shown to alter the glycosylation pattern of EPO by decreasing sialylation and O-glycosylation of the protein (21, 22) and more recently, glucosamine supplementation was shown to increase the molecular heterogeneity of EPO (26). Nevertheless, no data regarding the desialylation of EPO during the course of a batch culture is available so far.

There are several methods available for the characterization of the glycan moieties of glycoproteins. Among those techniques, mass spectrometry is clearly the most powerful technique but requires highly purified products for analysis, which is a major drawback to routine monitoring of protein glycosylation. Capillary electrophoresis coupled with laser-induced fluorescence detection (HPCE-LIF) appears to be an interesting alternative by providing a rapid, high resolution and high sensitivity fingerprinting of the N-linked oligosaccharides derived from a glycoprotein (48). HPCE-profiles of several sialylated glycoproteins, including human recombinant EPO, kallikrein and bovine fetuin have already been reported (49) but only highly purified proteins have been analyzed so far. In fact, very few papers present the monitoring of the glycosylation of a recombinant protein during the course of a cell culture process (10, 15, 21, 34, 50) and none of them present the characterization of the glycosylation pattern of a recombinant protein by HPCE-LIF over the course of a batch culture.

In the present paper, the N-glycan pattern of recombinant murine EPO produced by CHO cells was assessed by capillary electrophoresis over the course of two batch cultures performed either in serum-containing or in serum-free medium.

Materials and Methods

1. Cell line and culture conditions

Recombinant murine EPO was produced by an $\alpha 2,6$ sialyltransferase expressing CHO cell line (51). The cassette bearing the cDNA of the murine EPO and a modified CMV promoter was inserted between *HindIII* and *EcoRI* restriction sites in a plasmid vector pSV40/Zeo (Invitrogen) containing the zeocin resistance marker. CHO cells were then transfected by electroporation with this mammalian expression vector (4.9 kb). CHO cells were grown in HyQ® SFX-CHO™ medium (HyClone) containing 3 g/L glucose, 4 mM glutamine, 10 mg/L ribonucleosides and deoxyribonucleosides in presence or absence of 5% fetal calf serum.

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

Cells were inoculated at 0.2×10^6 cells/mL into 200 mL of serum-containing medium and were cultured in suspension in spinner. The agitation rate was maintained at 40 rpm, temperature at 37°C and air was supplemented with 5% CO₂ during incubation. Supernatant was collected from the culture after 48, 100, 214 and 342 hours of culture, centrifuged at 800 rpm for 5 min for cell removal and stored at -80°C until required for purification and HPCE analysis.

Serum-free adapted cells of the same EPO producing cell line were inoculated at 0.2×10^6 cells/mL into a bioreactor with a working volume of 3.2 L. The agitation rate was set at 40 rpm, temperature at 37°C, pH at 7.3 and O₂ at 50%. Supernatant was collected after 125 hours of culture (at the end of the culture, when most of the cells are dead), centrifuged at 800 rpm for 5 min for cell removal, and stored at -80°C until required for purification and HPCE analysis.

Cell density was estimated using a haemocytometer and viability was measured by trypan blue exclusion method.

2. Elisa and western-blot analysis of EPO

EPO concentration in supernatant was determined by Elisa (R&D systems). The accuracy of the method is $\pm 20\%$. EPO was characterized on 12% SDS-PAGE in a discontinuous system according to Laemmli (52) in a mini slab gel apparatus (Bio-Rad). Concentrated supernatant samples were prepared in the sample buffer and boiled for 5 min. Proteins separated by SDS-PAGE were transferred onto PVDF membrane. The membrane was blocked by incubation with 5% milk/TBS for 1 h and then incubated overnight at 4°C with 1 μ g/mL of highly specific rabbit polyclonal anti-human EPO (R&D Systems). The membrane was washed for 5 min 3 times with TBS/0.05%Tween₂₀. Antibody binding was detected by incubation with 1:30000 diluted alkaline phosphate-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma) for 3 h at 37°C. The membrane was washed for 5 min 3 times with TBS/0.05%Tween₂₀, once with TBS and once with distilled water. BICP/NBT tablets (Sigma) were used as substrate. A standard recombinant human-EPO sample (R&D Systems) was used as a positive control and a protein molecular weight standard (GibcoBRL) was used to determine the molecular weight of protein bands.

3. Immunoaffinity purification of EPO

An immunoaffinity gel for the purification of EPO was prepared by coupling 1 mg of monoclonal anti-human EPO antibody (R&D Systems) to 150 mg of CNBr activated sepharose 4B (Sigma) corresponding to 0.5 mL of swollen gel.

Culture supernatants (containing 20 to 30 μ g of EPO) were loaded successively 3 times on this immunoaffinity gel overnight at 4°C under gentle agitation. The gel was successively washed with PBS (20 volumes), PBS/Tween₂₀ (20 volumes) and 1 M NaCl / NH₄OH, pH 10.3 (2 volumes). Elution of the bound EPO was first performed with 1 M NaCl / NH₄OH, pH 11.5 and then pH 11.8. The two eluant fractions were rapidly brought to neutral pH by the addition of 4 M TrisHCl, gathered together, concentrated and dialyzed against distilled water using a Centricon YM-10[®] centrifugal filter unit (Millipore). Finally, the amount of purified EPO was estimated to be between 5 and 10 μ g.

4. N-linked oligosaccharides analysis by HPCE

Glycans of immuno-purified EPO were analyzed according to a procedure derived from the method described by Chen and Evangelista (49) with an eCAP™ N-linked oligosaccharide profiling kit (Beckman). Original protocol was adapted to reduce to 10 μ g the amount of glycoprotein required for CE analysis (data not shown). CE separations were performed with a P/ACE 5000 (Beckman-Coulter) equipped with laser-induced fluorescence detector (excitation 488 nm / emission 520 nm) and 50 μ m \times 57 cm N-CHO (polyvinylalcohol) coated capillary using 25 mM acetate buffer, pH 4.75, containing 0.4% of polyethylene oxide. Equivalent quantities of N-linked glycans (approximately 0.3-0.4 nmoles maltose-equivalent quantified using the maltose internal standard) were introduced into the capillary by pressure injection (0.5 psi) for 20 s. Electrophoresis was performed at 25 kV with a current of approximately 12 μ A. Analysis of five profiles obtained after successive injections of the same sample showed that the mean error in the relative peak area was less than 10%.

4.1. Release of N-linked oligosaccharides from EPO by PNGase digestion

The dialyzed samples of purified EPO was concentrated to dryness on a centrifugal concentrator (Eppendorf). The residue was dissolved in a mixture containing 45 μ L of enzyme buffer, 1 μ L of 5% SDS and 1.5 μ L of 10% β -mercapto-ethanol. The denaturation by boiling for 5 min was followed by the addition of 5 μ L of NP-40 and 2 μ L of peptide-N-glycosidase F (PNGase) solution. The mixture was incubated overnight at 37°C for digestion. Released N-glycans were separated from the EPO polypeptide by precipitation with 150 μ L of cold 100% ethanol. The reaction mixture was incubated at -20°C for 1 h before being centrifuged. As labeling control, maltose (2 nmol) was added to the oligosaccharide-containing supernatant, which was then dried with a centrifugal concentrator.

4.2. Fluorescent labeling of oligosaccharides with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate (APTS)

The released glycans (0.3-0.4 nmoles maltose-equivalent) were labeled by reductive amination (49). The dried samples were dissolved in a mixture containing 1.5 μ L APTS (100 mg/mL) in 15% acetic acid and 1.5 μ L

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

NaBH₃CN (1 M) in THF, vortexed and then incubated overnight at 37°C for derivatization. After incubation, the labeled glycans were diluted to 50 µL with distilled water. A second dilution (1:10) in distilled water was performed before analysis.

4.3. Desialylation of oligosaccharides

Removal of the terminal sialyl residues of the N-glycans was performed by mild acidic hydrolysis. Thus, 4 µL of the 50 µL mixture containing the labeled oligosaccharides (before the second dilution) was mixed with 36 µL of 0.5 M acetic acid and incubated 1 h at 80°C.

5. Sialidase activity analysis

Cell-free supernatants were centrifuged at 10 000 g for 10 min to remove any cell fragments and then concentrated 15-fold at 4°C with a 10 kDa cut-off Nanosep® centrifugal ultrafiltration unit (Pall). Sialidase activity was determined by fluorescence according to the method described by Gramer (53) using 4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminic acid (Sigma) as substrate. The standardized assay was performed at 37°C with 188 µL of 4mM 4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminic acid, 119 µL of 1 M phosphate buffer (pH 6.2), 119 µL of distilled water and 325 µL of 15-fold concentrated supernatant. After 30 min, 250 µL of this solution were collected and then diluted in 2250 µL of 1 M glycine / KOH buffer (pH 10.4) to stop the enzymatic reaction. Quantification was carried out with a FLX spectrofluorometer (Safas, Monaco) using 4-methylumbelliferone (Sigma) as standard. Excitation of the samples was accomplished at 360 nm and fluorescence collected at 450 nm. The precision of the sialidase analysis is about $\pm 15\%$.

6. Kinetic data analysis

Specific rates of cell growth (μ) and EPO production (π) were calculated from smoothed values of viable (X_v) cell densities and EPO concentrations according to the following equations:

$$\mu = \frac{1}{X_v} \cdot \frac{dX_v}{dt} \quad \text{and} \quad \pi = \frac{1}{X_v} \cdot \frac{dEPO}{dt}$$

Results and Discussion

1. Kinetics of EPO producing CHO cells and EPO heterogeneity analysis in serum-containing batch culture

Recombinant EPO was produced by CHO cells grown in batch culture (Figure 1) : after a growth period of approximately 100 hours that yielded a maximal viable cell density of 1.2×10^6 cells/mL, the cell decline phase began. Dead cells appeared quite early in the supernatant, before 50 hours of culture, and the total cell number decrease observed after 170 hours showed that a significant cell lysis occurred during the process. EPO titer that increased during the process to reach a final titer of 6 µg/mL after 342 hours of culture, was mainly dissociated from the cell growth since the specific rate of EPO production began to increase after the growth phase ended. Thus, in order to maximize the yield of EPO, the production process was extended to 300 hours even though significant cell death had begun to occur by this time. Maximal specific rates were 0.035 h^{-1} for cell growth and $0.06 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells/h}$ for EPO production.

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

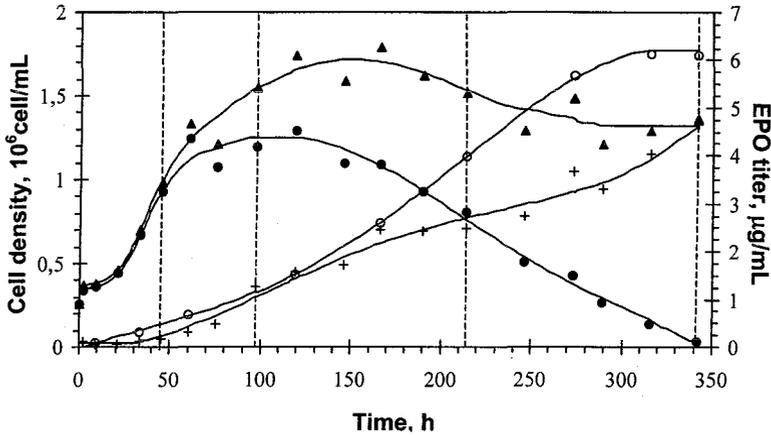


Figure 1. Kinetics of EPO producing CHO cells in serum-containing batch culture : titers of viable cells (●), dead cells (+), total cells (▲) and EPO (○) over the process. Supernatant was harvested after 48, 100, 214 and 342 hours of culture for HPCE analysis (vertical dotted lines).

To determine whether the glycosylation pattern of the recombinant EPO changes during the course of a batch culture, supernatants were collected and analyzed by western-blot: (i) during the growth period (48 hours); (ii) when maximal cell density was reached (100 hours); (iii) during the cell decline phase (214 hours) and (iv) at the end of the culture (342 hours).

The molecular weight range of the recombinant EPO produced in our culture system was found to extend from 25 to 40 kDa with major bands between 35 and 40 kDa (Figure 2a). This profile indicates a high degree of heterogeneity compared to the recombinant human EPO standard loaded on lane 7 of Figure 2a, or already reported in the literature (21, 43, 54, 55). Thus, this western-blot analysis suggests either a molecular degradation or a high degree of heterogeneity of the glycosylation of our recombinant protein. In fact, when an enzymatic N-deglycosylation was performed on the murine EPO using the peptide-N-glycosidase (PNGase), an intense band around 20 kDa appeared by western-blot analysis indicating that N-glycosylation is the main factor responsible for the molecular weight heterogeneity of our recombinant EPO (Figure 2b).

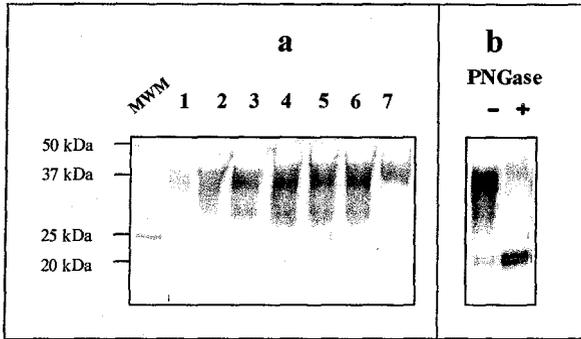


Figure 2. Western-blot analysis of recombinant murine EPO produced by CHO cells grown in serum-containing batch culture. a : Lanes 1-6 are samples of EPO collected after 48 h, 100 h, 214 h, 273 h, 315 h and 342 h; lane 7 shows the profile of the recombinant human EPO as standard. b : effect of an enzymatic N-deglycosylation of the murine recombinant EPO on the migration of the protein by SDS-PAGE electrophoresis. Molecular weight markers are indicated.

2. HPCE profile consistency of the desialylated N-linked glycans of EPO produced in serum-containing batch culture

Supernatant samples were collected during the different phases of the EPO producing serum containing batch culture and equivalent quantities of N-linked oligosaccharides were analyzed by HPCE after mild acidic desialylation. Such a removal of negatively charged sialic acids from carbohydrates yields species with reduced electrophoretic mobility and thus a better separation of the different N-linked glycans present on the surface of the recombinant protein.

As can be seen on Figure 3a, HPCE-profiles of EPO desialylated N-linked glycans were very similar all over the batch culture. Though slight modifications of some peaks' relative area were registered, desialylated profiles can be considered to be quite stable throughout the batch culture. This is consistent with the results reported by Yang and Butler (34) who found a constant glycosylation FACE-pattern of EPO produced by CHO cells after 4 and 7 days of a serum free batch culture.

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

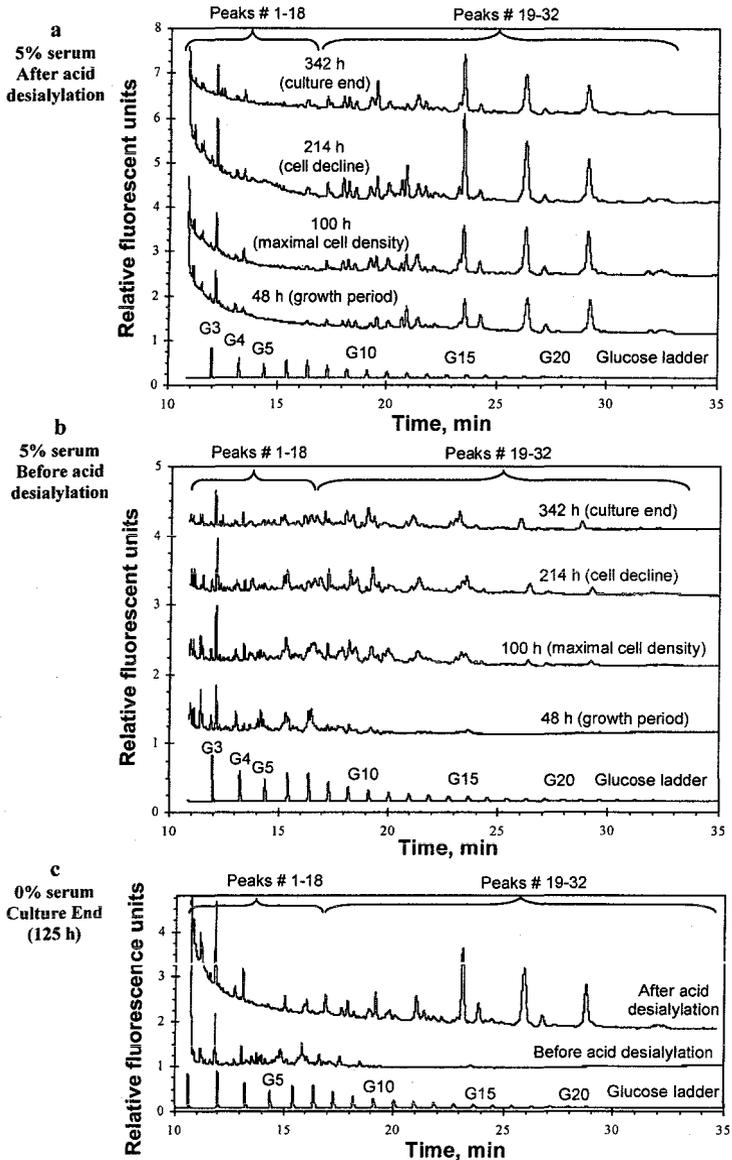


Figure 3. HPLC analysis of the N-linked oligosaccharides from EPO in serum-containing and serum-free batch cultures (after and before mild acidic hydrolysis).

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

Major peaks with relative migration times greater than 14 glucose units (GU), corresponding to different tetra-antennary forms containing a variable number of N-acetylglucosaminyl repeats, were detected. These results are in accordance with those obtained by mass spectrometry by Sasaki *et al.* (43) reporting that human EPO N-glycans are constituted by 85% of tetra-antennary chains with three (4.5%), two (16.5%), one (32%) or without (32%) N-acetylglucosaminyl repeats. In fact, high branching of the N-glycans seems to be essential for effective *in vivo* biological activity of EPO (5).

Unusual according to Sasaki *et al.* (43, 44), shorter glycoforms observed by western-blot analysis were confirmed by HPCE as some peaks corresponding to oligosaccharides smaller than bi-antennary chains (49) appeared before 10 GU.

3. Sialylation decrease of the EPO N-linked glycans produced in serum-containing batch culture

To monitor the sialylation of EPO produced in batch culture, HPCE-analysis of N-linked oligosaccharides was performed on the culture samples presented in Figure 3a, but without desialylation (Figure 3b). During the course of the culture, the relative proportion of the peaks smaller than 8 GU (peaks #1-18) progressively decreased while peaks #19-32 corresponding to structures with migration times greater than 8 GU appeared and significantly increased after 100 hours of culture. As *in vitro* desialylation of EPO yielded exclusively glycans with migration times greater than 8 GU (Figure 3a), glycans corresponding to the peaks #19-32 of Figure 3b are assumed to be mainly non sialylated. Indeed, whereas peaks #1-18 represented about 90% of the total glycans at the beginning of the process, 50% of the recombinant EPO glycans were non sialylated after 342 h of culture (Table 1).

As equivalent quantities of glycans were analyzed throughout the batch process, it can be seen on Figure 3b that sialylation of EPO significantly decreased with time. This phenomenon seems to be due to a desialylation of EPO during the course of the culture, while the dead cell density increased in the supernatant, rather than a *de novo* synthesis of non-sialylated forms of EPO.

In fact, a significant sialidase activity was measured in the culture medium after 48h of culture. This enzymatic activity increased over the batch process to reach 430 nmol/h/L in the supernatant at the end of the culture. Though quantitative information concerning sialidase activity remains very sparse, levels higher than 3 000 nmol/h/L have been reported in CHO cell

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

culture supernatants (33, 56, 57). Thus, the sialidase activity measured in our serum containing medium seems to be relatively low, which is in good agreement with the slow but continuous desialylation of murine EPO observed by HPCE over the batch process.

Accumulation of sialidase activity in CHO cell culture supernatant, as viability decreases, is a well-known phenomenon (33, 56, 58). It was shown that the sialidase activity recovered in the extracellular culture fluid was mainly due to the cytosolic form of this enzyme and that, contrary to other lysosomal glycosidases, secretion did not contribute significantly to this extracellular accumulation. Therefore, cell death with membrane permeabilization would be the expected mechanism for CHO sialidase release into the culture medium (58). Besides, in spite of controversial results concerning the instability of mammalian sialidase enzymes in cell lysate (59, 60), it has been more recently demonstrated that CHO cells possess stable sialidase activity at pH 7 (33) and several publications have reported progressive loss of terminal sialic acid of different recombinant glycoproteins produced by CHO cells as a consequence of increasing extracellular sialidase activity during batch cultivations (56, 61, 62).

Culture time	Relative area peaks #1-18 (sialylated glycans)	Relative area peaks #19-32 (non sialylated glycans)
48 hours	87 %	13 %
100 hours	63 %	37 %
214 hours	56 %	44 %
342 hours	51 %	49 %

Table 1. Relative area of peaks #1-18 and #19-32 obtained by HPCE analysis of N-linked glycans from EPO produced in FCS-containing batch culture.

4. Constancy of the N-glycosylation of EPO produced in serum-free culture

The same EPO-producing CHO cell line was cultured in batch process in serum-free conditions (Figure 4). As compared to the FCS-supplemented culture, though the maximal specific growth rate remained relatively high around 0.032 h^{-1} , a 50% reduced maximal cell density ($0.6 \times 10^6 \text{ cells/mL}$) was reached after 90 hours of process. Nevertheless, for those culture conditions, cell lysis remained negligible as the total cell number remained quite stable once the

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

maximal value was attained. Compared to the serum-containing batch process, EPO production was dramatically reduced (only 0.4 µg/mL) probably as a consequence of the reduction of the death phase duration that finished after 150 hours of culture and the decrease in the specific rate of EPO production (maximal value of only 0.01 µg/10⁶cells/h for those culture conditions).

Western-blot analysis of recombinant EPO showed an heterogeneity comparable to that found in serum-containing culture (Figure 5). This phenomenon appeared from the early phase of the culture and PNGase digestion showed that this heterogeneity was also due to N-glycosylation (data not shown).

As already reported by Yang and Butler (34) by FACE analysis, N-glycosylation patterns of sialylated or desialylated EPO were constant during the entire serum-free batch culture (data not shown). In addition, N-glycan profiles of recombinant EPO produced after 125 hours (at the end of the process when viability is around 20%) in serum-free batch culture were very similar to those of EPO produced at the beginning of the serum-containing process (Figure 3c): whereas very few peaks appeared after 8 GU prior desialylation, the *in vitro* desialylation yielded a glycan pattern identical to those obtained in FCS-supplemented culture after desialylation. Therefore, as previously reported (63, 64) desialylation of EPO observed in presence of serum did not occur in serum-free culture conditions.

Sialidase assays on the fresh culture medium supplemented with serum showed that desialylation is not due to endogenous serum sialidase as no significant activity was found (data not shown). In contrast, cultivating cells in absence of serum had a strong negative effect on the release of the sialidase activity as no significant activity was measured. Thus, even if sialidase activity measured in serum containing medium was found to be relatively low compared to the few results published in the literature, it is suggested that the degradation of EPO observed in our study was due to cytosolic sialidase activity released by the cells. Though the data presented in this paper were insufficient to draw a precise conclusion regarding the mechanism of sialidase release, it has already been reported that sialidase activity is released when cells lyse (56, 58). In fact, the very different behaviors of the cells during the growth and death phases of the two batch cultures probably involved different cell death mediated-mechanisms responsible for variable sialidase release. This hypothesis is in agreement with the significant cell lysis observed only during the serum containing batch culture (figures 1 and 4).

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

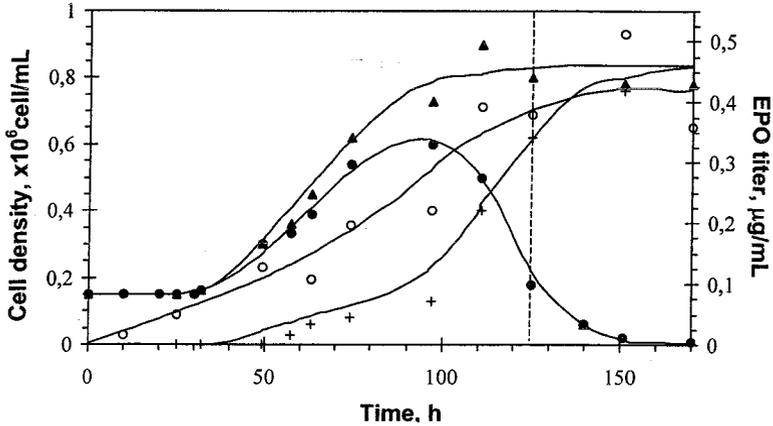


Figure 4. Kinetics of EPO producing CHO cells in serum free batch culture : concentrations of viable cells (●), dead cells (+), total cells (▲) and EPO (○) over the process. Supernatant was harvested after 125 h of culture for HPLC analysis (vertical dotted line).

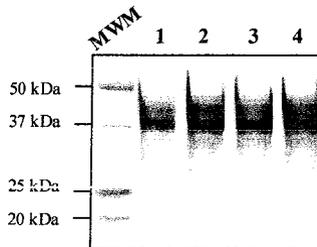


Figure 5. Western-blot analysis of recombinant murine EPO produced by CHO cells grown in serum-free batch culture. Lanes 1-4 are samples of EPO collected after 32 h, 86 h, 125 h and 170 h of culture. Molecular weight markers are indicated.

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

Furthermore, high ammonia concentration is also known to enhance the secretion rate of various glycosidase activities (58), and a titer as low as 2-5 mM has been shown to affect the glycosylation of proteins (15). Yang and Butler (21, 22, 26) showed also that high ammonia accumulation in the culture medium (20-30 mM) could alter the terminal sialylation of EPO produced by CHO cells; nevertheless, no desialylation of EPO was monitored during serum-free cultures when ammonia was not supplemented. Thus, because ammonia accumulated in only a slightly lower manner in serum-free conditions (5.7 against 8.5 mM), this factor is probably not responsible for the enhanced EPO heterogeneity observed in presence of serum.

Conclusions

N-linked glycan fingerprints of murine EPO produced by CHO cells was performed by HPCE-LIF analysis all over batch processes in serum containing or serum free media. This technique provided a convenient, high resolution separation for profiling glycans of glycoproteins issued from cell cultures : purification process was very simple and buffers used for analysis were common and compatible with most proteins. This represents advantages of importance comparing to the numerous requirements of other analytical techniques including the powerful HPLC-MS coupling.

We have shown by HPCE that the degree of sialylation of EPO produced by CHO cells could be severely reduced during the course of a serum-containing batch culture. As EPO production was mainly non growth-associated, the batch process was extended even though significant cell death had begun to occur by this time. One of the consequences is the significant sialidase activity found in the supernatant at the end of the culture, meaning that desialylation is certainly due to an enzymatic degradation upon release of a sialidase activity during cell lysis. However, though the SDS-PAGE and HPCE profiles showed an unusual high degree of glycan heterogeneity from the beginning of the culture (which suggested a possible degradation by glycosidases secreted by viable cells) the desialylated glycan pattern was found to be quite constant throughout the culture.

Since the host cell line used in this study expresses an α 2,6-sialyltransferase, EPO may carry both α 2,6- / α 2,3-linked sialic acids. Using the same host cell line, the sialylation state of another recombinant protein, γ -interferon, was performed and showed a ratio of (40.4/59.6) of α 2,6- / α 2,3-linked sialic acids (65). Thus, though the α 2,6- / α 2,3-linked sialic acids ratio of the

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

produced EPO was not experimentally determined, presence of both linkages can be assumed. As desialylated glycans obtained at the end of serum-containing culture is very similar to those of the glycans obtained after acid desialylation, it can be assumed that both linkages are sensitive to the secreted neuraminidase.

The serum-free process prevented cell lysis, release of sialidase activity and EPO desialylation. As the presence of sialic acids on the molecule surface reduce its hepatic clearance (41, 42), it may thus be of high interest to control CHO cell death and especially the lysis phenomenon during the EPO producing processes to avoid desialylation of the recombinant protein. An alternative would be to improve the EPO specific production rate in serum free conditions.

In serum free conditions, a high heterogeneity of EPO glycosylation was also observed from the beginning of the process. In fact, enzymatic degradation represents one of the main problems in recombinant glycoprotein production processes and it is interesting to emphasize that the type of enzyme concerned (proteases, sialidases or glycosidases) seems to be highly dependent on the cell line, the culture medium and the operating conditions. Process-linked differences in glycosylation/sialylation are likely to result from intracellular metabolism changes that may be induced by the absence of serum in medium or by the procedure of adaptation to serum-free culture.

Acknowledgements

This work was partly funded by the Agence Nationale pour la Recherche Technique. The authors are grateful to Dr. Abderrahim Mahfoudi for donating the cDNA coding for the EPO cassette, Fabrice Blanchard for his technical support, and Professor Jean Straczek and Pascal Perrin for their expert scientific assistance in capillary electrophoresis analysis.

References

- (1) Schauer, R. Sialic acids as antigenic determinants of complex carbohydrates. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1988**, *228*, 47-72.
- (2) Noguchi, A.; Mukuria, C.J.; Suzuki, E; Naiki, M. Immunogenicity of N-glycolylneuraminic acid-containing carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in CHO cells. *J. Biochem.* **1995**, *117*, 59-62.
- (3) Fernandes, A.I.; Gregoriadis, G. The effect of polysialylation on the immunogenicity and antigenicity of asparaginase : implication in its pharmacokinetics. *Int. J. Pharm.* **2001**, *217*, 215-224.

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

- (4) Dordal, M.S.; Wang, F.F.; Goldwasser, E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology* **1985**, *116*, 2293-2299.
- (5) Takeuchi, M.; Inoue, N.; Strikland, T.W.; Kubota, M.; Wada, M.; Shimizu, R.; Hoshi, S.; Kozutsumi, H.; Takasaki, S.; Kobata, A. Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7819-7822.
- (6) Imai, N.; Higuchi, M.; Kawamura, A.; Tomonoh, K.; Oh-Eda, M.; Fujiwara, M.; Shimonaka, Y.; Ochi, N. Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. Suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin *in vitro*. *Eur. J. Biochem.*, **1990**, *194*, 457-462.
- (7) Kobata, A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *209*, 483-501.
- (8) Misaizu, T.; Matsuki, S.; Strickland, T.W.; Takeuchi, M.; Kobata, A.; Takasaki, S. Role of antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin. *Blood* **1995**, *86*, 4097-4104.
- (9) Goldwasser, E.; Kung, C.K.; Eliason, J. On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation, the role of sialic acid in erythropoietin action. *J Biol Chem.* **1974**, *249*, 4202-4206.
- (10) Jenkins, N. Monitoring and control of recombinant glycoprotein heterogeneity in animal cell cultures. *Biochem. Soc. Trans.* **1995**, *23*, 171-175.
- (11) Tomiya, N.; Betenbaugh, M.J.; Lee, Y.C. Humanization of lepidopteran insect-cell-produced glycoproteins. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 613-620.
- (12) Zhang, F.; Murhammer, D.W.; Linhardt, R.J. Enzyme kinetics and glycan structural characterization of secreted alkaline phosphatase prepared using the baculovirus expression vector system. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2002**, *101*, 197-210.
- (13) Parekh, R.B.; Dwek, R.A.; Rudd, P.M.; Thomas, J.R.; Rademacher, T.W. N-glycosylation and *in vitro* enzymatic activity of human recombinant tissue plasminogen activator expressed in CHO cells and a murine cell line. *Biochemistry* **1989**, *28*, 7670-7679.
- (14) Kagawa, Y.; Takasaki, S.; Utsumi, J.; Hosoi, K.; Shimizu, H.; Kochibe, N.; Kobata, A. Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of natural human interferon- β 1 and recombinant human interferon- β 1 produced by three different mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 17508-17515.
- (15) Kopp, K.; Schluter, M.; Werner, R.G. Monitoring the glycosylation pattern of recombinant interferon-omega with high-pH anion-exchange chromatography and capillary electrophoresis. *Arzneim-Forsch./Drug Res.* **1996**, *42*, 1191-1196.
- (16) Andersen, D.C.; Goochee, C.F. The effect of ammonia on the O-linked glycosylation of granulocyte colony-stimulating factor produced by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *47*, 96-105.
- (17) Borys, M.C.; Linzer, D.I.H.; Papoutsakis, E.T. Ammonia affects the glycosylation patterns of recombinant mouse placental lactogen-I by Chinese hamster ovary cells in a pH-dependant manner. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 505-514.
- (18) Gawlitzek, M.; Valley, U.; Wagner, R. Ammonium ion and glucosamine dependent increases of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *57*, 518-528.
- (19) Jenkins, N.; Curling, E.M.A. Glycosylation of recombinant proteins : problems and prospects. *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, *16*, 354-364.
- (20) Grammatikos, S.I.; Valley, U.; Nimtz, M.; Conrath, H.S.; Wagner, R. Intracellular UDP-N-acetylhexosamine pool affects N-glycan complexity : a mechanism of ammonium action on protein glycosylation. *Biotechnol. Prog.* **1998**, *14*, 410-419.
- (21) Yang, M.; Butler, M. Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production and glycosylation. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *68*, 370-380.

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

- (22) Yang, M.; Butler, M. Effect of ammonia on the glycosylation of human recombinant erythropoietin in culture. *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 751-759.
- (23) Gershman, H.; Robbins, P.W. Transitory effects of glucose starvation on the synthesis of dolichol-linked oligosaccharides in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 7774-7780.
- (24) Hooker, A.D.; Goldman, M.H.; Markham, N.H.; James, D.C.; Ison A.P.; Bull, A.T.; Strange, P.G.; Salmon, I.; Baines, A.J.; Jenkins, N. N-glycans of recombinant human interferon- γ change during batch culture of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *48*, 639-648.
- (25) Nyberg, G.B.; Balcarcel, R.R.; Follstad, B.D.; Stephanopoulos, G.; Wang, D.I. Metabolic effects on recombinant interferon- γ glycosylation in continuous culture of CHO cells *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *62*, 336-347.
- (26) Yang, M.; Butler, M. Effects of ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms. *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 129-138.
- (27) Hayter, P.M.; Curling, E.M.A.; Gould, M.L.; Baines, A.J.; Jenkins, N.; Salmon, I.; Strange, P.G.; Bull, A.T. The effect of the dilution rate on CHO cell physiology and recombinant interferon- γ production in glucose-limited chemostat culture. *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *42*, 1077-1085.
- (28) Jenkins, N.; Castro, P.; Menon, S.; Ison, A.; Bull, A. Effect of lipid supplements on the production and glycosylation of recombinant interferon- γ expressed in CHO cells. *Cytotechnology*. **1994**, *15*, 209-215.
- (29) Kunkel, J.P.; Jan, D.C.; Jamieson, J.C.; Butler, M. Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *J. Biotechnol.* **1998**, *62*, 55-71.
- (30) Kunkel, J.P.; Jan, D.C.; Butler, M.; Jamieson, J.C. Comparisons of the glycosylation of a monoclonal antibody produced under nominally identical cell culture conditions in two different bioreactors. *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 462-470.
- (31) Zhang, F.; Saarinen M.A.; Itle, L.J.; Lang S.C.; Murhammer, D.W.; Linhardt, R.J. The effect of dissolved oxygen (DO) concentration on the glycosylation of recombinant protein produced by the insect cell-baculovirus expression system. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *77*, 219-224.
- (32) Jenkins, N.; Parekh, R.B.; James, D.C. Getting the glycosylation right : implications for the biotechnology industry. *Nature Biotechnology* **1996**, *14*, 975-981.
- (33) Gramer, M.J.; Goochee, C.F. Glycosidase activities in Chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant. *Biotechnol. Prog.* **1993**, *9*, 366-373.
- (34) Yang, M.; Butler, M. Enhanced erythropoietin in a CHO culture is caused by proteolytic degradation and can be eliminated by a high glutamine level. *Cytotechnology* **2000**, *34*, 83-89.
- (35) Shoemaker, C.B.; Mitsock, L.D. Murine erythropoietin gene : cloning, expression, and human gene homology. *Mol. Cell. Biol.* **1986**, *6*, 849-858.
- (36) Cutler, R.L.; Johnson, G.R.; Nicola, N.A. Characterization of murine erythropoietin. *Exp. Hematol.* **1985**, *13*, 899-903.
- (37) Tsuda, E.; Kawanishi, G.; Ueda, M.; Masuda, S.; Sasaki, R. The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *188*, 405-411.
- (38) Takeuchi, M.; Kobata, A. Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins. *Glycobiology* **1991**, *1*, 337-346.
- (39) Dubè, S.; Fisher, J.W.; Powell, J.S. Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion and biological function. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 17516-17521.
- (40) Delorme, E.; Lorenzini, T.; Giffin, J.; Martin, F.; Jacobsen, F.; Boone, T.; Elliott, S. Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9871-9876.

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

- (41) Spivak, J.L.; Hogans, B.B. The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. *Blood* **1989**, *73*, 90-99.
- (42) Higuchi, M.; Oh-eda, M.; Kuboniwa, H.; Tomonoh, K.; Shimonaka, Y.; Ochi, N. Role of sugar chains in the expression of the biological activity of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 7703-7709.
- (43) Sasaki, H.; Bothner, B.; Dell, A.; Fukuda, M. Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in CHO cells by a human erythropoietin cDNA. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 12059-12076.
- (44) Sasaki, H.; Ochi, N.; Dell, A.; Fukuda, M. Site-specific glycosylation of human recombinant erythropoietin : analysis of glycopeptides or peptides at each glycosylation site by fast atom bombardment mass spectrometry. *Biochemistry* **1988**, *27*, 8618-8626.
- (45) Recny, M.A.; Scooble, H.A.; Kim, Y. Structure characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17156-17163.
- (46) Takeuchi, M.; Takasaki, S.; Miyazaki, H.; Kato, T.; Hoshi, S.; Kochibe, N.; Kobata, A. Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant CHO cells. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 3657-3663.
- (47) Hokke, C.H.; Bergwerff, A.A.; Van Dedem, G.W.; Kamerling, J.P.; Vliegthart, J.F. Structural analysis of the sialylated N- and O-linked carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. Sialylation patterns and branch location of dimeric N-acetyllactosamine units. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *228*, 981-1008.
- (48) Guttman, A. High-resolution carbohydrate profiling by capillary gel electrophoresis. *Nature* **1996**, *380*, 461-462.
- (49) Chen, A.F.T.; Evangelista, R.A. Profiling glycoprotein N-linked oligosaccharide by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 2639-2644.
- (50) Goldman, M.H.; James, D.C.; Rendall, M.; Ison, A.P.; Hoare, M.; Bull, A.T. Monitoring recombinant human interferon- γ N-glycosylation during perfused fluidized-bed and stirred-tank batch culture of CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *60*, 596-607.
- (51) Monaco, L.; Marc, A.; Eon-Duval, A.; Acerbis, G.; Distefano, G.; Lamotte, D.; Engasser, J.M.; Soria, M.; Jenkins, N. Genetic engineering of α 2,6-sialyltransferase in recombinant CHO cells and its effect on the sialylation of recombinant interferon- γ . *Cytotechnology* **1996**, *22*, 197-203.
- (52) Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
- (53) Gramer, M.J. Detecting and minimizing glycosidase activities that can hydrolyze sugars from cell culture-produced glycoproteins. *Mol. Biotechnol.* **2000**, *15*, 69-75.
- (54) Miyake, T.; Kung, C.K.H.; Goldwasser, E. Purification of erythropoietin. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 5558-5564.
- (55) Jacobs, K.; Shoemaker, C.; Rudersdorf, R.; Neill, S.D.; Kaufman, R.J.; Mufson, A.; Seehra, J.; Jones, S.S.; Hewick, R.; Fritsch, E.F.; Kawakita, M.; Shimizu, T.; Miyake, T. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human ERYTHROPOIETIN. *Nature* **1985**, *313*, 806-810.
- (56) Munzert, E.; Muthing, J.; Buntmeyer, H.; Lehmann, J. Sialidase activity in culture fluid of Chinese hamster ovary cells during batch culture and its effects on recombinant human antithrombin III integrity. *Biotechnol. Prog.* **1996**, *12*, 559-563.
- (57) Munzert, E.; Heidemann, R.; Buntmeyer, H.; Lehmann, J.; Muthing, J. Production of recombinant human antithrombin III on 20-L bioreactor scale : correlation of supernatant neuraminidase activity, desialylation, and decrease of biological activity of recombinant glycoprotein. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *56*, 441-448.
- (58) Gramer, M.J.; Gooch, C.F.; Chock, V.Y.; Brousseau, D.T.; Sliwowski, M.B. Removal of sialic acid from a glycoprotein in CHO cell culture supernatant by action of an extracellular CHO cell sialidase. *Bio/Technology* **1995**, *13*, 692-698.

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

- (59) Potier, M.; Beaugard, G.; Belisle, M.; Mameli, L.; Hong, V.N.; Melancon, S.B.; Dallaire, L. Neuraminidase activity in the mucopolidoses (types I, II and III) and the cherry-red spot myoclonus syndrome. *Clin. Chim. Acta.* **1979**, *99*, 97-105.
- (60) Nguyen Hong, V.; Beaugard, G.; Potier, M.; Belisle, M.; Mameli, L.; Gatti, R.; Durand, P. Studies on the sialidases : properties of human leukocyte neuraminidases. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *616*, 259-270.
- (61) Warner, T.G.; Chang, J.; Ferrari, J.; Harris, R.; McNeerney, T.; Bennett, G.; Burnier, J.; Sliwowski, M.B. Isolation and properties of a soluble sialidase from the culture fluid of CHO cells. *Glycobiology* **1993**, *3*, 455-463.
- (62) Zhang, J.; Wang, D.I.C. Quantitative analysis and process monitoring of site-specific glycosylation microheterogeneity in recombinant human interferon- γ from CHO cell culture by hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. B* **1998**, *712*, 73-82.
- (63) Gawlitzek, M.; Valley, U.; Nimitz, M.; Wagner, R.; Conradt, H.S. Characterization of changes in the glycosylation pattern of recombinant proteins from BHK-21 cells due to different culture conditions. *J. Biotechnol.* **1995**, *42*, 117-131.
- (64) Patel, T.P.; Parekh, R.B.; Moellering, B.J.; Prior C.P. Different culture methods lead to differences in glycosylation of a murine IgG monoclonal antibody. *Biochem. J.* **1992**, *285*, 839-845.
- (65) Bragonzi, A.; Distefano, G.; Buckberry, L.D.; Acerbis, G.; Foglieni, C.; Lamotte, D.; Campi, G.; Marc, A.; Soria, M.R.; Jenkins, N. and Monaco, L. A new Chinese hamster ovary cell line expressing small alpha, a2,6-sialyltransferase used as universal host for the production of human-like sialylated recombinant glycoproteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, *1474*, 273-282.

II. Suivi cinétique de la glycosylation de l'EPO

3. Conclusions

Nous avons donc vu, dans un premier temps, que le profil de glycosylation de l'EPO murine produite par notre clone d'étude était assez proche de celui de l'EPO humaine utilisée comme référence.

Cependant, le profil obtenu peut être fortement modifié en fonction des conditions de culture utilisées pour produire cette EPO murine (Figure 51). En effet, en milieu contenant du sérum, une désialylation de la protéine survient progressivement au cours du temps, probablement en raison d'une dégradation enzymatique à la suite de la libération d'une sialidase dans le milieu extracellulaire par le grand nombre de cellules qui se lysent en présence de sérum. Par contre, ces différents phénomènes ne surviennent pas en milieu sans sérum, et le profil de glycosylation de l'EPO produite (en particulier, sa sialylation) apparaît constant tout au long de la culture.

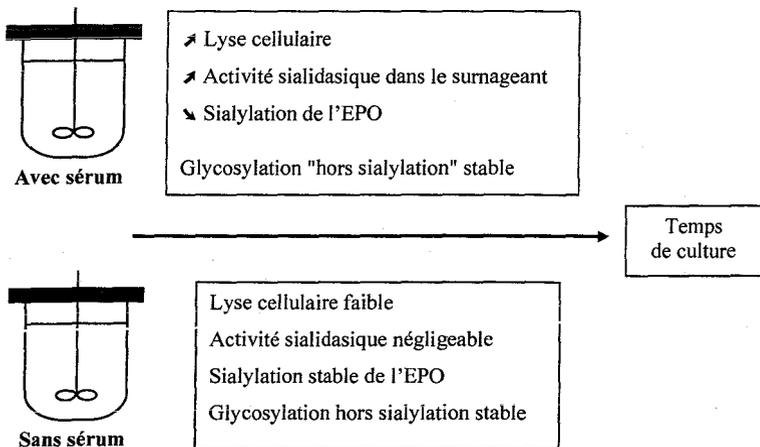


Figure 51 : Principaux résultats obtenus lors du suivi de la glycosylation de l'EPO murine produite en cours de culture discontinue.

RESULTATS ET DISCUSSION

III. INFLUENCE DE L'ADAPTATION SANS SERUM SUR LA PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

III. Influence de l'adaptation à la culture sans sérum sur la physiologie des cellules CHO (production et glycosylation de l'EPO, croissance et métabolisme cellulaires)

En raison de son origine animale et de sa composition variable et peu définie, le sérum de veau fœtal (SVF) doit être éliminé des milieux de culture utilisés pour la production industrielle de protéines recombinantes ; il est donc souvent nécessaire de procéder à une phase d'adaptation des cellules à la culture sans sérum. Ce changement profond d'environnement auquel les cellules sont soumises lors de cette procédure présente un caractère particulièrement intéressant dans le cadre de notre étude de l'influence du procédé de production sur la glycosylation de l'EPO. Il est en effet essentiel de s'assurer que ce changement de condition de culture n'engendre pas d'effet néfaste sur la qualité de la protéine produite.

1. Adaptation à la culture sans sérum ou sans protéine

1.1. Essais préliminaires avec plusieurs milieux commerciaux

Dans un premier temps, des essais préliminaires avec divers milieux commerciaux sans sérum, sans substance d'origine animale, ou sans protéine, ont été réalisés avec notre clone d'étude (CHO-UH1 #24) adapté à la suspension.

Tout d'abord, des tentatives d'adaptation "brutale" à la culture sans sérum (passage direct en milieu sans sérum) ont été entreprises avec deux milieux commerciaux : SFM-II (GibcoBRL) et QBSF-51 (Sigma), mais après 5 passages, plus aucune croissance n'a pu être observée.

Une procédure d'adaptation progressive a donc été menée en remplaçant par étapes successives une fraction croissante du milieu contenant initialement 5% de sérum par du milieu sans sérum.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

Après un passage à 1%svf, puis trois autres à 0.5%svf, des cultures comparatives en suspension (en fioles d'Erlenmeyer de 25 mL) ont été réalisées en présence de 0.7% de sérum afin de sélectionner les milieux de culture les plus favorables à l'adaptation de notre clone d'étude à des conditions appauvries en sérum.

La croissance cellulaire s'est avérée satisfaisante avec la plupart des milieux testés, mais les meilleurs résultats de production d'EPO ont été obtenus avec le milieu SFX (sans sérum et contenant moins de 10 mg/L de protéines totales). La procédure progressive d'adaptation sans sérum a donc été poursuivie dans ce milieu. En raison de sa composition particulière (sans protéines de taille supérieure à 10 kDa) et de la production d'EPO obtenue, le milieu PF nous a semblé également intéressant à tester (Tableau 18).

Milieux commerciaux	Protéines totales	Densité cellulaire après 72h	Viabilité cellulaire	Production d'EPO après 72h
CD (GibcoBRL)	0 (d'origine animale)	$3.5 \cdot 10^5$ cell./mL	85%	0.10 mg/L
SFM II (GibcoBRL)	< 100 mg/L	$3.7 \cdot 10^5$ cell./mL	55%	0.45 mg/L
PF (Hyclone)	0 (<10 kDa)	$8.3 \cdot 10^5$ cell./mL	75%	0.40 mg/L
SFX (Hyclone)	10 mg/L	$7.1 \cdot 10^5$ cell./mL	65%	0.65 mg/L
CCM5 (Hyclone)	370 mg/L	$2.6 \cdot 10^5$ cell./mL	60%	0.35 mg/L
Ex-Cell 302 (JRH)	< 1 mg/L	$3.6 \cdot 10^5$ cell./mL	70%	0.45 mg/L
Ex-Cell 325 (JRH)	0	$3.7 \cdot 10^5$ cell./mL	65%	0.35 mg/L
RenCyte CHO (Mediatec)	Non communiqué	$1.1 \cdot 10^5$ cell./mL	65%	0.10 mg/L
MCDB 302 (Sigma)	Non communiqué	$3.5 \cdot 10^5$ cell./mL	95%	0.10 mg/L

Tableau 18 : Comparaison des capacités de croissance et de production d'EPO du clone d'étude dans différents milieux commerciaux supplémentés avec 0.7% de sérum (cultures en suspension en fioles d'Erlenmeyer de 25 mL ensemencées à $2.5 \cdot 10^5$ cell./mL).

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

1.2. Procédure d'adaptation dans les deux milieux sélectionnés

La procédure d'adaptation des cellules à la culture sans sérum a été réalisée en substituant progressivement le milieu initial (α -MEM) contenant 5%svf par le milieu sans sérum SFX (Figure 52).

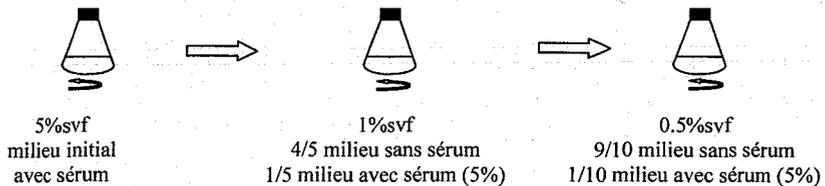


Figure 52 : Principe de substitution progressive du sérum employé pour l'adaptation du clone d'étude à la culture sans sérum.

La récupération d'un taux de croissance satisfaisant (doublement de la densité cellulaire sur un passage) a constitué le critère de choix pour mener les étapes de diminution du taux de sérum.

Un premier stock de cellules a été congelé après avoir été adaptées à 1% puis 0.5% de sérum. L'adaptation a été poursuivie à partir de ce stock sur le même principe de diminution progressive du sérum jusqu'à son élimination complète (Figure 53).

Après avoir été cultivées pendant 5 passages sans sérum, les cellules ont été placées en milieu sans protéine (PF). Une dizaine de passages ont encore été réalisées afin de s'assurer que les cellules s'étaient bien adaptées aux deux milieux utilisés. Deux stocks (congélation sans sérum) de cellules adaptées à la culture sans sérum et sans protéine ont alors été réalisés pour les études ultérieures.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

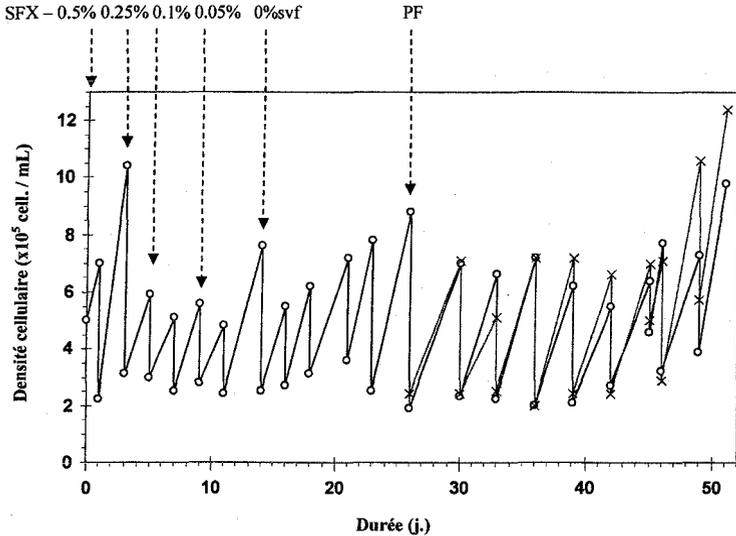


Figure 53 : Procédure d'adaptation à la culture sans sérum (o), puis sans protéine (x).

L'étude cinétique de notre clone d'étude dans ces nouvelles conditions de culture (Figure 54 et Tableau 19) montre que ses performances ont été affectées par l'élimination du sérum du milieu de culture. Comparée aux résultats obtenus en milieu α MEM supplémenté par 5% de sérum (Figure 29 et Tableau 6), la concentration d'EPO atteinte en fin de culture dans le milieu sans sérum (SFX) est équivalente. Par contre, la production maximale d'EPO observée en milieu sans protéine (PF) s'avère nettement plus faible (d'un facteur 3), ainsi que les densités cellulaires atteintes dans les deux nouveaux milieux (d'un facteur 2). L'absence de sérum a probablement induit une limitation nutritionnelle pour les cellules car les vitesses spécifiques de croissance atteignent des valeurs maximales du même ordre (quand aucun substrat n'est encore limitant) dans les différents milieux utilisés.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

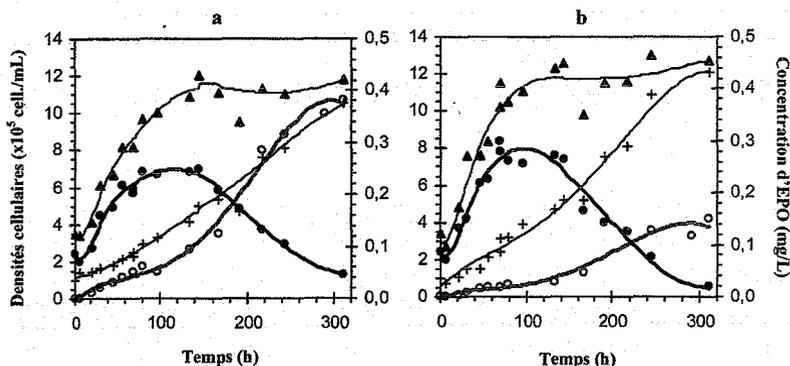


Figure 54 : Suivis cinétiques de la croissance cellulaire et de la production d'EPO du clone d'étude (CHO-UH1 #24) après adaptation à la culture sans sérum (a) en milieu SFX et sans protéines (b) en milieu PF (Flacons agités de 100 mL) : cellules viables (●), cellules mortes (+), cellules totales (▲) et concentration d'EPO (○).

Milieu	Densité cell. max (x10 ⁵ cell./mL)	EPO _{max} (mg/L)	μ _{max} (h ⁻¹)	π _{max} (μg/10 ⁶ cell./h)
α-MEM + 5% svf	15.0	0.45	0.04	0.013
SFX	7.0	0.40	0.03	0.007
PF	8.0	0.15	0.03	0.004

Tableau 19 : Paramètres cinétiques du clone d'étude (CHO-UH1 #24) avant et après adaptation à la culture dans les milieux sans sérum (SFX) et sans protéines (PF).

Ainsi, après avoir été adapté à la culture en suspension, notre clone d'étude a donc été également adapté à la culture en milieu sans sérum, deux conditions importantes dans le cas de procédés de production de type industriel. Par ailleurs, compte-tenu des faibles performances obtenues en milieu sans protéine (PF), la suite de notre étude n'a été poursuivie qu'en milieu sans sérum (SFX).

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

2. Etude de l'influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

Afin de tenir compte des contraintes de procédé de type industriel, nous avons donc souhaité adapter notre clone d'étude à la culture en suspension et en milieu sans sérum. Cette deuxième procédure engendre un changement de l'environnement extracellulaire particulièrement important puisque le sérum est utilisé en culture cellulaire en raison de sa grande richesse en éléments nutritifs (hormones, facteurs de croissance, protéines, etc...). Le passage à un nouveau milieu est donc susceptible de modifier la physiologie des cellules, celles-ci devant orienter leurs capacités métaboliques pour utiliser les nouveaux nutriments désormais à leur disposition. Comme nous l'avons vu précédemment, les mécanismes intracellulaires de glycosylation sont étroitement dépendants de tous les phénomènes pouvant influencer l'état physiologique des cellules. Par conséquent, il apparaît particulièrement important d'étudier l'évolution éventuelle du profil de glycosylation d'une protéine recombinante telle que l'EPO, au cours de la phase d'adaptation à la culture sans sérum. Dans le cas de notre système d'étude, cela est particulièrement vrai puisque nous avons vu que notre EPO murine subissait une désialylation progressive en cours de culture en présence de sérum, mais que cette dégradation n'avait pas lieu en milieu sans sérum. Nous avons donc souhaité étudier plus précisément les effets spécifiques de la procédure d'adaptation elle-même d'une part, et de l'absence du sérum dans le milieu extra-cellulaire d'autre part.

Ce chapitre est présenté sous forme d'un projet de publication.

**Conjugated effects of cell adaptation and serum lack
on EPO production process by CHO cells in serum-free cultures**

*François LE FLOCH^{1,2,§}, Bertrand TESSIER¹, Sébastien CHENUET¹, Jean-Marc
GUILLAUME², Pierre CANS², Jean-Louis GOERGEN¹ and Annie MARC^{1*}*

¹ Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, CNRS, INPL-ENSAIA, 2, Avenue de la Forêt de Haye, B.P. 172, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

² Aventis Pharma, 13, quai Jules Guesde, 94400 Vitry sur Seine, France

[§] present address : MolMed SpA. – Via Olgettina 58, 20132 Milan, Italy

* Corresponding author : Annie.Marc@ensic.inpl-nancy.fr

Abstract

The necessity to perform serum-free cultures in order to produce recombinant glycoproteins generally implies to adapt the original cell line to new environmental conditions. Cell physiology is generally strongly influenced by this process modification which may therefore induce important quantitative and qualitative effects on the final product. In particular, we previously observed that sialylation of EPO was altered when produced by CHO cells without serum. In order to discriminate between the influence of the adaptation procedure itself and the proper effects of the absence of serum, production and glycosylation of EPO and cellular growth and metabolism were comparatively studied in various culture conditions. Results allowed to conclude that in our case, EPO desialylation was only due to the presence of serum in the medium. Moreover, at the end of the cultures, both the sialidase activity and the number of lysed cells were found significantly higher in the serum-containing supernatants than in serum-free conditions. Thus, a cytosolic sialidase activity was released in the medium by cells during lysis in presence of serum.

Even if the serum-free adaptation does not seem to have induced by itself significant changes in the glycoprotein quality, it probably influenced cellular metabolism since it led to select cells showing better growth performance but worse production capacity.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

Introduction

Mammalian cells are being used for the industrial production of a number of recombinant therapeutic glycoproteins because of their ability to perform post-translational modifications that closely mimic those of the human proteins. N-glycosylation has widely been reported to exert significant effects on several properties of glycoproteins, including antigenicity, solubility, protein folding, protease resistance, pharmacokinetics or biological activity (Schauer, 1988; Kobata, 1992). Moreover, sialylation is particularly involved in the *in vivo* circulatory lifetime of these proteins which is crucial to their therapeutic value (Dordal *et al.*, 1985; Takeuchi *et al.*, 1989; Imai *et al.*, 1990; Misaizu *et al.*, 1995).

During industrial process development, adaptation of the recombinant cell line to serum-free culture is generally necessary for both economical and regulatory reasons. Indeed, serum supplementation is a potential source of infectious agents like virus and prions, leads high lot-to-lot variability, renders more difficult product purification by increasing the contaminant protein content of supernatant and induces higher operating costs (Froud, 1999).

Thus, removal of serum from the culture medium is usually a suitable step in the process development of recombinant glycoprotein production but it represents also a strong change in the cell environment and consequently may affect cellular physiology and protein glycosylation.

Indeed, serum contains many components (growth factors, insulin, transferrin, albumin, vitamins, etc...) which are known to be essential to several cellular functions like growth regulation or intracellular transports (Froud, 1999). Thus, compared to serum-containing culture, reduction of protein production and/or cell growth are generally observed when cells are transferred in serum-free medium (Inoue *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1999) and loud investigations for optimizing medium composition to a determined cell line cultured in the desired conditions are required to recover equivalent performances (Buntemeyer *et al.*, 1991; Hewlett, 1991; Castro *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 2001).

Glycan biosynthetic pathway is widely recognized to be very complex and generally results in the secretion of different glycoforms whose oligosaccharide moiety is highly heterogeneous. Resulting of sequential enzymatic reactions located in several cell compartments, glycan structures are known to be influenced by many factors. Host-cell type and culture conditions have been shown to be the most critical ones (Goto *et al.*, 1988; Goochee and Monica, 1990;

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

Jenkins *et al.*, 1996). In particular, various elements of the extracellular environment, including the configuration of the production system (Watson *et al.*, 1994) and the composition of the culture medium like ammonia concentration (Andersen and Goochee, 1995; Borys *et al.*, 1994; Gawlitzek *et al.*, 1998; Jenkins and Curling, 1994; Grammatikos *et al.*, 1998; Yang and Butler, 2000a and b), glucosamine supplementation (Yang and Butler, 2002), lipid availability (Jenkins *et al.*, 1994) are able to affect protein glycosylation by potentially inducing changes in cell metabolism or favoring enzymatic product degradation.

Results of literature concerning the effects of serum supplementation on protein glycosylation appear to be quite conflicting and very dependent of the investigated cell-protein system. Thus, the sialic acid content of a murine hybridoma produced monoclonal IgG₁ was reported to be clearly higher in serum-free medium than in presence of serum (Patel *et al.*, 1992) while Lifely *et al.* (1995) observed only minor differences in glycosylation of a CHO cell produced antibody in serum-free and serum-containing media. Moellering *et al.* (1990) did not find neither any significant differences in carbohydrate composition of another monoclonal antibody produced in both conditions. Concerning other recombinant glycoproteins, the glycoform distribution (decrease of the 2N form) of interferon- γ (IFN- γ) produced by CHO cells was shown to be affected by the presence of serum, probably because of a proteolytic cleavage by serum proteinases (Castro *et al.*, 1995). Lamotte (1997) confirmed that serum could induce partial proteolysis of IFN- γ and found in addition that a decrease in sialylation and an increase in truncated glycans occurred in these conditions. Besides, serum-free cultures were also reported to result in a higher level of terminal sialylation and proximal fucosylation of BHK-21 cell produced interleukin-2 (Gawlitzek *et al.*, 1995).

Besides, the serum-free adaptation is able to influence cell physiology by inducing a self-adjustment of the cells to the environment. Improvement in cell growth has been particularly reported during the adaptation to low serum-containing medium since adapted cells showed higher growth rates than non-adapted cells in serum-containing culture. Moreover, a loss of antibody productivity could also result from a long-term exposure to serum-free medium because of the appearance of a low producing cell population. On the other hand, no change was found with adaptation in glucose and glutamine uptake and in lactate and ammonia production (Ozturk et Palsson, 1991).

Erythropoietin (EPO), a plasma hormone stimulating the red blood cell production, is a particularly suitable model for studying glycosylation because of its highly glycosylated

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

structure which represents 40% of its molecular weight (34-39 kDa according to Sasaki *et al.*, 1987). Murine and human forms are very similar molecules since both the coding DNA and the amino acid sequences are 80% conserved between the two species. Studying the murine form have significant value to research since mouse is widely used as a test animal for *in vivo* bioassays and the murine system is appropriate for precise investigations of the regulation of EPO expression and the mechanism of the biological response to EPO (Shoemaker and Mitscock, 1986).

Characterization of the glycoforms of the commercial form of human EPO obtained from recombinant CHO cells have been highly documented (Sasaki *et al.*, 1987 and 1988; Recny *et al.*, 1987; Takeuchi *et al.*, 1988 and 1991; Tsuda *et al.*, 1990; Hokke *et al.*, 1995). However, data on the influence of the culture conditions on the glycosylation of this protein remain very scarce. High concentrations of ammonia have been shown to alter the glycosylation pattern of EPO by decreasing the terminal sialylation of all glycans and the content of the O-linked glycans (Yang and Butler, 2000a and b) and glucosamine supplementation has been recently reported to increase the molecular heterogeneity of EPO regarding molecular weight and isoelectric point range (Yang and Butler, 2002).

In order to characterize the glycan moiety of glycoproteins, capillary electrophoresis coupled with laser-induced fluorescence (CE-LIF) detection has been shown to be an accurate tool by providing a rapid, high resolution and high sensitivity analysis of N-linked oligosaccharides without requiring long sample preparation (Guttman, 1997). Profiles of several sialylated glycoproteins, including human recombinant EPO, kallikrein and bovine fetuin have already been reported (Chen and Evangelista, 1998).

Results reported in literature concerning serum-free medium produced recombinant proteins generally deal with differences in productivity or glycosylation structure obtained in presence and in absence of serum but the influence of the serum-free adaptation period itself is very few investigated. Changes in cell growth and protein production have been described (Ozturk and Palsson, 1991) but, to our knowledge, nothing has been reported concerning glycosylation although this cellular process is likely to be greatly influenced by any factor inducing cell metabolism modifications. Moreover, even if the influence of serum addition on glycosylation has been examined for several proteins, this has not been specifically examined for CHO cell produced EPO.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

In this article, we analyzed qualitative and quantitative performances of serum-containing and serum-free culture processes for the production of EPO. By comparing the production and the glycosylation of a recombinant glycoprotein produced in various culture conditions, we separately highlighted the specific effects of the absence of serum and those resulting from the adaptation procedure.

Materials and Methods

1. Cell line and culture

Cell line

Recombinant murine EPO was produced by an $\alpha 2,6$ sialyltransferase expressing CHO cell line (Monaco *et al.*, 1996). The cassette bearing the cDNA of the murine EPO and a modified CMV promoter was inserted between *HindIII* and *EcoRI* restriction sites in a plasmid vector pSV40/Zeo (Invitrogen) containing the zeocin resistance marker. CHO cells were then transfected by electroporation with this mammalian expression vector (4.9 kb).

Cell adaptation procedure

After zeocin selection, cells were adapted to suspension culture in a commercial serum-free medium (SFX-CHO™, HyClone, ref. SH30187) supplemented with 5% serum, leading to the first cell bank (cell bank #1). Following this first step, the adaptation to serum-free culture was carried out in agitated flask by progressively reducing serum concentration in medium until complete elimination. The adaptation steps were monitored by following the capacity of cells to restore a correct cell growth (doubling of the cell density in one passage). Twelve passages (one month) was necessary to reach 0% of serum. Cells were further grown in this serum-free medium during one more month (14 passages) before constitution of the cell bank #2. The SFX-CHO™ medium is characterized by its particularly low total protein content (< 10 mg/L). Another commercial serum-free medium (SFM™, Sigma, ref. C-8099) was also used containing an higher protein level of 100 mg/L.

Culture kinetics

Four cultures were performed in suspension in spinner flasks of 100 or 200 mL. The agitation rate was maintained at 40 rpm, temperature at 37°C and air was supplemented with 5% CO₂ during incubation. We used two serum-free media both supplemented with 4 mM glutamine, 10 mg/L ribonucleosides and deoxyribonucleosides, 50 mg/L glycine and 500 mg/L zeocin. Cell density was estimated using a haemocytometer and viability was measured by trypan blue exclusion method.

EPO titer in supernatant was determined by Elisa (R&D systems). The accuracy of the method is $\pm 20\%$. Supernatants were also collected at the beginning and at the end of the culture, and stored at -80°C until required for EPO purification and HPLC analysis. Glucose, lactate and glutamine concentrations were determined enzymatically by commercial assay kits (Sigma and Roche) and ammonia concentration was determined with a selective probe (Orion).

The strategy chosen to discriminate between the effects of serum component lack or of cell adaptation procedure is presented in figure 1. For culture #1, cells not adapted to serum-free medium (from cell bank #1) were grown in SFX-CHO™ medium supplemented with 5% serum. Cells were seeded at 0.3×10^6 / mL. For culture #2, serum-free adapted cells (from cell bank #2) were grown during 3 passages in the same SFX-CHO™ medium, also supplemented with 5% serum. Then, cells were seeded at 0.3×10^6 / mL for the kinetic study. For culture #3, serum-free adapted cells (from cell bank #2) were cultivated in SFX-CHO™ medium without serum supplementation. Cells were seeded at 0.2×10^6 / mL. For culture #4, the same cells (from cell bank #2) were cultivated in another serum-free medium containing 100 mg/L of total proteins and 4.5 g/L of glucose (SFM™). Cells were seeded at 0.3×10^6 / mL.

Medium of cultures #2 and #4 was different from the medium used to constitute the cell bank #2 and no adaptation to these new conditions was performed.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

2. Immuno-affinity purification of EPO

An immunoaffinity gel for the purification of EPO was prepared by coupling 1 mg of monoclonal anti-human EPO antibody (R&D Systems) to 150 mg of CNBr activated sepharose 4B (Sigma) corresponding to 0.5 mL of swollen gel.

Culture supernatants (containing 20 to 30 µg of EPO) were loaded successively 3 times on this immunoaffinity gel overnight at 4°C under gentle agitation. The gel was successively washed with PBS (20 volumes), PBS/Tween₂₀ (20 volumes) and 1 M NaCl / NH₄OH, pH 10.3 (2 volumes). Elution of the bound EPO was first performed with 1 M NaCl / NH₄OH, pH 11.5 and then pH 11.8. The two eluant fractions were rapidly brought to neutral pH by the addition of 4 M TrisHCl, gathered together, concentrated and dialyzed against distilled water using a Centricon YM-10[®] centrifugal filter unit (Millipore). Finally, the amount of purified EPO was estimated to be between 5 and 10 µg.

3. N-linked oligosaccharides analysis by HPCE

Glycans of immuno-purified EPO were analyzed according to a procedure derived from the method described by Chen and Evangelista (1998) with an eCAP[™] N-linked oligosaccharide profiling kit (Beckman). Original protocol was adapted to reduce to 10 µg the amount of glycoprotein required for CE analysis (data not shown). CE separations were performed with a P/ACE 5000 (Beckman-Coulter) equipped with laser-induced fluorescence detector (excitation 488 nm / emission 520 nm) and 50 µm x 57 cm N-CHO (polyvinylalcohol) coated capillary using 25 mM acetate buffer, pH 4.75, containing 0.4% of polyethylene oxide. Equivalent quantities of N-linked glycans (approximately 0.3-0.4 nmoles maltose-equivalent quantified using the maltose internal standard) were introduced into the capillary by pressure injection (0.5 psi) for 20 s. Electrophoresis was performed at 25 kV with a current of approximately 12 µA. Analysis of five profiles obtained after successive injections of the same sample showed that the mean error in the relative peak area was less than 10%. A glucose ladder was used as standard for migration time determination.

Release of N-linked oligosaccharides from EPO by PNGase digestion

The dialyzed samples of purified EPO (5-10 µg) was concentrated to dryness on a Speed-Vac concentrator (Eppendorf). The residue was dissolved in a mixture containing 45 µL of enzyme buffer, 1 µL of 5% SDS and 1.5 µL of 10% β-mercapto-ethanol. The denaturation by boiling for 5 min was followed by the addition of 5 µL of NP-40 and 2 µL of peptide-N-glycosidase F (PNGase) solution. The mixture was incubated overnight at 37°C for digestion. Released N-glycans were separated from the EPO polypeptide by precipitation with 150 µL of cold 100% ethanol. The reaction mixture was incubated at -20°C for 1 h before being centrifuged. As labeling control, maltose (2 nmol) was added to the oligosaccharide-containing supernatant, which was then dried with a Speed-Vac concentrator.

Fluorescent labeling of oligosaccharides with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate (APTS)

The released glycans (0.3-0.4 nmoles maltose-equivalent) were labeled by reductive amination (Chen and Evangelista, 1998). The dried samples were dissolved in a mixture containing 1.5 µL APTS (100 mg/mL) in 15% acetic acid and 1.5 µL NaBH₃CN (1 M) in THF, vortexed and then incubated overnight at 37°C for derivatization. After incubation, the labeled glycans were diluted to 50 µL with distilled water.

Desialylation of oligosaccharides

Removal of the terminal sialyl residues of the N-glycans was performed by mild acidic hydrolysis. Thus, 1 µL of the mixture containing the labeled oligosaccharides was mixed with 39 µL of 0.5 M acetic acid and incubated 1 h at 80°C.

4. Sialidase activity analysis

Cell-free supernatants were centrifuged at 10 000 g for 10 min to remove any cell fragments and then concentrated 15-fold at 4°C with a 10 kDa cut-off Nanosep[®] centrifugal ultrafiltration unit (Pall). Sialidase activity was determined by fluorescence according to the method described by Gramer (2000) using 4-methylumbelliferyl-α-D-N-acetylneuraminic acid (Sigma) as substrate. The standardized assay was performed at 37°C with 188 µL of 4mM 4-methylumbelliferyl-α-D-N-acetylneuraminic acid, 119 µL of 1 M phosphate buffer (pH 6.2), 119 µL of distilled water and 325 µL of 15-fold concentrated supernatant. After 30 min, 250 µL of this solution were collected and then diluted in 2250 µL of 1 M glycine / KOH buffer (pH 10.4) to stop the enzymatic reaction. Quantification was carried out with a FLX spectrofluorometer (Safas, Monaco) using 4-methylumbelliferone (Sigma) as standard. Excitation of the samples was accomplished at 360 nm and fluorescence collected at 450 nm. Enzyme activity is expressed in nanomole of substrate (4-methylumbelliferyl-α-D-N-acetylneuraminic acid) hydrolyzed in one hour for one liter of sample (nmol/h/L). The precision of the sialidase analysis is about 15%.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

5. Kinetic data analysis

Specific rates of cell growth (μ) and EPO production (π) were calculated from smoothed values of viable (X_v) cell densities and EPO concentrations according to the following equations:

$$\mu = \frac{1}{X_v} \cdot \frac{dX_v}{dt} \quad \text{and} \quad \pi = \frac{1}{X_v} \cdot \frac{dEPO}{dt}$$

Results

Production and glycosylation of EPO were previously observed to be very different in serum-containing and serum-free conditions (article under submission). The discrimination between the effects of serum absence and the influence of the adaptation procedure to serum-free medium required to compare these parameters in various culture conditions (Figure 1). In a first time, we will compare the culture performances for cell growth and EPO production. Then we will detail the cell metabolism in the four cultures. At last, the EPO glycosylation will be characterized by HPCE at different times of each culture.

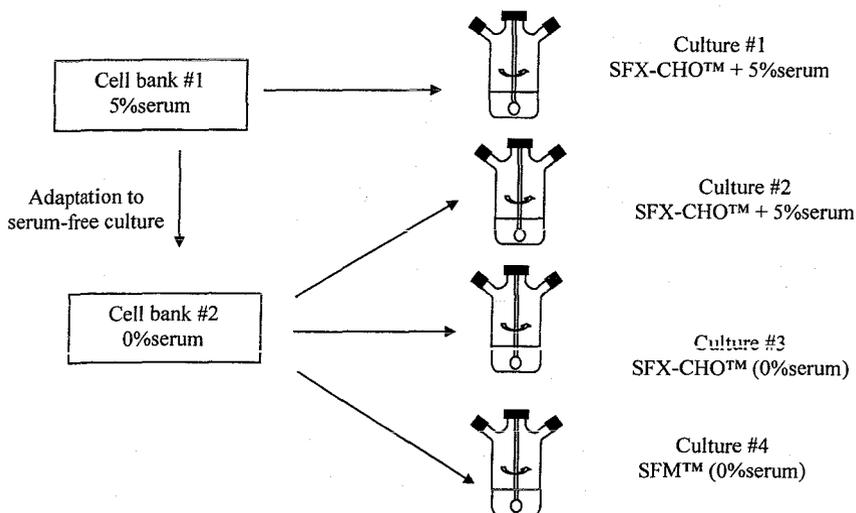


Figure 1 : Strategy for discriminating between effects of serum absence and influence of adaptation procedure.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

1. CHO cell growth and EPO production

The kinetic results of cell growth and EPO production are presented in figure 2, and the main kinetics parameters are given in table 1.

In a first culture, non-adapted cells were grown in the commercial serum-free medium SFX-CHO™ (HyClone) supplemented by 5% of serum (culture #1). A maximal cell density of 1.3×10^6 cell/mL was reached after 80 hours; then, a severe cell lysis occurred. The final titer of EPO which increased all over the culture was 5 µg/mL at the end of the culture (Figure 2). Maximal specific growth and EPO production rates were respectively 0.04 h^{-1} and $0.07 \text{ µg}/10^6 \text{ cell/h}$ (Table 1). It clearly appears that the EPO production occurs a long time after the maximal cell density is reached while it reaches its maximal level after 300 h. This corresponds to an absence of coupling between cell growth and EPO synthesis. The cell first grows before producing the recombinant protein. Due to this behavior, it is then necessary to prolong the cell duration time to harvest the maximal protein quantity. But, in this case the protein quality may be compromised because a potential protein degradation may occur in the supernatant during the last phase of the culture.

In the next culture, cells from the same CHO cell line were adapted to serum-free culture by progressively reducing serum supplementation until complete removal. EPO was then produced in a serum-free batch culture (SFX-CHO™ medium - culture #3) but performances were clearly inferior to those obtained in serum-containing medium (Figure 2) : the maximal cell density reached only 0.7×10^6 cell/mL after 100 hours and EPO production was 10 fold inferior to the titer reached in presence of serum (0.4 against 5 µg/mL). Maximal specific rates were 0.03 h^{-1} for cell growth and about $0.007 \text{ µg}/10^6 \text{ cell/h}$ for EPO production (Table 1). Also in this case, cell growth and EPO synthesis appeared to be not coupled. Moreover, it is interesting to observe that no significant cell lysis was found in this condition.

In order to dissociate the effects of the serum removal from those of the serum-free adaptation procedure itself, we planned a third culture with serum-free adapted cells grown in presence of serum (culture #2). In this case, a maximal cell density of 1.8×10^6 cell/mL was reached after 110 hours; a slight cell lysis occurred then in this culture. The final titer of EPO was almost 2 µg/mL at the end of the culture (Figure 2). Maximal specific growth and EPO production rates

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

were respectively 0.04 h^{-1} and $0.02 \mu\text{g}/10^6\text{cell/h}$ (Table 1). Again, cell growth and EPO synthesis were not coupled.

Finally, to avoid an effect of the basic medium, we performed a culture with serum-free adapted cells grown in another commercial serum-free medium (SFMTM - culture #4) whose protein content was 10-fold higher than SFX-CHOTM medium (100 against 10 mg/L). Similarly to the results obtained in SFX-CHOTM medium, growth performances were also clearly inferior to those obtained in serum-containing medium since the maximal cell density reached only $0.8 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ after 100 hours, but EPO production was equivalent to those observed in culture #2 (adapted cells in presence of serum) since it reached $2 \mu\text{g/mL}$ at the end of the culture (Figure 2). Maximal specific rates were respectively 0.015 h^{-1} for cell growth and $0.015 \mu\text{g}/10^6\text{cell/h}$ for EPO production (Table 1). No cell lysis could be observed in this culture. Like in the other ones, no coupling appeared between cell growth and EPO synthesis.

Culture	#1	#2	#3	#4
Cells	non-adapted	adapted	adapted	adapted
Medium	SFX-CHO TM + 5%serum	SFX-CHO TM + 5%serum	SFX-CHO TM (0%serum)	SFM TM (0%serum)
Cell density _{max} (10^6cell/mL)	1.3	1.8	0.7	0.8
μ_{max} (h^{-1})	0.04	0.04	0.03	0.015
EPO _{max} ($\mu\text{g/mL}$)	5	2	0.4	2
π_{max} ($\mu\text{g}/10^6\text{cell/h}$)	0.07	0.02	0.007	0.015

Table 1 : Kinetic parameters obtained for the different cultures.

2. CHO cell metabolism

The potential influences of the cell adaptation procedure to serum-free medium or of the absence of serum components in culture medium have also to be evaluated on the cell metabolism. The evolutions with time of the concentrations of glucose, lactate, glutamine and ammonium ions are presented for the four cultures in figure 3.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

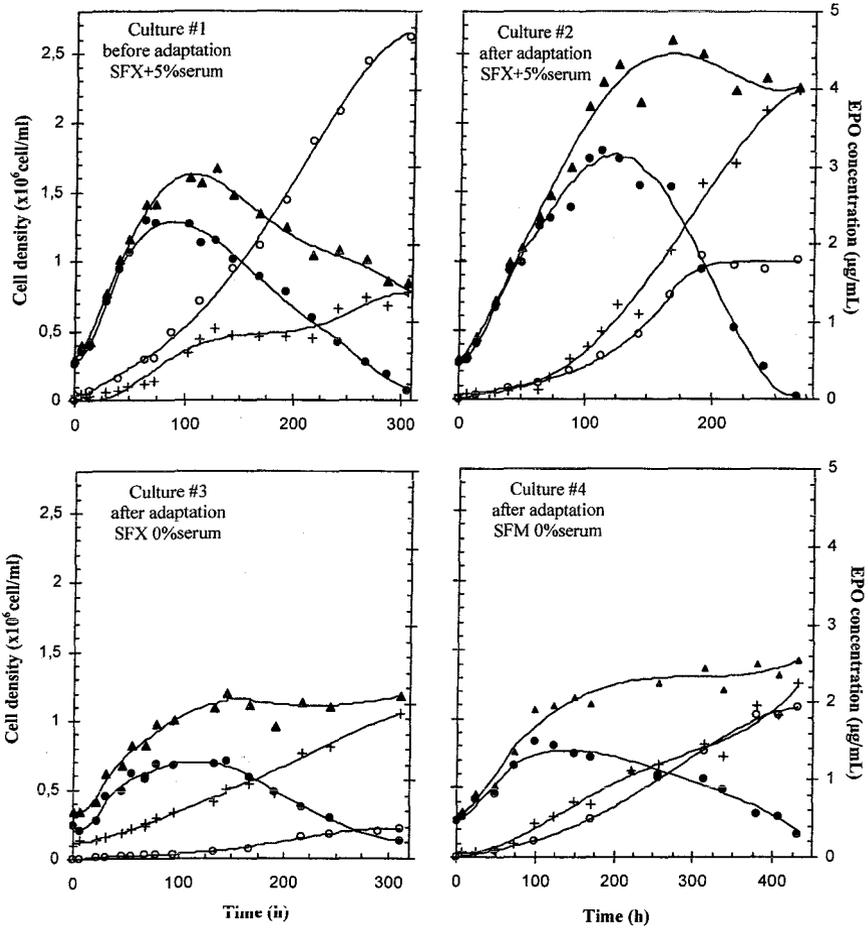


Figure 2 : Kinetics of EPO producing CHO cells in the different batch cultures (spinner flasks). Viable cells (\bullet), dead cells ($+$), total cells (\blacktriangle) and EPO titer (\circ) were monitored.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

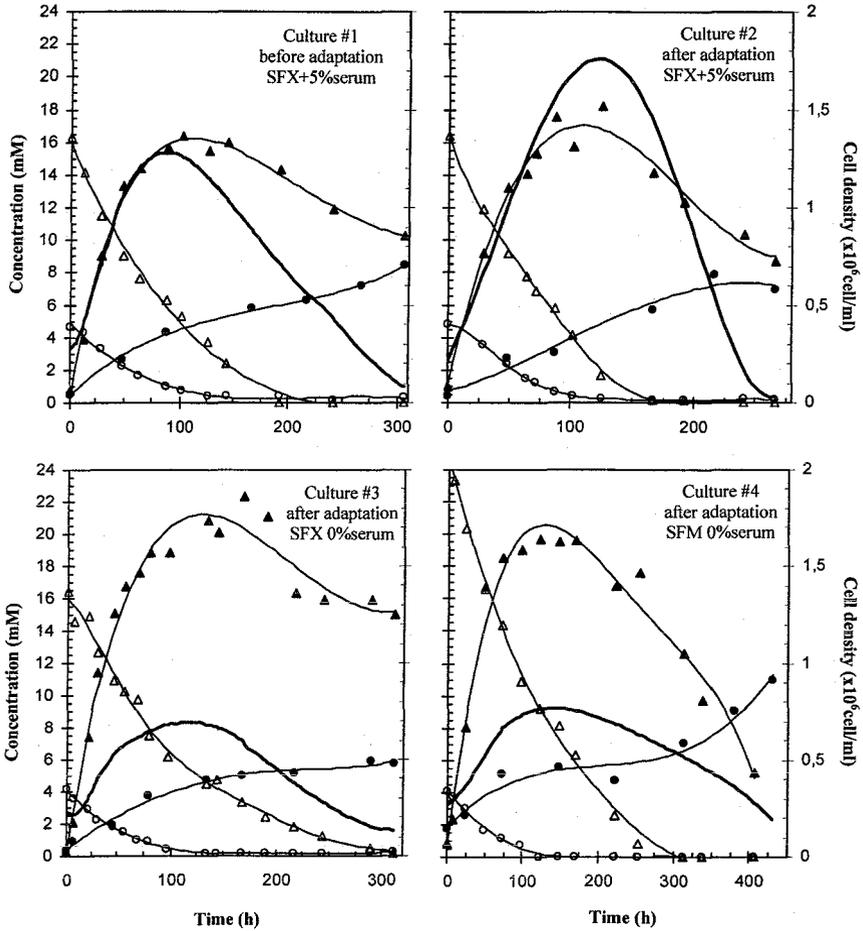


Figure 3 : CHO cell metabolism obtained in the different batch cultures (spinner flasks). Concentrations of glucose (Δ), lactate (\blacktriangle), glutamine (\circ) and ammonia (\bullet) were monitored. Viable cell density is indicated with a thick line.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

The main limiting substrate seems to be glutamine in the four cultures since cell density reached its maximal level in all of them concomitantly with the complete consumption of this substrate while glucose concentration was still significant at this time. Lactate production was found similar in the two serum-containing cultures (#1 and #2, before and after adaptation) but seemed to be increased in the serum-free cultures (#3 and #4). In all cases, the lactate produced during the first 120 hours of culture was then consummated during the cell decline. Besides, in the four cultures, high level of ammonia was produced compared to the glutamine uptake. The final ammonia concentration was found equivalent before and after serum-free adaptation as seen in cultures #1 et #2, but slightly different in absence of serum (lower in SFX-CHO™ medium and higher in SFM™ medium).

3. EPO glycosylation

In order to evaluate the effects of the cell adaptation to serum-free media, we have analyzed by HPCE the N-glycans of EPO purified from supernatants sampled at different phases of the cultures. The HPCE patterns are reported in the figure 4 for the four studied cultures. A glucose ladder has been added to have a reference of the migration times.

The figure 4a presents the HPCE patterns of complete and desialylated N-glycans of EPO produced at the beginning and at the end of the culture (after 40 and 300 h) performed in presence of serum, with the non-adapted cells (culture #1). The patterns of non-desialylated N-glycans showed that species characterized by relative migration times superior to 10 glucose units (GU) appeared at the end of the culture and that a concomitant decrease in the size of peaks corresponding to faster migrating chains occurred. According to literature, because of the negative charges brought by sialyl residues to the carbohydrate, sialylated forms have migration times much shorter than 10 GU (Guttman *et al* , 1996; Chen and Evangelista, 1998). This means that EPO collected at the beginning of the culture probably mainly consisted in sialylated glycans and that a desialylation may occur afterwards during the course of the culture. Analysis of the same samples after mild acidic hydrolysis showed desialylated glycan patterns which are very similar at the beginning and at the end of culture. The migration times of the different desialylated species are found to be almost identical, and particularly the major ones. This indicates that except for the sialylation degree, glycosylation of EPO was quite constant during all the culture period.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

For the culture performed without serum with adapted cells (culture #3) supernatant was collected at the end of the cell decline period and the EPO glycans analyzed before or after desialylation (Figure 4c). The glycosylation patterns of serum-free produced EPO were very similar to those of EPO collected at the beginning of the previous culture (Figure 4a). The complete glycan pattern did not showed any peak after 10 GU and the major species appearing after acidic desialylation have very close migration time compared to those obtained in presence of serum. Thus, EPO collected at the end of the cell decline phase of serum-free batch culture mainly consisted in sialylated sugar chains and the desialylation observed in the precedent experiment doesn't seem to occur in these serum-free conditions.

We then analyzed the EPO glycans collected at the end of the cell growth phase and at the end of the culture (after 100 and 260 h) performed in presence of serum, but with cells previously adapted to serum-free medium (culture #2) (Figure 4b). The complete N-glycan patterns showed that EPO was still greatly sialylated at the middle of the culture period, after 100 hours of culture, since major peaks were located before 10 GU. But, it could be also noticed than significant amounts of non sialylated species characterized by migration times superior to 10 GU appeared at the end of the culture (260 h). After mild acidic hydrolysis, the desialylated pattern remained very stable during the culture period with close similarity in the nature of both present and major species. Therefore, a desialylation of EPO could be also suspected during the cell decline period of this culture such as during the culture performed with non-adapted cells.

During the last culture, the cells adapted to serum-free medium were cultured in another serum-free medium to observe a potential effect of the serum-free medium components (culture #4). Supernatant was collected at the end of the culture and the glycosylation patterns of EPO were analyzed again before and after desialylation (Figure 4d). The complete glycan pattern did not showed any peak after 10 GU and the major species appearing after acidic desialylation have close migration time compared to those obtained in the other culture conditions. Thus, EPO collected at the end of this second serum-free batch culture mainly consisted in sialylated sugar chains as observed in the culture #3. Furthermore, we did not observed any differences between the two serum-free media, N-glycan patterns of EPO produced in SFM™ medium were very similar to those of EPO produced in SFX-CHO™ medium.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

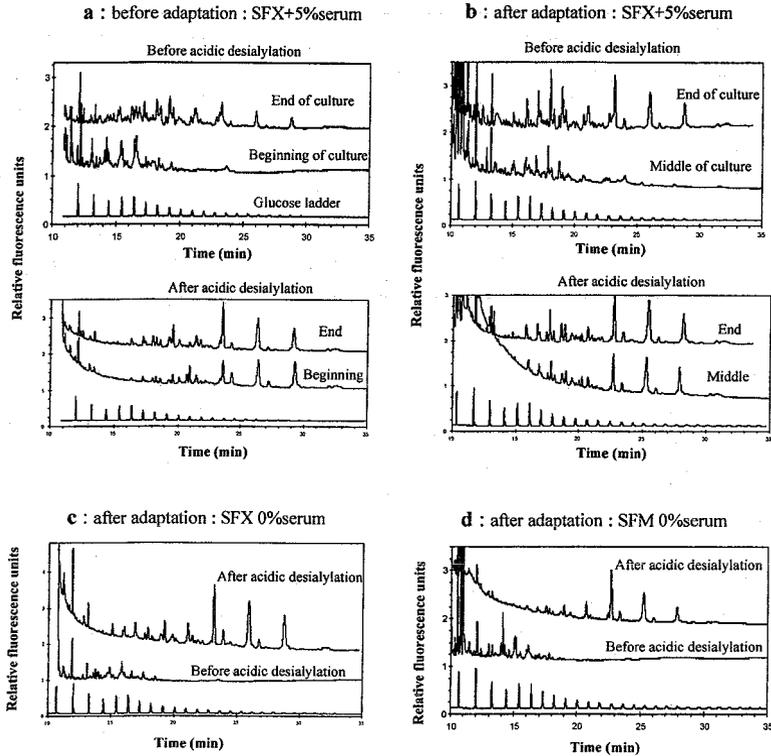


Figure 4 : HPCE profiling of N-linked glycans of EPO produced in the different batch CHO cell cultures (spinner flasks). a : culture #1, b : culture #2, c : culture #3, d : culture #4.

4. Sialidase activity

One hypothesis that may be postulated to explain the phenomenon of EPO desialylation during the serum-containing cultures is that an enzymatic degradation probably occurred. We then measured the sialidase activity in supernatants collected at the end of the four cultures. Clearly, we found a significant sialidase activity in the supernatants from serum-supplemented cultures while a not significant level was observed in the two cultures performed with serum-free media (Table 2). The adaptation of the cells did not change the level of released sialidase as seen in

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

culture #1 and culture #2. Elsewhere, the composition of the serum-free medium did not modified the sialidase level in supernatant which remains not detectable. Furthermore, it is interesting to see that the significant sialidase activity was found in the supernatants collected from the two cultures in which cell lysis occurred.

Culture	1	2	3	4
Cells	non-adapted	adapted	adapted	adapted
Medium	SFX-CHO™ + 5%serum	SFX-CHO™ + 5%serum	SFX-CHO™ (0%serum)	SFM™ (0%serum)
Sialidase activity (nmol/h/L)	430	425	n.s.	n.s.

Table 2. Sialidase activity measured in supernatant at the end of the different cultures (n.s. stands for not significative).

Discussion

Classically, the influence of the change of culture conditions from serum-containing to serum-free medium on recombinant protein production and glycosylation is globally assessed by comparing protein level and glycan profiles before and after serum-free adaptation. However, two main factors are likely to simultaneously induce modifications of cell growth and metabolism and thus potential changes in protein production and glycosylation. The question is whether the serum removal from medium or the cell adaptation procedure is responsible of the observed changes. Thus this simple comparison does not allow to dissociate between both factors. Consequently, a third complementary experiment was designed by growing serum-free adapted cells in serum-containing medium in order to investigate more precisely the separate influences of each factor on cell growth and EPO glycosylation. Furthermore, to evaluate the impact of the medium composition, we also compared cultures performed with the adapted cells in two different serum-free media.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

1. Cell growth and EPO production

In the four cultures, EPO synthesis was found to be not coupled with cell growth since the main amount of protein was secreted after the maximal cell density was reached. This phenomenon was neither influenced by the serum-free adaptation nor by the serum content of the medium. Moreover, a severe cell lysis occurred at the end of the two serum-containing cultures, while the serum-free cultures did not show this diminution of the total cells. Therefore, collecting EPO at the end of the culture could be found interesting for increasing the quantitative productivity of this process. However, the prolonged culture may be risky for the protein quality in presence of serum because of cell lysis.

Moreover, both cell growth and EPO production showed to be significantly decreased when serum was removed from culture (culture #1 versus culture #3). When serum was added again in medium with cells adapted to serum-free medium, growth performances were found to be slightly improved compared to the ones initially obtained with non-adapted cells (maximal cell density of 1.8×10^6 against 1.3×10^6 cell/mL). On the other hand, the final EPO concentration remained lower which means that addition of serum after serum-free adaptation did not allow to completely recover the same level of EPO production (2 against 5 $\mu\text{g/mL}$) (culture #2 versus culture #1).

These results can be explained by two hypothesis : firstly, the serum-free medium chosen for the adaptation (SFX-CHO™) is likely to have induced some limitations for optimal cell growth and EPO synthesis. Secondly, the serum-free adaptation may have led to select a more resistant but less performing sub-clone when environmental conditions became progressively more and more unfavorable at reduced serum supplementation. These hypothesis are confirmed by the performances obtained with the second serum-free medium (SFM™) which has a higher protein content, since the same final EPO concentration was reached than in presence of serum, even if cell growth was still limited (culture #4 versus culture #2, both performed with the same adapted cells).

Therefore, it seemed to be necessary to use rich media (with serum or high protein content) to obtain high EPO production. Regarding global process optimization, this could be of particular importance and will have to be balanced with the opposite downstream requirements.

Besides, the serum-free medium chosen for our study (SFX-CHO™) was a commercial product and consequently, it was not specifically adapted to our cell line. Serum-free adaptation may

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

need to be more controlled in order to determine the potential nutrient limitations which could have induced the selection of a lower producing clone.

Literature concerning the influence of the serum-free adaptation itself on mammalian cell physiology is very scarce since only one study reports physiological changes observed during this period for two hybridoma cell lines (Ozturk and Palsson, 1991). Improvement in cell growth was the most evident effect occurring during the adaptation to low serum-containing medium. Indeed, compared batch cultures were performed in presence of several serum concentrations by using cells adapted to different serum concentrations : higher growth rates were obtained with adapted cells, not only with low serum concentrations but also with high ones. Moreover, a loss of antibody productivity could also result from a long-term exposure to serum-free medium. These two observations were verified in our work (cultures # 1 and #2).

2. Cell metabolism

Few changes in cell metabolism are noticeable in our four cultures. Lactate production was found to be increased in absence of serum while it was not influenced by the serum-free adaptation. Uptakes of glucose and glutamine as well as production of ammonia were found similar in the different conditions tested in our work. This is in good agreement with the results reported by Ozturk and Palsson (1991) who did not observe either significant influence of the serum level on cell metabolism.

However, we found a non classical cell behavior with a lactate consumption during the cell decline phase, even in presence of serum whatever the cells were adapted or not. While glutamine and glucose become limiting after about 150 hours, the cells probably metabolize lactate to make energy. This phenomenon appear to be neither induced by the serum-free adaptation nor by the absence of serum since it occurred in all our cultures.

Besides, a high quantity of ammonia was produced in all the four cultures (final concentrations : 5 to 10 mM) compared to the glutamine consumed (initial concentration : 4 mM). This indicates that other nitrogen-containing components were probably present in these two commercial media (whose composition were not published by the suppliers). High ammonia accumulation (2-4 mM) is known to potentially inhibit cell growth (Newland *et al.*, 1990 ; Hassell *et al.*,

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

1991), but in our case, final concentrations were found too similar to explain the lower growth observed in the two serum-free cultures (#3 et #4).

3. EPO glycosylation

In literature, several results deal with the effects of serum on protein glycosylation but they were found to be quite controversial (Jenkins *et al.*, 1996). Indeed, some reports provide evidence that serum can affect the sugar content of oligosaccharide chains of glycoproteins, particularly concerning the sialylation degree which is known to play a critical role in their biological activity *in vivo* (Patel *et al.*, 1992; Megaw and Johnson, 1979; Maiorella *et al.*, 1993; Lamotte, 1997) while others indicate that serum have small influence on the glycosylation pattern (Lifely *et al.*, 1995; Moellering *et al.*, 1990; Kopp *et al.*, 1996). Probably because of the numerous potential glycosylation sites in proteins, most of these results seem to be closely dependent of the molecule investigated and of the culture conditions used, and thus appear to be difficult to extend to other systems (Gawlitzeck *et al.*, 1995). Concerning the influence of the adaptation procedure of cells to serum-free conditions on protein glycosylation, no information is available in literature. A number of environmental factors are known to be able to strongly influence protein glycosylation which plays a crucial role in pharmacokinetics and biological properties when these proteins are used as pharmaceuticals (Goochee and Monica, 1990). Thus, variations in culture conditions may induce not only potential changes in glycan biosynthesis but also enzymatic degradation. Several examples reported in literature of molecular modifications of mammalian cell produced glycoproteins during the culture period were postulated to arise from proteolytic, glycosidasic or sialidasic activities (Yang and Butler, 2000; Zhang and Wang, 1998; Gawlitzeck *et al.*, 1995; Castro *et al.*, 1995). All these observations occurred in different culture conditions for different proteins which suggests that every result concerning glycosylation must be considered as specific for the protein investigated and can not be directly extended to others.

In our study, we may observe the whole effect of the passage to serum-free culture by comparing the N-glycan patterns of EPO produced in serum-containing medium by non adapted cells and EPO produced in serum-free medium by adapted cells (Figures 4a and 4c). An important glycosylation difference between the two profiles can be observed since a severe protein desialylation occurred during the culture period in presence of serum but did not appear in serum-free conditions. The non-sialylated glycan profiles obtained after mild acidic hydrolysis

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

were very similar which indicates that except for the sialylation degree, EPO glycosylation was not significantly modified by the process changes concerning cell adaptation and serum elimination. It is interesting to relate our results to those of Gawlitzek *et al.* (1995) who also reported a significantly lower terminal sialylation of IL-2 secreted by BHK-21 cells grown in presence of serum compared to the protein synthesized under serum-free conditions.

To discriminate the proper effect of serum-free adaptation procedure on EPO glycosylation, we compared glycan patterns of EPO produced by non-adapted and adapted cells in the same medium (Figures 4a and 4c). Since growth of non-adapted cells in serum-free medium was obviously not possible, this comparison was carried out in the same serum-containing medium. The protein desialylation occurred in the course of both cultures and the non-sialylated glycan patterns obtained after mild acidic hydrolysis were very similar. This means that the adaptation period does not seem to affect EPO glycosylation capacities of the selected CHO clone. Therefore, the modification observed after adaptation in serum-free medium concerning the desialylation was likely to be due to the specific absence of serum. This hypothesis is not only verified by the comparison of the N-glycan patterns of EPO produced in serum-containing and serum-free media by the same adapted cells (Figures 4a and 4b) which allows to study the own effect of serum, but is also confirmed by the glycosylation profile of EPO obtained in SFM™ culture which represents another independent serum-free condition (Figure 4d).

Finally, results obtained in the second serum-free medium containing 100 mg/L of total proteins (SFM™ - culture #4) suggest that the protein content, which is one of the major difference between serum-containing and serum-free media, seems to mainly influence EPO production (10-fold higher than in SFX-CHO™ medium) without inducing cell lysis or affecting EPO glycosylation. The protein desialylation occurred during the culture period only in presence of serum. Due to its very rich content, it provides a wide source of various nutrients, hormones, lipids, etc... and its removal from culture medium obviously represents a strong change in cell environment, which is known to be able to affect oligosaccharide biosynthesis (Goochee and Monica, 1990) and consequently to induce variability in the sialylation status of glycoproteins.

Moreover, high ammonia concentration is known to enhance the secretion rate of various glycosidase activities (Gramer *et al.*, 1995). Besides, Kopp *et al.* (1996) found that the glycosylation profile of interferon- ω was affected when produced by culture under increased initial ammonia concentrations as low as 2 and 5 mM. Yang and Butler (2000a, b and d) showed also that high ammonia accumulation in culture medium (20-30 mM) could alter the terminal

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

sialylation of CHO cell produced EPO and they neither observed any desialylation of EPO during serum-free culture period when ammonia was not supplemented. In our study, ammonia accumulated in a lower manner in the serum-free culture (5.7 against 8.5 mM at the end of the cultures #3 and #1). However, this factor probably do not explain the enhanced heterogeneity of EPO observed in presence of serum since intact EPO was produced in presence of a higher final ammonia concentration (11 mM) in the second serum-free culture (culture #4).

The occurrence of an enzymatic degradation appears to be a more probable hypothesis. Indeed, mammalian cells have already been reported to possess endogenous glycosidases including a sialidase which activity was found stable at physiological pH (Gramer and Goochee, 1993). Therefore, its release following cell lysis could result in the cleavage of terminal sialyl residues. It means that cell lysis would have arisen from cell metabolism changes induced by serum addition. Besides, sialidase activities might also be present in serum preparations (Gawlitzeck *et al.*, 1995). In this case, desialylation should appear from the early beginning of the culture while it occurred only during cell decline in our serum-containing cultures, concomitantly to cell lysis ; thus, this last hypothesis is not in agreement with our observations which are in better accordance with a release of degradative enzymes during cell lysis. Moreover, results concerning sialidase activity found at the end of the cultures confirm this explanation. No activity could be detected in the supernatants in absence of serum, even after 400 h of culture (culture #4) while a sialidase activity progressively accumulated during the course of serum-containing cultures (data not shown).

Therefore, our results show that EPO desialylation was directly caused by the presence of serum in the culture medium, probably because of the occurrence of cell lysis which may have induced the release of a sialidase activity in the supernatant. This desialylation was not influenced by the adaptation of cells to serum-free culture.

Our findings concerning the specific effects of the serum-free adaptation on CHO cell physiology and EPO production and those of the serum removal are summarized in table 3.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

	Effect of serum-free adaptation	Effect of serum removal
Growth performances	reversible reduction (if serum supplementation is added again)	important reduction
Cell lysis	slight improvement	important improvement
EPO production	partial and irreversible reduction	reduction
Metabolism glucose/lactate	no major effect	no major effect
Metabolism glutamine/ammonia	no major effect	no major effect
Glycan profile (except sialylation)	no major effect	no major effect
Sialylation	no major effect	important improvement

Table 3 : Specific influence of serum-free adaptation and serum removal on CHO cell physiology and EPO production.

Conclusion

The results of our study show that serum supplementation for CHO cell culture could dramatically affect cell growth, recombinant protein production and protein glycosylation.

Investigations of the specific influence of the adaptation of cells to serum-free culture show that a reversible decrease of cell growth occurred during this period (reversible if serum is supplemented again to the culture medium) as well as a partial but irreversible reduction of EPO production. This was probably due to the selection of a lower producing sub-clone whose growth capacities were maintained.

On the other hand, removal of serum from medium altered both growth performances and EPO production but allowed to recover an intact glycoprotein at the end of the process while serum-containing cultures have been shown to induce an important desialylation, probably because of the release of degradative enzymes (sialidase) during cell lysis.

Besides, cell metabolism was found to be not significantly modified by these different culture conditions.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

General effect of serum-free culture on cell physiology and protein production is widely documented, but few literature deals with the specific influence of the adaptation period. To our knowledge, this work is the first study concerning the proper effect of serum-free adaptation on protein glycosylation.

We suggested that the enzymatic degradation was caused by cell lysis to explain the desialylation found in serum-containing cultures; this hypothesis could be confirmed by inducing cell lysis in serum-free cultures and then, by verifying that desialylation also occurs in this case.

Besides, to improve the serum-free adaptation, a selection procedure based on EPO production capacities as well as growth performances, could allow to prevent the progressive selection of a lower producing clone during the adaptation period.

Acknowledgements

This work was partly funded by the Agence Nationale pour la Recherche Technique. The authors are grateful to Dr. Abderrahim Mahfoudi for donating the cDNA coding for the EPO cassette, Fabrice Blanchard for his technical support, and Professor Jean Straczek and Pascal Perrin for their expert scientific assistance in capillary electrophoresis analysis.

References

- Andersen D.C. and Goochee C.F. The effect of ammonia on the O-linked glycosylation of granulocyte colony-stimulating factor produced by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *47*, 96-105.
- Borys M.C., Linzer D.I.H. and Papoutsakis E.T. Ammonia affects the glycosylation patterns of recombinant mouse placental lactogen-I by Chinese hamster ovary cells in a pH-dependant manner. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 505-514.
- Buntmeyer H., Lutkemeyer D. et Lehmann J. Optimization of serum-free fermentation processes for antibody production. *Cytotechnology* **1991**, *5*, 57-67.
- Castro P.M., Hayter P.M., Ison A.P. et Bull A.T. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon- γ production by Chinese hamster ovary cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *38*, 84-90.
- Castro P.M.L., Ison A.P., Hayter P.M. and Bull A.T. The macroheterogeneity of recombinant human interferon- γ produced by Chinese hamster ovary cells is affected by the protein and lipid content of the culture medium. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **1995**, *21*, 87-100.
- Chen A.F.T. and Evangelista R.A. Profiling glycoprotein N-linked oligosaccharide by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 2639-2644.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

- Dordal M.S., Wang F.F. and Goldwasser E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology* **1985**, *116*, 2293-2299.
- Froud S.J. The development, benefits and disadvantages of serum-free media. *Dev. Biol. Stand.* **1999**, *99*, 157-66.
- Gawlitzeck M., Valley U., Nimitz M., Wagner R. and Conradt H.S. Characterization of changes in the glycosylation pattern of recombinant proteins from BHK-21 cells due to different culture conditions. *J. Biotechnol.* **1995**, *42*, 117-131.
- Gawlitzeck M., Valley U. and Wagner R. Ammonium ion and glucosamine dependent increases of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *57*, 518-528.
- Gooch C.F. and Monica T. Environmental effects on protein glycosylation. *Bio/Technology* **1990**, *8*, 421-426.
- Goto M., Akai K., Murakami C., Hashimoto C., Tsuda E., Ueda M., Kawanishi G., Takahashi N., Ishimoto A., Chiba H. and Sasaki R. Production of recombinant human erythropoietin in mammalian cells : host-cell dependency of the biological activity of the cloned glycoprotein. *Bio/Technology* **1988**, *6*, 67-71.
- Gramer M.J. and Gooch C.F. Glycosidase activities in Chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant. *Biotechnol. Prog.* **1993**, *9*, 366-373.
- Grammatikos S.I., Valley U., Nimitz M., Conradt H.S. and Wagner R.. Intracellular UDP-N-acetylhexosamine pool affects N-glycan complexity : a mechanism of ammonium action on protein glycosylation. *Biotechnol. Prog.* **1998**, *14*, 410-419.
- Guttman A, Chen F.T.A. and Evangelista R.A. Separation of 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonate-labeled asparagine-linked fetuin glycans by capillary gel electrophoresis. *Electrophoresis* **1996**, *17*, 412-417.
- Guttman A. Multistructure sequencing of N-linked fetuin glycans by capillary gel electrophoresis and enzyme matrix digestion. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 1136-1141.
- Hassell T., Gleave S. and Butler M. Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1991**, *30*, 29-41.
- Hewlett G. Strategies for optimising serum-free media. *Cytotechnology* **1991**, *5*, 3-14.
- Hokke C.H., Bergwerff A.A., Van Dedem G.W., Kamerling J.P. and Vliegenthart J.F. Structural analysis of the sialylated N- and O-linked carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. Sialylation patterns and branch location of dimeric N-acetylglucosamine units. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *228*, 981-1008.
- Hooker A.D., Goldman M.H., Markham N.H., James D.C., Ison A.P., Bull A.T., Strange P.G., Salmon I., Baines A.J. and Jenkins N. N-glycans of recombinant human interferon- γ change during batch culture of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *48*, 639-648.
- Imai N., Higuchi M., Kawamura A., Tomonoh K., Oh-Eda M., Fujiwara M., Shimonaka Y. and Ochi N. Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. Suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin in vitro. *Eur. J. Biochem.*, **1990**, *194*, 457-462.
- Inoue Y., Lopez L.B., Kawamoto S., Arita N., Teruya K., Seki K., Shoji M., Kamei M., Hashizume S., Shiozawa Y., Tachibana H., Ohashi H., Yasumoto K., Nagashima A., Nakahashi H., Suzuki T., Imai T., Nomoto K., Takenoyama M., Katakura Y. and Shirahata S. Production of recombinant human monoclonal antibody using ras-amplified BHK-21 cells in a protein-free medium. *Biosc. Biotech. Biochem.* **1996**, *60*, 811-817.
- Jenkins N. and Curling E.M.A. Glycosylation of recombinant proteins : problems and prospects. *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, *16*, 354-364.
- Jenkins N., Castro P., Menon S., Ison A. and Bull A. Effect of lipid supplements on the production and glycosylation of recombinant interferon-gamma expressed in CHO cells. *Cytotechnology*. **1994**, *15*, 209-15.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

Jenkins N., Parekh R.B. and James D.C. Getting the glycosylation right : implications for the biotechnology industry. *Nature Biotechnology* **1996**, *14*, 975-981.

Kobata A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *209*, 483-501.

Kopp K., Schluter M. and Werner R. Monitoring the glycosylation pattern of recombinant interferon- ω with high-pH anion-exchange chromatography and capillary electrophoresis. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **1996**, *46*, 1191-1196.

Lamotte D. Production et glycosylation de l'interferon- 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 l'INPL, 1997.

Lee G.M., Kim E.J., Kim N.S., Yoon S.K., Ahn Y.H. and Song J.Y. Development of serum-free medium for the production of EPO by suspension culture of recombinant CHO cells using a statistical design. *J. Biotechnol.* **1999**, *69*, 85-93.

Lifely M.R., Hale C., Boyce S., Keen M.J. and Phillips J. Glycosylation and biological activity of CAMPATH-1H expressed in different cell lines and grown under different culture conditions. *Glycobiology* **1995**, *5*, 813-822.

Liu C., Chu I. et Hwang S. Factorial designs combined with the steepest ascent method to optimize serum-free media for CHO cells. *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28*, 314-321.

Maiorella B.L., Winkelhake J., Young J., Moyer B., Bauer R., Hora M., Andya J., Thomson J., Patel T. and Parekh R. Effect of culture conditions on IgM antibody structure, pharmacokinetics and activity. *BioTechnology* **1993**, *11*, 387-392.

Megaw J.M. and Johnson L.D. Glycoprotein synthesized by cultured cells : effects of serum concentrations and buffers on sugar content. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1979**, *161*, 60-65.

Misaizu T., Matsuki S., Strickland T.W., Takeuchi M., Kobata A. and Takasaki S. Role of antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin. *Blood* **1995**, *86*, 4097-4104.

Moellering B.J., Tedesco J.L., Townsend R., Hardy M.R., Scott R.S. and Prior C.P. Electrophoretic differences in a MAAb expressed in three media. *BioPharm* **1990**, *3*, 30-38.

Monaco L., Marc A., Eon-Duval A., Acerbis G., Distefano G., Lamotte D., Engasser J.M., Soria M. and Jenkins N. Genetic engineering of alpha2,6-sialyltransferase in recombinant CHO cells and its effect on the sialylation of recombinant interferon-gamma. *Cytotechnology* **1996**, *22*, 197-203.

Newland M., Greenfield P.F. and Reid S. Hybridoma growth limitations: the roles of energy metabolism and ammonia production. *Cytotechnology* **1990**, *3*, 215-229.

Ozturk S. S. and Palsson B.O. Physiological changes during the adaptation of hybridoma cells to low serum and serum-free media. *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *37*, 35-46.

Patel T.P., Parekh R.B., Moellering B. and Prior C.P. Different culture methods lead to differences in glycosylation of a murine IgG monoclonal antibody. *Biochem. J.* **1992**, *285*, 839-845.

Recny M.A., Scoble H.A. and Kim Y. Structure characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17156-17163.

Sasaki H., Bothner B., Dell A. and Fukuda M. Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in CHO cells by a human erythropoietin cDNA. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 12059-12076.

Sasaki H., Ochi N., Dell A. and Fukuda M. Site-specific glycosylation of human recombinant erythropoietin : analysis of glycopeptides or peptides at each glycosylation site by FAB-MS. *Biochemistry* **1988**, *27*, 8618-8626.

Schauer R. Sialic acids as antigenic determinants of complex carbohydrates. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1988**, *228*, 47-72.

Shoemaker C.B. and Mitsch L.D. Murine erythropoietin gene : cloning, expression and human gene homology. *Mol Cell Biol* **1986**, *6*, 849-858.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

Takeuchi M., Takasaki S., Miyazaki H., Kato T., Hoshi S., Kochibe N. and Kobata A. Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant CHO cells. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 3657-3663.

Takeuchi M., Inoue N., Strikland T.W., Kubota M., Wada M., Shimizu R., Hoshi S., Kozutsumi H., Takasaki S. and Kobata A. Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7819-7822.

Takeuchi M. and Kobata A. Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins. *Glycobiology* **1991**, *1*, 337-346.

Tsuda E., Kawanishi G., Ueda M., Masuda S. and Sasaki R. The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *188*, 405-411.

Watson E., Bhide A. and van Halbeek H. Structure determination of the intact major sialylated oligosaccharide chains of recombinant human erythropoietin expressed in CHO cells. *Glycobiology* **1994**, *4*, 227-237.

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

Yang M. and Butler M. Effect of ammonia on the glycosylation of human recombinant erythropoietin in culture. *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 751-759.

Yang M. and Butler M. Enhanced erythropoietin in a CHO culture is caused by proteolytic degradation and can be eliminated by a high glutamine level. *Cytotechnology* **2000**, *34*, 83-89.

Yang M. and Butler M. Effects of ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms. *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 129-138.

Zhang J. and Wang D.I.C. Quantitative analysis and process monitoring of site-specific glycosylation microheterogeneity in recombinant human interferon- γ from Chinese hamster ovary cell culture by hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. B* **1998**, *712*, 73-82.

III. Influence de l'adaptation sans sérum sur la physiologie cellulaire

3. Conclusions

Afin d'étudier la production d'EPO dans des conditions de type industriel, notre clone de travail a été adapté à la culture sans sérum, dans un milieu commercial, sur la base d'un critère de croissance. Cette phase a abouti à une diminution très nette des performances de croissance cellulaire et de production d'EPO alors que la sialylation de la protéine se révélait bien meilleure qu'en présence de sérum. L'étude comparée de la glycosylation de l'EPO produite en présence de sérum par des cellules adaptées et non-adaptées a permis de distinguer les effets strictement liés à la procédure d'adaptation de ceux spécifiquement provoqués par l'absence de sérum dans le milieu de culture. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence le lien étroit entre la présence de sérum et la désialylation progressive de l'EPO en cours de culture alors que, selon nos analyses (par EC), l'adaptation elle-même ne semble pas influencer la glycosylation de la protéine.

De plus, l'étude de la physiologie cellulaire a montré que la diminution des capacités de croissance observée après la phase d'adaptation était réversible si les cellules se retrouvaient à nouveau en présence de sérum. Par contre, la diminution de la production d'EPO caractérisant nos cultures sans sérum s'est avérée, elle, irréversible, signe probablement de la sélection progressive au cours de l'adaptation d'un sous-clone aux capacités de croissance conservées mais moins performant en terme de production d'EPO.

Enfin, l'analyse du métabolisme cellulaire n'a pas montré de différences significatives dans ces différentes conditions de culture.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Notre travail s'est inscrit dans le cadre de l'étude de la glycosylation des protéines recombinantes produites par culture en masse de cellules animales en suspension. En effet, la composante glycanique peut déterminer certaines propriétés biologiques importantes de ces molécules ; la demi-vie de l'EPO dans la circulation sanguine est, par exemple, étroitement liée à son degré de sialylation. L'objectif général était donc d'atteindre une meilleure maîtrise de la qualité de ces glycoprotéines en analysant les phénomènes liés à la forte variabilité de composition de leurs chaînes oligosaccharidiques.

Dans le but d'identifier des conditions de culture conduisant à la synthèse privilégiée des glycoformes les plus actives, ou permettant d'éviter les phénomènes de dégradation ou d'instabilité protéique, nous avons étudié l'influence du procédé de culture sur la glycosylation d'une protéine recombinante "modèle". Plus précisément, nous avons porté notre attention sur les effets du temps de culture en procédé discontinu, ainsi que ceux de la présence de sérum dans le milieu.

Nous allons donc tout d'abord, revoir les principales contributions de notre travail (Figure 55), puis, nous proposerons des perspectives susceptibles d'élargir ou de compléter notre étude.

Mise au point du système d'étude

Dans un premier temps, nous avons construit un système d'étude permettant d'analyser la glycosylation d'une glycoprotéine purifiée, produite par culture de cellules de mammifères en bioréacteur.

Pour cela, nous avons modifié génétiquement une lignée cellulaire CHO pour lui permettre d'exprimer l'EPO murine ; cette lignée, dite "humanisée", exprimait déjà l' α 2,6-sialyltransférase, une enzyme de glycosylation présente chez l'Homme mais dont sont dépourvues les cellules CHO à l'origine. Après avoir sélectionné le clone producteur d'EPO le plus performant (parmi les 73 testés), nous avons procédé à son adaptation à des conditions de culture de type industriel (en suspension et milieu sans sérum).

Une méthode de purification de l'EPO par immuno-affinité a également été mise au point sur des critères de simplicité et de rapidité.

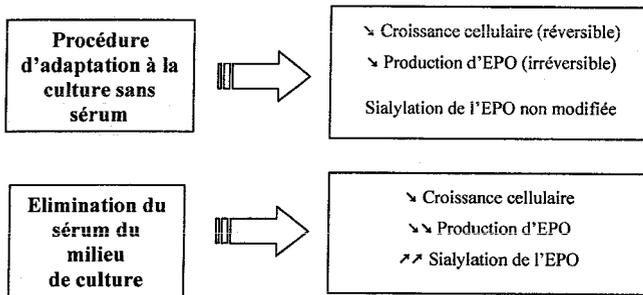
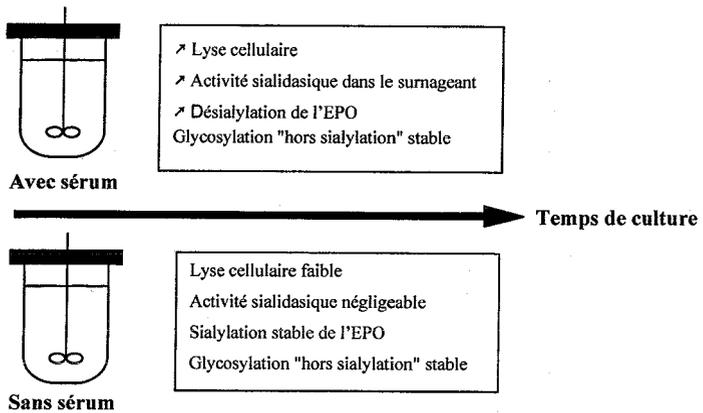
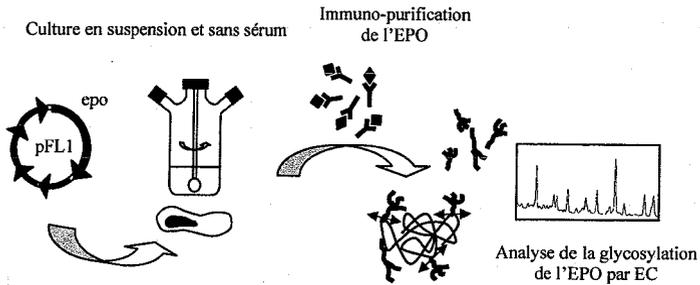


Figure 55 : Principaux résultats obtenus lors notre étude.

Les chaînes glycaniques liées en N de l'EPO ont été analysées en utilisant la technique de Chen et Evangelista (1998) que nous avons adaptée aux contraintes des études de suivi en cours de culture, en particulier, en permettant d'utiliser des quantités plus faibles de protéines, plus compatibles avec les prélèvements disponibles.

Suivi de la glycosylation de l'EPO en cours de culture discontinue : désialylation progressive en présence de sérum

Au cours de procédés discontinus, l'état physiologique des cellules suit un régime transitoire puisqu'il change en permanence en raison de l'évolution continue de leur environnement (diminution de la quantité de nutriments, production de déchets cellulaires...). Les mécanismes enzymatiques intracellulaires sont donc également susceptibles de subir d'importantes variations. Ainsi, notre système d'étude a permis de suivre l'évolution de la glycosylation de l'EPO au cours d'une culture de ce type.

Une désialylation progressive de la protéine a été mise en évidence au cours des cultures avec sérum, de même qu'une lyse cellulaire particulièrement importante. Une activité sialidase significative ayant été également retrouvée dans le surnageant de ces cultures, une dégradation enzymatique faisant suite à la lyse cellulaire, semble être à l'origine de ce phénomène en présence de sérum. En revanche, le profil glycanique "hors sialylation" de l'EPO s'est révélé stable tout au long de la culture, ce qui indique que la N-glycosylation (hormis la sialylation) reste globalement constante tout au long des procédés discontinus utilisés sur des périodes de plus de 300 heures.

Notre méthode de suivi de la glycosylation en cours de culture à l'échelle du laboratoire a donc permis de fournir des profils glycaniques particulièrement précis par rapport aux résultats obtenus par électrophorèse sur gel habituellement rapportés dans la littérature pour ce type d'application.

Adaptation à la culture sans sérum : l'élimination du sérum du milieu de culture permet d'éviter la désialylation de l'EPO, la procédure d'adaptation n'a pas d'effet spécifique sur la glycosylation

Lors de cultures en milieu sans sérum, et donc après adaptation des cellules à ces nouvelles conditions, le degré de sialylation de l'EPO ainsi que le profil glycanique "hors sialylation", se sont maintenus tous deux constants au cours du temps. Le phénomène de lyse cellulaire a été beaucoup plus limité et l'activité sialidasique retrouvée dans le surnageant en fin de culture s'est également révélé négligeable.

L'étude comparée de la glycosylation de l'EPO produite en présence de sérum par des cellules adaptées et non adaptées à la culture sans sérum a montré que l'origine de la désialylation de l'EPO au cours du temps était directement liée à la présence de sérum, et non à une possible différence de métabolisme cellulaire qui aurait pu être induite par la procédure d'adaptation des cellules à la culture sans sérum (par un phénomène de sélection des cellules vis à vis d'un environnement de moins en moins favorable).

D'un point de vue quantitatif, cette étude comparée a également permis d'observer que cette procédure d'adaptation à la culture sans sérum avait provoqué une baisse sensible des capacités de production de la lignée cellulaire. Par contre, l'analyse de son métabolisme n'a pas mis en évidence de différence significative dans les diverses conditions de culture mises en œuvre.

A notre connaissance, seuls Ozturk et Palsson (1991) ont étudié avec précision les effets propres de la phase d'adaptation à la culture sans sérum sur la production de protéines recombinantes. Complétant ces travaux par une approche orientée sur la qualité de la protéine, nos résultats sont les premiers concernant l'influence spécifique de cette adaptation sans sérum sur la glycosylation des protéines recombinantes.

En conclusion, nous avons montré que certains paramètres du procédé de production, tels que l'avancement de la culture et la présence de sérum dans le milieu, pouvaient influencer très fortement sur la qualité de l'EPO produite par notre système et qu'il était par conséquent possible de déterminer des conditions de culture favorisant la production d'une protéine de meilleure qualité (Figure 56); dans notre cas, l'EPO sialylée produite en milieu sans sérum, ou en début de culture avec sérum, devrait avoir une activité biologique prolongée dans l'organisme,

alors que celle de l'EPO désialylée produite en fin de culture avec sérum devrait s'avérer très courte. Ainsi, afin d'obtenir la protéine sous forme active, donc sialylée, deux procédés pourraient être appliqués à notre système de production d'EPO : une récolte précoce en présence de sérum, ou une récolte en fin de culture en milieu sans sérum (et pauvre en protéines totales). En raison du découplage de la croissance cellulaire et de la production de la protéine, les deux procédés conduiraient à la production d'une quantité similaire d'EPO. Outre l'avantage évident procuré au niveau réglementaire, l'absence de sérum permettrait également de diminuer les coûts de purification. Le premier procédé aurait par contre l'atout de la rapidité de production. Enfin, l'utilisation d'un milieu sans sérum mais riche en protéines (100 mg/L), représente également une alternative intéressante dans la mesure où la production d'EPO serait plus élevée, les coûts de purification qu'elle nécessiterait étant situés à un niveau intermédiaire entre ceux des deux procédés précédents.

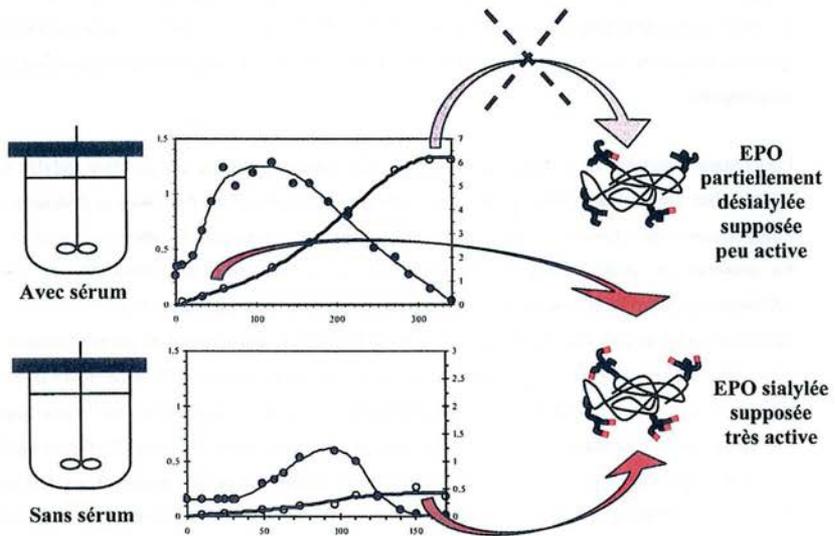


Figure 56 : Influence du procédé de culture sur la qualité de l'EPO produite.

Perspectives

Nous avons montré que la qualité d'une protéine recombinante, en particulier son degré de sialylation, pouvait être influencée de façon importante par les conditions du procédé de production.

D'un point de vue analytique tout d'abord, la quantification spécifique du contenu en acide sialique des glycoprotéines, par HPLC ou EC (Cointe *et al.*, 2000), pourrait fournir une information précise complétant les analyses des chaînes glycaniques présentées dans cette étude.

De plus, afin d'approfondir l'analyse de la structure des chaînes glycaniques, la séquence des monosaccharides les composant pourrait être déterminée par une série de clivages enzymatiques (Edge *et al.*, 1992a et b ; Yang et Butler, 2000b) ou encore plus précisément, par spectrométrie de masse après séparation par EC (Boss *et al.*, 1995 et 1998; Che *et al.*, 1999) ; notons cependant que cette deuxième voie exigerait probablement la mise au point d'une technique de purification plus poussée.

Concernant le procédé de culture, l'absence de sérum permet d'obtenir une protéine sialylée de façon stable. Un état stationnaire pourrait en outre être atteint en culture perfusée (sans sérum), et l'augmentation de la densité cellulaire permettrait également d'optimiser la production d'EPO.

En présence de sérum, il paraît important d'éviter la survenue du phénomène de lyse cellulaire (qui pourrait être quantifiée plus précisément par le suivi de l'activité LDH) lors de la deuxième partie de culture, quand le milieu devient limitant. L'abaissement du pH probablement plus important en raison de la quantité supérieure de cellules en présence de sérum pourrait être également une cause de la survenue du phénomène de lyse. Il serait donc intéressant d'envisager une culture en bioréacteur, dans laquelle le pH serait beaucoup mieux régulé qu'en flacon agité. De plus, l'application d'un mode continu permettrait d'éliminer progressivement les cellules mortes et d'atteindre un état stationnaire évitant les limitations nutritionnelles, ainsi que l'accumulation des déchets cellulaires.

Par ailleurs, une adaptation à la culture sans sérum réalisée sur la base du critère de production d'EPO prioritairement à celui de la croissance cellulaire, pourrait sans doute permettre d'améliorer les performances de notre clone en milieu sans sérum.

D'un point de vue plus fondamental, la connaissance des mécanismes enzymatiques intracellulaires de glycosylation est encore insuffisante pour atteindre un niveau de contrôle satisfaisant et leur étude représente actuellement une priorité dans le cadre de la maîtrise de la qualité des protéines recombinantes. Un projet est d'ailleurs en cours au laboratoire pour caractériser les oligosaccharides portés par le dolichol, précurseur intermédiaire lors de la synthèse des chaînes glycaniques. L'étude de l'effet de différentes conditions de culture sur cet intermédiaire est également prévue, ainsi que la recherche des étapes enzymatiques limitantes du mécanisme de synthèse du précurseur glycanique $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Abeijon C. et Hirschberg C.B.

Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum.
Trends Biochem. Sci. **1992**, 17, 32-36.

Andersen D.C. et Goochee C.F.

The effect of ammonia on the O-linked glycosylation of granulocyte colony-stimulating factor produced by Chinese hamster ovary cells.
Biotechnol. Bioeng. **1995**, 47, 96-105.

Andersen D.C., Bridges T., Gawlitzek M. et Hoy C.

Multiple cell culture factors can affect the glycosylation of Asn-184 in CHO-produced tissue-type plasminogen activator.
Biotechnol. Bioeng. **2000**, 70, 25-31.

Annable L., Cotes P.M. et Mussett M.V.

The second international reference preparation of erythropoietin, human, urinary, for bioassay.
Bull. World Health Organ. **1972**, 47, 99-112.

Bardor M., Cabanes-Macheteau M., Faye L. et Lerouge P.

Monitoring the N-glycosylation of plant glycoproteins by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis.
Electrophoresis **2000**, 21, 2550-2556.

Barnes D. et Sato G.

Methods for growth of cultured cells in serum-free medium.
Anal. Biochem. **1980**, 102, 255-270.

Barnes D.

Serum-free animal cell culture.
Biotechniques **1987**, 5, 534-542.

Barthomeuf C., Serre A.F. et Souweine B.

L'EPO recombinante.
Biofutur **1996**, 155, 16-23.

Ben Ghanem A., Winchenne J.J., Lopez C., Chretien S., Dubarry M., Craescu C.T., Le Caer J.P., Casadevall N., Rouger P., Cartron J.P. et Lambin P.

Purification and biological activity of a recombinant human erythropoietin produced by lymphoblastoid cells.
Prep. Biochem. **1994**, 24, 127-142.

Ben Ghanem A., Cherif W., Lambin P., Jenhani F. et Boukef K.

L'érythropoïétine humaine recombinante produite dans des cellules lymphoblastoïdes humaines.
J. Pharm. Belg. **1997**, 52, 177-180.

- Bernard B.A., De Luca L.M., Hassell J.R., Yamada K.M. et Olden K.
Retinoic acid alters the proportion of high mannose to complex type oligosaccharides on fibronectin secreted by cultured chondrocytes.
J. Biol. Chem. **1984**, 259, 5310-5315.
- Bessette P.H., Aslund F., Beckwith et Georgiou G.
Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **1999**, 96, 13703-13708.
- Bietlot H.P. et Girard M.
Analysis of recombinant human erythropoietin in drug formulations by high-performance capillary electrophoresis.
J. Chromatogr. A **1997**, 759, 177-184.
- Birch J.R. et Froud S.J.
Mammalian cell culture systems for recombinant protein production.
Biologicals **1994**, 22, 127-133.
- Borys M.C., Linzer D.I.H. et Papoutsakis E.T.
Culture pH affects expression rates and glycosylation of recombinant mouse placental lactogen proteins by Chinese hamster ovary (CHO) cells.
Biotechnology **1993**, 11, 720-724.
- Borys M.C., Linzer D.I.H. et Papoutsakis E.T.
Ammonia affects the glycosylation patterns of recombinant mouse placental lactogen-I by Chinese hamster ovary cells in a pH-dependant manner.
Biotechnol. Bioeng. **1994**, 43, 505-514.
- Boss H.J., Rohde M.F. et Rush R.S.
Multiple sequential fraction collection of peptides and glycopeptides by high-performance capillary electrophoresis.
Anal. Biochem. **1995**, 230, 123-129.
- Boss H.J., Watson D.B., Rush R.S.
Peptide capillary zone electrophoresis mass spectrometry of recombinant human erythropoietin : an evaluation of the analytical method.
Electrophoresis **1998**, 19, 2654-2664.
- Briggs D.W., Fisher J.W. et George W.J.
Hepatic clearance of intact and desialylated erythropoietin.
Am. J. Physiol. **1974**, 227, 1385-1388.
- Buntmeyer H., Lutkemeyer D. et Lehmann J.
Optimization of serum-free fermentation processes for antibody production.
Cytotechnology **1991**, 5, 57-67.
- Cacciuto M.A., Patchan M., Lamey K., Allikmets E. et Tsao E.
Large-scale production of a monoclonal IgM in a hybridoma suspension culture.
Pharm. Technol., **1998**, 22, 44-58.

Castro P.M., Hayter P.M., Ison A.P. et Bull A.T.
Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon- γ production by Chinese hamster ovary cells.
Appl. Microbiol. Biotechnol. **1992**, 38, 84-90.

Castro P.M.L., Ison A.P., Hayter P.M. et Bull A.T.
The macroheterogeneity of recombinant human interferon- γ produced by Chinese hamster ovary cells is affected by the protein and lipid content of the culture medium.
Biotechnol. Appl. Biochem., **1995**, 21, 87-100.

Cayli A., Hirschmann F., Wirth M., Hauser H. et Wagner R.
Cell lines with reduced UDP-N-acetylhexosamine pool in the presence of ammonium.
Biotechnol. Bioeng. **1999**, 65, 192-200.

Chadd H.E. et Chamow S.M.
Therapeutic antibody expression technology.
Curr. Opin. Biotechnol. **2001**, 12, 188-194.

Che F.Y., Shao X.X., Wang K.Y. et Xia Q.C.
Characterization of derivatization of sialic acid with 2-aminocridone and determination of sialic acid content in glycoproteins by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography – ion trap mass spectrometry.
Electrophoresis **1999**, 20, 2930-2937.

Chen A.F.T. et Evangelista R.A.
Profiling glycoprotein N-linked oligosaccharide by capillary electrophoresis.
Electrophoresis **1998**, 19, 2639-2644.

Chen A.F.T., Dobashi T.S. et Evangelista R.A.
Quantitative analysis of sugar constituents of glycoproteins by capillary electrophoresis.
Glycobiology **1998**, 8, 1045-1052.

Chenu S., Gregoire A., Malikh Y., Visvikis A., Moncio L., Shaw L., Schauer R., Marc A. et Goergen J.L.
Reduction of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase activity in engineered CHO cells using an antisense-RNA strategy.
Biochim. Biophys. Acta **2003**, 1622, 133-144.

Cherlet M.
De l'intérêt de la cytométrie en flux pour l'étude de cultures d'hybridomes en bioréacteurs: cinétiques de croissance et décès cellulaires, de production d'anticorps et d'évolution du pH intracellulaire.
Thèse de doctorat INPL, Nancy, **1995**.

Chotigeat W., Watanapokasin Y., Mahler S. et Gray P.P.
Role of environmental conditions on the expression levels, glycoform pattern and levels of sialyltransferase for hFSH produced by recombinant CHO cells.
Cytotechnology **1994**, 15, 217-221.

- Chu L. et Robinson D.K.
Industrial choices for protein production by large-scale cell culture.
Curr. Opin. Biotechnol. **2001**, 12, 180-187.
- Cifuentes A., Moreno-Arribas M.V., de Frutos M. et Diez-Masa J.C.
Capillary isoelectric focusing of EPO glycoforms and its comparison with flat-bed isoelectric focusing and capillary zone electrophoresis.
J. Chromatogr. A **1999**, 830, 453-463.
- Clark A.J.
The mammary gland as a bioreactor: expression, processing, and production of recombinant proteins.
J. Mammary Gland Biol. Neoplasia **1998**, 3, 337-350.
- Cointe D., Béliard R., Jorieux S., Leroy Y., Glacet A., Verbert A., Bourel D. et Chirat F.
Unusual N-glycosylation of a recombinant erythropoietin expressed in a human lymphoblastoid cell line does not alter its biological properties.
Glycobiology **2000**, 10, 511-519.
- Conradt H.S., Egge H., Peter-Katalinic J., Reiser W., Siklosi T. et Schaper K.
Structure of the carbohydrate moiety of human interferon-beta secreted by a recombinant CHO cell line.
J. Biol. Chem. **1987**, 262, 14600-14605.
- Conradt H.S., Schaper K., Proppe C. et Nimt M.
Mapping of N-linked oligosaccharides from human recombinant glycoproteins : quality control of glycosylated therapeutic polypeptides ?
In : Production of biologicals from animal cells in culture (Spier R.E, Griffiths B. et Meignier B. Eds.), Butterworth -Heinmann, **1991**, 775-782.
- Coulibaly S., Besenfelder U., Fleischmann M., Zinovieva N., Grossmann A., Wozny M., Bartke I., Togel M., Muller M. et Brem G.
Human nerve growth factor beta (hNGF- β): mammary gland specific expression and production in transgenic rabbits.
FEBS Lett. **1999**, 5, 111-116.
- Cruz H., Peixoto C.M., Nimt M., Alves P.M., Dias E.M., Moreira J.L. et Carrondo M.J.T.
Metabolic shifts do not influence the glycosylation patterns of a recombinant fusion protein expressed in BHK cells.
Biotechnol. Bioeng. **2000**, 69, 129-139.
- Cumming D.A.
Physiological relevance of protein glycosylation.
Develop. Biol. Standard. **1992**, 76, 83-94.
- Curling E.M., Hayter P.M., Baines A.J., Bull A.T., Gull K., Strange P.G. et Jenkins N.
Recombinant human IFN- γ . Differences in glycosylation and proteolytic processing lead to heterogeneity in batch culture.
Biochemistry **1990**, 272, 333-337.

Cutler R.L., Johnson G.R. et Nicola N.A.
Characterization of murine erythropoietin.
Exp. Hematol. **1985**, 13, 899-905.

Damm J.B.L.
Application of glycobiology in the biotechnological production of pharmaceuticals.
Pharm. Technol. Eur. **1995**, 7, 28-33.

Dardenne M.
Stratégie d'optimisation de la production d'anticorps monoclonaux en réacteurs semi-fermés :
enrichissement du milieu de culture, substitution de substrats et ajout d'un effecteur.
Thèse de doctorat INPL, Nancy, **1995**.

Davis J.M., Arakawa T., Strickland T.W. et Yphantis D.A.
Characterization of recombinant human erythropoietin produced in CHO cells.
Biochemistry **1987**, 26, 2633-2638.

De Frutos M., Cifuentes A. et Diez-Masa J.C.
Differences in capillary electrophoresis profiles of urinary and recombinant erythropoietin.
Electrophoresis **2003**, 24, 678-680.

Delorme E, Lorenzini T, Giffin J, Martin F, Jacobsen F, Boone T, Elliott S.
Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin.
Biochemistry. **1992**, 31, 9871-9876.

Deparis V.
Etude et maîtrise d'éléments clés du procédé de production de l' α 1,3/4 fucosyltransférase
humaine par le système baculovirus / cellules d'insectes.
Thèse de doctorat INPL, Nancy, **2002**.

Dodet B.
Production de protéines recombinantes : quel système choisir ?
Biofutur **1990**, 90, 20-29.

Dordal M.S., Wang F.F. et Goldwasser E.
The role of carbohydrate in erythropoietin action.
Endocrinology **1985**, 116, 2293-2299.

Drickamer K. et Taylor M.E.
Evolving views of protein glycosylation.
Trends Biochem. Sci. **1998**, 23, 321-324.

Dubè S., Fisher J.W. et Powell J.S.
Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion and
biological function.
J. Biol. Chem. **1988**, 263, 17516-17521.

Dutton G.
Improved tools for large-scale bioprocessing.
Genet. Eng. News **2000**, 20, 57,63.

Dwek R.A.

Glycobiology : more functions for oligosaccharides.

Science **1995**, 269, 1234-1235.

Edge C., Parekh R., Rademacher T., Wormald M. et Dwek R.

Fast sequencing of oligosaccharides using arrays of enzymes.

Nature **1992**, 358, 693-694.

Edge C., Rademacher T., Wormald M., Parekh R., Butters T., Wing D. et Dwek R.

Fast sequencing of oligosaccharides : the reagent-array analysis method.

Proc. Natl. Acad. Sci. **1992**, 89, 6338-6342.

Egrie J.

The cloning and production of recombinant human erythropoietin.

Pharmacotherapy **1990**, 10, 3S-8S.

Elbein A.D.

The role of N-linked oligosaccharides in glycoprotein function.

Trends Biotechnol. **1991**, 9, 346-352.

Elliot JM, Lorenzi T., Asher S. et Egrie J.

Enhancement of therapeutic protein *in vivo* activities through glycoengineering.

Nat. Biotechnol. **2003**, 21, 414-421

Fernandes A.I. et Gregoriadis G.

The effect of polysialylation on the immunogenicity and antigenicity of asparaginase : implication in its pharmacokinetics.

Int. J. Pharm. **2001**, 217, 215-224.

Fibi M., Struber W., Hintz-Obertreis P., Lubem G., Krumwieg D., Siebold B., Zettlmeissl et Kupper H.

Evidence for the location of the receptor-binding site of human erythropoietin at the carboxyl-terminal domain.

Blood **1991**, 77, 1203-1210.

Fibi M., Hermentin P., Pauly J.U., Lauffer et Zettlmeissl G.

N- and O-glycosylation mutants of recombinant human erythropoietin secreted from BHK-21 cells.

Blood **1995**, 85, 1229-1236.

Fischer R., Emans N., Schuster F., Hellwig S. et Drossard J.

Towards molecular farming in the future : using plant-cell-suspension cultures as bioreactors.

Biotechnol. Appl. Biochem. **1999**, 30, 109-112.

Fisher J.W.

Erythropoietin : physiologic and pharmacologic aspects.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **1997**, 216, 358-369.

Flaharty K.K.

Clinical pharmacology of recombinant human erythropoietin.

Pharmacotherapy **1990**, 10, 9S-14S.

Flesher E.R., Marzowski K., Wang W.C. et Raff H.V.
Fluorophore-labeled glycan analysis of immunoglobulin fusion proteins : correlation of oligosaccharide content with in vivo clearance profile.
Biotechnol. Bioeng. **1995**, 46, 399-407.

Friedman Y. et Higgins E.A.
A method for monitoring the glycosylation of recombinant glycoproteins from conditioned medium, using fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis.
Anal. Biochem. **1995**, 228, 221-225.

Froud S.J.
The development, benefits and disadvantages of serum-free media.
Dev. Biol. Stand. **1999**, 99, 157-166.

Fukuda M.N., Sasaki H., Lopez L. et Fukuda M.
Survival of recombinant erythropoietin in the circulation : the role of carbohydrates.
Blood **1989**, 73, 84-89.

Garnier A., Cote J., Nadeau I, Kamen A. et Massie B.
Scale-up of adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells.
Cytotechnology **1994**, 15, 145-155.

Gavilondo J.V. et Larrick J.W.
Antibody engineering at the millennium.
Biotechniques. **2000**, 29, 128-138.

Gawlitzeck M., Valley U., Nimtz M., Wagner R. et Conradt H.S.
Characterization of changes in the glycosylation pattern of recombinant proteins from BHK-21 cells due to different culture conditions.
J. Biotechnol. **1995**, 42, 117-131.

Gawlitzeck M., Valley U. et Wagner R.
Ammonium ion and glucosamine dependent increases of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells.
Biotechnol. Bioeng. **1998**, 57, 518-528.

Gawlitzeck M., Ryll T., Lofgren J. et Sliwowski M.B.
Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG : degradative versus biosynthetic mechanisms.
Biotechnol. Bioeng. **2000**, 68, 637-646.

Gershman H. et Robbins P.W.
Transitory effects of glucose starvation on the synthesis of dolichol-linked oligosaccharides in mammalian cells.
J. Biol. Chem. **1981**, 256, 7774-7780.

Gokana A., Winchenne J.J., Ben Ghanem A., Ahaded A., Cartron J.P. et Lambin P.
Chromatographic separation of recombinant human erythropoietin isoforms.
J. Chromatogr. A **1997**, 791, 109-118.

- Goldman M.H., James D.C., Ison A.P. et Bull A.T.
Monitoring proteolysis of recombinant human interferon- γ during batch culture of CHO cells.
Cytotechnology **1997**, 23, 103-111.
- Goldman M.H., James D.C., Rendall M., Ison A.P., Hoare M. et Bull A.T.
Monitoring recombinant human interferon- γ N-glycosylation during perfused fluidized-bed and stirred-tank batch culture of CHO cells.
Biotechnol. Bioeng. **1998**, 60, 596-607.
- Goldwasser E., Kung C.K. et Eliason J.
On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. The role of sialic acid in erythropoietin action.
J. Biol. Chem. **1974**, 249, 4202-4206.
- Goochee C.F. et Monica T.
Environmental effects on protein glycosylation.
Bio/Technology **1990**, 8, 421-426.
- Goochee C.F., Gramer M.J., Andersen D.C., Bahr J.B. et Rasmussen J.R.
The oligosaccharides of glycoproteins : bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoproteins properties.
Bio/Technology **1991**, 9, 1347-1355.
- Goto M., Akai K., Murakami C., Hashimoto C., Tsuda E., Ueda M., Kawanishi G., Takahashi N., Ishimoto A., Chiba H. et Sasaki R.
Production of recombinant human erythropoietin in mammalian cells : host-cell dependency of the biological activity of the cloned glycoprotein.
Bio/Technology **1988**, 6, 67-71.
- Gramer M.J. et Goochee C.F.
Glycosidase activities in Chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant.
Biotechnol. Prog. **1993**, 9, 366-373.
- Gramer M.J., Goochee C.F., Chock V.Y., Brousseau D.T. et Sliwkowski M.B.
Removal of sialic acid from a glycoprotein in CHO cell culture supernatant by action of an extracellular CHO cell sialidase.
Bio/Technology **1995**, 13, 692-698.
- Gramer M.J.
Detecting and minimizing glycosidase activities that can hydrolyze sugars from cell culture-produced glycoproteins.
Mol. Biotechnol. **2000**, 15, 69-75.
- Grammatikos S.I., Valley U., Nimitz M., Conradt H.S. et Wagner R.
Intracellular UDP-N-acetylhexosamine pool affects N-glycan complexity : a mechanism of ammonium action on protein glycosylation.
Biotechnol. Prog. **1998**, 14, 410-419.
- Griffiths J.B., Looby D. et Racher A.J.
Maximisation of perfusion systems and process comparison with batch-type cultures.
Cytotechnology **1992**, 9, 3-9.

Gu X., Harmon B.J. et Wang D.I.C.

Site- and branch-specific sialylation of recombinant human IFN- γ in CHO cell culture.
Biotechnol. Bioeng. **1997**, 55, 390-398.

Gu X. et Wang D.I.C.

Improvement of IFN- γ sialylation in CHO cell culture by feeding of N-acetylmannosamine.
Biotechnol. Bioeng. **1998**, 58, 642-648.

Guttman A. et Starr C.,

Capillary and slab gel electrophoresis profiling of oligosaccharides .
Electrophoresis **1995**, 16, 993-997.

Guttman A.

High-resolution carbohydrate profiling by capillary gel electrophoresis.
Nature **1996**, 380, 461-462.

Guttman A., Chen F.T.A., Evangelista R.A. et Cooke N.

High-resolution capillary gel electrophoresis of reducing oligosaccharides labeled with 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonate.
Anal. Biochem. **1996**, 233, 234-242.

Guttman A., Chen F.T.A. et Evangelista R.A.

Separation of 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonate-labeled asparagine-linked fetuin glycans by capillary gel electrophoresis.
Electrophoresis **1996**, 17, 412-417.

Guttman A.

Multistructure sequencing of N-linked fetuin glycans by capillary gel electrophoresis and enzyme matrix digestion.
Electrophoresis **1997**, 18, 1136-1141.

Harduin-Lepers A., Vallejo-Ruiz V., Krzewinski-Recchi M.A., Samyn-Petit B., Julien S. et Delannoy P.

The human sialyltransferase family.
Biochimie **2001**, 83, 727-737.

Harmon B.J., Gu X. et Wang D.I.C.

Rapid monitoring of site-specific glycosylation microheterogeneity of recombinant human interferon- γ .
Anal. Chem. **1996**, 68, 1465-1473.

Hassell T., Gleave S. et Butler M.

Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia.
Appl. Biochem. Biotechnol. **1991**, 30, 29-41.

Hata J., Tamura T., Yokoshima S., Kabeno S., Matsumoto K. et Onodera K.

Chemically defined medium for the production of biologically active substances of CHO cells.
Cytotechnology **1992**, 10, 9-14.

Hayter P.M., Curling E.M.A., Gould M.L., Baines A.J., Jenkins N., Salmon I., Strange P.G. et Bull A.T.

The effect of the dilution rate on CHO cell physiology and recombinant interferon- γ production in glucose-limited chemostat culture.

Biotechnol. Bioeng. **1993**, 42, 1077-1085.

Hermentin P., Doenges R., Witzel R., Hokke C.H., Vliegenthart J.F.G., Kamerling J.P., Conradt H.S., Nimitz M. et Brazel D.

A strategy for the mapping of N-glycans by high-performance capillary electrophoresis.

Anal. Biochem. **1994**, 221, 29-41.

Hewlett G.

Strategies for optimising serum-free media

Cytotechnology **1991**, 5, 3-14.

Higuchi M., Oh-eda M., Kuboniwa H., Tomonoh K., Shimonaka Y. et Ochi N.

Role of sugar chains in the expression of the biological activity of human erythropoetin.

J. Biol. Chem. **1992**, 267, 7703-7709.

Hodgson J.

Expression systems : a user's guide.

BioTechnology **1993**, 11, 887-893.

Hokke C.H., Bergwerff A.A., Van Dedem G.W., Kamerling J.P. et Vliegenthart J.F.

Structural analysis of the sialylated N- and O-linked carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. Sialylation patterns and branch location of dimeric N-acetylglucosamine units.

Eur. J. Biochem. **1995**, 228, 981-1008.

Hooker A.D., Goldman M.H., Markham N.H., James D.C., Ison A.P. Bull A.T., Strange P.G., Salmon I., Baines A.J. et Jenkins N.

N-glycans of recombinant human interferon- γ change during batch culture of Chinese hamster ovary cells.

Biotechnol. Bioeng. **1995**, 48, 639-648.

Horn U., Strittmatter W., Krebber A., Knupfer U., Kujau M., Wenderoth R., Muller K., Matzku S., Pluckthum A. et Riesenberg D.

High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions.

Appl. Microbiol. Biotechnol. **1996**, 46, 524-532.

Houdebine L.M.

The production of pharmaceutical proteins from the milk of transgenic animals.

Reprod. Nutr. Dev. **1995**, 35, 609-617.

Houdebine L.M.

Transgenic animal bioreactors.

Transgenic research **2000**, 9, 305-320.

Hu W.S. et Aunins J.G.

Large-scale mammalian cell culture.

Curr. Opin. Biotechnol. **1997**, 8, 148-153.

Hu X., Xiao C., Huang Z., Guo Z., Zhang Z. et Li Z.

Pilot production of u-PA with porous microcarrier cell culture.

Cytotechnology **2000**, 33, 13-19.

Imai N., Kawamura A., Higuchi M., Oh-Eda M., Kawaguchi T. et Ochi N.

Physicochemical and biological comparison of recombinant human EPO with human urinary EPO.

J. Biochem., **1990**, 107, 352-359.

Imai N., Higuchi M., Kawamura A., Tomonoh K., Oh-Eda M., Fujiwara M., Shimonaka Y. et Ochi N.

Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. Suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin in vitro.

Eur. J. Biochem., **1990**, 194, 457-462.

Inoue N., Takeuchi M., Asano K., Shimizu R., Takasaki S. et Kobata A.

Structures of mucin-type sugar chains on human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells.

Arch Biochem Biophys. **1993**, 301, 375-378.

Inoue N., Takeuchi M., Ohashi H. et Suzuki T.

The production of recombinant human erythropoietin.

Biotechnol. Annu. Rev. **1995**, 1, 297-313.

Inoue Y., Lopez L.B., Kawamoto S., Arita N., Teruya K., Seki K., Shoji M., Kamei M., Hashizume S., Shiozawa Y., Tachibana H., Ohashi H., Yasumoto K., Nagashima A., Nakahashi H., Suzuki T., Imai T., Nomoto K., Takenoyama M. Katakura Y. et Shirahata S.

Production of recombinant human monoclonal antibody using ras-amplified BHK-21 cells in a protein-free medium.

Biosc. Biotech. Biochem. **1996**, 60, 811-817.

Inoue Y., Arita N., Teruya K., Katakura Y. et Shirahata S.

Efficient production of recombinant human erythropoietin by replenishment of microcarriers in the hollow fiber culture cassette.

Biosc. Biotechnol. Biochem. **1999**, 63, 1624-1626.

Inoue N., Watanabe T., Kutsukake T., Saitoh H., Tsumura H., Arai H. et Takeuchi M.

Asn-linked sugar chain structures of recombinant human thrombopoietin produced in Chinese hamster ovary cells.

Glycoconj. J. **1999**, 16, 707-718.

Jacobs K., Shoemaker C., Rudersdorf R., Neill S.D., Kaufman R.J., Mufson A., Seehra J., Jones S.S., Hewick R., Fritsch E. F., Kawakita M., Shimizu T. et Miyake T.

Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human EPO.

Nature **1985**, 313, 806-810.

- James D.C., Freedman R.B., Hoare M. et Jenkins N.
High-resolution separation of recombinant human IFN- γ glycoforms by micellar electrokinetic capillary chromatography.
Anal. Biochem. **1994**, 222, 315-322.
- Jelkmann W.
Erythropoietin : structure, control of production and function.
Physiol. Rev. **1992**, 72, 449-489.
- Jenkins N. et Hovey A.
Temperature control of growth and productivity in mutant CHO cells synthesizing a recombinant protein.
Biotechnol. Prog. **1993**, 42, 1029-1031.
- Jenkins N. et Curling E.M.A.
Glycosylation of recombinant proteins : problems and prospects.
Enzyme Microb. Technol. **1994**, 16, 354-364.
- Jenkins N., Castro P., Menon S., Ison A. et Bull A.
Effect of lipid supplements on the production and glycosylation of recombinant interferon- γ expressed in CHO cells.
Cytotechnology. **1994**, 15, 209-15.
- Jenkins N.
Monitoring and control of recombinant glycoprotein heterogeneity in animal cell cultures.
Biochem. Soc. Trans. **1995**, 23, 171-175.
- Jenkins N., Parekh R.B. et James D.C.
Getting the glycosylation right : implications for the biotechnology industry.
Nature Biotechnology **1996**, 14, 975-981.
- Jones D., Kroos N., Anema R., Van Montfort B., Vooy's A., Van Der Kraats S., Van Der Helm E., Smits S., Schouten J., Brouwer K., Lagerwerf F., Van Berkel P., Opstelten D.J., Logtenberg T. et Bout A.
High-level expression of recombinant IgG in the human cell line PER.C6.
Biotechnol. Prog. **2003**, 19, 163-168.
- Kagawa Y., Takasaki S., Utsumi J., Hosoi K., Shimizu H., Kochibe N. et Kobata A.
Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of natural human interferon- β 1 and recombinant human interferon- β 1 produced by three different mammalian cells.
J. Biol. Chem. **1988**, 263, 17508-17515.
- Kakehi K., Kinoshita M., Kawakami D., Tanaka J., Sei K., Endo K., Oda Y., Iwaki M. et Masuko T.
Capillary electrophoresis of sialic acid-containing glycoprotein. Effect of the heterogeneity of carbohydrate chains on glycoform separation using an α 1-acid glycoprotein as a model.
Anal. Chem. **2001**, 73, 2640-2647.

Kanazawa K., Ashida K., Itoh M., Nagai H., Sasaki H. et Fukuda M.
Establishment of a method for mapping of N-linked oligosaccharides and its use to analyze industrially produced recombinant erythropoietin.
Biol. Pharm. Bull. **1999**, 22, 339-346.

Kawasaki N., Ohta M., Hyuga S., Hyuga M. et Hayakawa T.
Application of liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry to the analysis of the site-specific carbohydrate heterogeneity in erythropoietin.
Anal. Biochem. **2000**, 285, 82-91.

Keay L., Walsh J.M., Buchholz R.M. et Terando J.M.
Production of recombinant human erythropoietin in Bowes melanoma cells in suspension culture.
Appl. Microbiol. Biotechnol. **1990**, 34, 198-202

Keen M.J. et Rapson N.T.
Development of a serum-free culture medium for the large scale production of recombinant protein from a CHO cell line.
Cytotechnology **1995**, 17, 153-163.

Khazaeli M.B., Conry R.M. et LoBuglio A.F.
Human immune response to monoclonal antibodies.
J. Immunother. **1994**, 15, 42-52.

Kigawa T., Yabuki T., Yoshida Y., Tsutsui M., Ito Y., Shibata T. et Yokoyama S.
Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins.
FEBS Lett. **1999**, 442, 15-19.

Kimura R. et Miller W.M.
Glycosylation of CHO-derived recombinant tPA produced under elevated pCO₂.
Biotechnol. Prog. **1997**, 13, 311-317.

Kinoshita M., Murakami E., Oda Y., Funakubo T., Kawakami D., Kakehi K., Kawasaki N., Morimoto K. et Hayakawa T.
Comparative studies on the analysis of glycosylation heterogeneity of sialic acid-containing glycoproteins using capillary electrophoresis.
J Chromatogr. A **2000**, 866, 261-271.

Kitamura T., Tange T., Terasawa T., Chiba S., Kuwaki T., Miyagawa K., Piao Y.F., Miyazono K., Urabe A. et Takaku F.
Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin.
J. Cell. Physiol. **1989**, 140, 323-334.

Kobata A.
Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins.
Eur. J. Biochem. **1992**, 209, 483-501.

Kopp K., Schluter M. et Werner R.G.
Monitoring the glycosylation pattern of recombinant interferon-omega with high-pH anion-exchange chromatography and capillary electrophoresis.
Arzneim-Forsch./Drug Res. **1996**, 46, 1191-1196.

Kopp K., Noe W., Schluter M., Walz F. et Werner R.
Analysis of the product consistency : independent of process parameters, rt-PA shows a stable glycosylation pattern.
In : *Animal Cell Technology. Products for today, prospects for tomorrow.* (Spier R.E., Griffiths J.B. et Berthold W., Eds.), Butterwoth-Heinemann, **1997**, 661-666.

Kornfeld R. et Kornfeld S.
Assembly of asparagine-linked oligosaccharides.
Annu. Rev. Biochem. **1985**, 54, 631-664.

Kornfeld S.
Diseases of abnormal protein glycosylation : an emerging area.
J. Clin. Invest. **1998**, 101, 1293-1295.

Krystal G., Pankratz R.C., Farber N.M. et Smart J.E.
Purification of hEPO to homogeneity by a rapid five-step procedure.
Blood **1986**, 67, 71-79.

Kung C.K. et Goldwasser E.
A probable conformational difference between recombinant and urinary erythropoietins.
Proteins **1997**, 28, 94-98.

Kunkel J.P., Jan D.C., Jamieson J.C. et Butler M.
Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody.
J. Biotechnol. **1998**, 62, 55-71.

Kunkel J.P., Jan D.C., Butler M. et Jamieson J.C.
Comparisons of the glycosylation of a monoclonal antibody produced under nominally identical cell culture conditions in two different bioreactors.
Biotechnol. Prog. **2000**, 16, 462-70.

Kurano N., Leist C., Messi F., Kurano S. et Fiechter A.
Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor: 1. Effects of physical and chemical environments.
J. Biotechnol. **1990**, 15, 101-111.

Kurano S., Kurano N., Leist C., et Fiechter A.
Utilization and stability of vitamins in serum-containing and serum-free media in CHO cell culture.
Cytotechnology **1990**, 4, 243-250.

Lacombe C. et Mayeux P.
The molecular biology of erythropoietin.
Nephrol. Dial. Transplant. **1999**, 14, 22-28.

Laemmli U.K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **1970**, 227, 680-685.

Lai P.H., Everett R., Wang F.F., Arakawa T. et Goldwasser E.

Structure characterization of human EPO.

J. Biol. Chem. **1986**, 261, 3116-3121.

Lambert N. et Merten O.W.

Effect of serum-free and serum-containing medium on cellular levels of ER-based proteins in various mouse hybridoma cell lines.

Biotechnol. Bioeng. **1996**, 54, 165-180.

Lamotte D.

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, **1997**.

Lamotte D., Buckberry L., Monaco L., Soria M., Jenkins N., Engasser J.M. et Marc A.

Na-butyrate increases the production and $\alpha 2,6$ -sialylation of recombinant IFN- γ expressed by $\alpha 2,6$ -sialyltransferase engineered CHO cells.

Cytotechnology **1999**, 29, 55-64.

Lasne F. et de Ceaurriz J.

Recombinant EPO in urine.

Nature **2000**, 405, 635.

Lasne F., Martin L., Crepin N et de Ceaurriz J.

Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine : differentiation of natural and administered recombinant hormones.

Anal. Biochem. **2002**, 311, 119-126.

Larrick J.W., Yu L., Naftzger C., Jaiswal S. et Wycoff K.

Production of secretory IgA antibodies in plants

Biomol. Eng. **2001**, 18, 87-94.

Lee U.E., Roth J. et Paulson J.C.

Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of CHO cells by expression of β -galactoside $\alpha 2,6$ -sialyltransferase.

J. Biol. Chem. **1989**, 264, 13848-13855.

Lee G.M., Kim E.J., Kim N.S., Yoon S.K., Ahn Y.H. et Song J.Y.

Development of serum-free medium for the production of EPO by suspension culture of recombinant CHO cells using a statistical design.

J. Biotechnol. **1999**, 69, 85-93.

Lee-Huang S.

A new preparative method for isolation of human erythropoietin with hydrophobic interaction chromatography.

Blood **1980**, 56, 620-624.

Lerouge P., Bardor M., Pagny S., Gomord V. et Faye L.
N-glycosylation of recombinant pharmaceutical glycoproteins produced in transgenic plants : towards an humanization of plant N-glycans.
Curr. Pharm. Biotechnol. **2000**, 1, 347-354.

Lifely M.R., Hale C., Boyce S., Keen M.J. et Phillips J.
Glycosylation and biological activity of CAMPATH-1H expressed in different cell lines and grown under different culture conditions.
Glycobiology **1995**, 5, 813-822.

Lin F.K., Suggs S., Lin C.H., Browne J.K., Smalling R., Egrie J.C., Chen K.K., Fox G.M., Martin F., Stabinsky Z., Badrawi S., Lai P.H. et Goldwasser E.
Cloning and expression of the human EPO gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. **1985**, 82, 7580-7584.

Lin A.A., Kimura R. et Miller W.M.
Production of t-PA in recombinant CHO cells under oxygen-limited conditions.
Biotechnol. Bioeng. **1993**, 42, 339-350.

Liu C., Chu I. et Hwang S.
Factorial designs combined with the steepest ascent method to optimize serum-free media for CHO cells.
Enzyme Microb. Technol. **2001**, 28, 314-321.

Lopez C., de Chesnay A., Tournamille C., Ben Ghanem A., Prigent S., Drouet X., Lambin P. et Cartron J.P.
Efficient production of biologically active human recombinant proteins in human lymphoblastoid cells from integrative and episomal expression vectors.
Gene **1994**, 148, 285-291.

Lucas B.K., Giere L.M., DeMarco R.A., Shen A., Chisholm V., Crowley C.W.
High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector
Nucleic Acids Res. **1996**, 24, 1774-1779.

Ma J.K., Hiatt A., Hein M., Vine N.D., Wang F., Stabila P., van Dolleweerd C., Mostov K. et Lehner T.
Generation and assembly of secretory antibodies in plants.
Science **1995**, 268, 716-9.

Maiorella B.L., Winkelhake J., Young J., Moyer B., Bauer R., Hora M., Andya J., Thomson J., Patel T. et Parekh R.
Effect of culture conditions on IgM antibody structure, pharmacokinetics and activity.
BioTechnology **1993**, 11, 387-392.

Marchal I., Jarvis D.L., Cacan R. et Verbert A.
Glycoproteins from insect cells: sialylated or not ?
Biol. Chem. **2001**, 382, 151-159.

Mather J.P., Moore A., et Shawley R.
Optimization of growth, viability, and specific productivity for expression of recombinant proteins in mammalian cells.
Methods Mol. Biol. **1997**, 62, 369-382.

Matsumoto S., Ikura K., Ueda M. et Sasaki R.
Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells.
Plant Mol. Biol. **1995**, 27, 1163-1172.

Medzihradsky K.F., Besman M.J. et Burlingame A.L.
Structural characterization of site-specific N-glycosylation of recombinant human factor VIII by reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry.
Anal. Chem. **1997**, 69, 3986-3994.

Megaw J.M. et Johnson L.D.
Glycoprotein synthesized by cultured cells : effects of serum concentrations and buffers on sugar content.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **1979**, 161, 60-65.

Mehlman C.T., Nematbakhsh A.R., Crawford A.H. et Berlin R.E.
Spinal deformity associated with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome (Jaeken's syndrome): a report of three cases.
Spine **2003**, 28, 132-135.

Meynal-Salles.I. et Combes D.
In vitro glycosylation of proteins : an enzymatic approach.
J. Biotechnol. **1996**, 46, 1-14.

Miyake T., Kung C. K.H. et Goldwasser E.
Purification of EPO.
J. Biol. Chem **1977**, 252, 5558-5564.

Miyazaki H., Kozutsumi H., Kato T., Hoshi S., Tamura S. Kubota M. et Suzuki T.
Production of monoclonal antibodies against human erythropoietin and their use in the purification of human urinary erythropoietin.
J. Immunol. Methods **1988**, 113, 261-267.

Misaizu T., Matsuki S., Strickland T.W., Takeuchi M., Kobata A. et Takasaki S.
Role of antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin.
Blood **1995**, 86, 4097-4104.

Moellering B.J., Tedesco J.L., Townsend R., Hardy M.R., Scott R.S. et Prior C.P.
Electrophoretic differences in a MAb expressed in three media.
BioPharm. **1990**, 3, 30-38.

Monaco L., Marc A., Eon-Duval A., Acerbis G., Distefano G., Lamotte D., Engasser J.M., Soria M. et Jenkins N.

Genetic engineering of alpha2,6-sialyltransferase in recombinant CHO cells and its effect on the sialylation of recombinant interferon- γ .

Cytotechnology **1996**, 22, 197-203.

Monsigny M.

Les glycoconjugués : signaux de reconnaissance.

Biofutur (technoscope) **1993**, 125, 20-24.

Montreuil J.

La structure des glycoconjugués.

Biofutur (technoscope) **1993**, 125, 12-17.

Moran E.B., McGowan S.T., McGuire J.M., Frankland J.E., Oyebade I.A., Waller W., Archer L.C., Morris L.O., Samatha R.N., Smith L., Cadette M.L. et Michalowski J.T.

A systematic approach to the validation of process control parameters for monoclonal antibody production in fed-batch culture of a murine myeloma.

Biotechnol. Bioeng. **2000**, 69, 242-255.

Morelle C.

Les systèmes d'expression eucaryotes.

Biofutur (technoscope) **1993**, 125, 2-15.

Morimoto K., Maeda N., Abdel-Alim A.A.F., Toyoshima S. et Hayakawa T.

Structural characterization of recombinant human erythropoietins by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis.

Biol. Pharm. Bull. **1999**, 22, 5-10.

Morrow J.

Serum-free media products.

Gen. Eng. News **1998**, 18, 28-36.

Munzert E., Muthing J., Buntmeyer H. et Lehmann J.

Sialidase activity in culture fluid of Chinese hamster ovary cells during batch culture and its effects on recombinant human antithrombin III integrity.

Biotechnol. Prog. **1996**, 12, 559-63.

Munzert E., Heidemann R., Buntmeyer H., Lehmann J. et Muthing J.

Production of recombinant human antithrombin III on 20-L bioreactor scale : correlation of supernatant neuraminidase activity, desialylation, and decrease of biological activity of recombinant glycoprotein.

Biotechnol. Bioeng. **1997**, 56, 441-448.

Narhi L.O., Arakawa T., Aoki K.H., Elmore R., Rohde M.F., Boone T. et Strickland T.W.

The effect of carbohydrate on the structure and stability of erythropoietin.

J. Biol. Chem. **1991**, 266, 23022-23026.

Newland M., Greenfield P.F. et Reid S.

Hybridoma growth limitations: the roles of energy metabolism and ammonia production.

Cytotechnology **1990**, 3, 215-229.

Nguyen Hong V., Beaugregard G., Potier M., Belisle M., Marnett L., Gatti R. et Durand P.
Studies on the sialidases : properties of human leukocyte neuraminidases.
Biochim. Biophys. Acta **1980**, 616, 259-270.

Nielsen L.K., Smyth G.K. et Mosbach K.
Hemocytometer cell count distributions : implications of non-poisson behavior.
Biotechnol. Prog. **1991**, 7, 560-563.

Nimtz M., Martin W., Wray V., Kloppel K.D., Augustin J. et Conradt H.S.
Structures of sialylated oligosaccharides of human EPO expressed in recombinant BHK-21 cells.
Eur. J. Biochem. **1993**, 213, 39-56.

Nimtz M., Wray V., Rudiger A. et Conradt H.S.
Identification and structural characterization of a mannose-6-phosphate containing oligomannosidic N-glycan from human EPO secreted by recombinant BHK-21 cells.
FEBS Lett. **1995**, 365, 203-208.

Nishi H.
Capillary electrophoresis of drugs : current status in the analysis of pharmaceuticals.
Electrophoresis **1999**, 20, 3237-3258.

Noguchi A., Mukuria C.J., Suzuki E. et Naiki M.
Immunogenicity of N-glycolylneuraminic acid-containing carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in CHO cells.
J. Biochem. **1995**, 117, 59-62.

Nyberg G.B., Balcarcel R.R., Follstad B.D., Stephanopoulos G. et Wang D.I.
Metabolic effects on recombinant interferon- γ glycosylation in continuous culture of CHO cells.
Biotechnol. Bioeng. **1999**, 62, 336-347.

Ohashi H., Miyata M., Ishii Y., Takeuchi M., Takasago A., Suzuki T. et Sudo T.
Purification and characterization of recombinant human erythropoietin expressed in human cervix carcinoma HeLa cells.
Trends Anim. Cell. Culture Technol. **1989**, 1, 115-120.

Okano M., Suga H., Masuda S., Nagao M., Narita H., Ikura K. et Sasaki R.
Characterization of EPO isolated from rat serum : biochemical comparison of rat and human erythropoietins.
Biosci. Biotechnol. Biochem. **1993**, 57, 1882-1885.

Opendakker G., Rudd P.M., Ponting C. P. et Dwek R.A.
Concepts and principles of glycobiologie.
FASEB J. **1993**, 7, 1330-1337.

Osada S., Ebihara I., Setoguchi Y., Takahashi H., Tomino Y., Koide H.
Gene therapy for renal anemia in mice with polycystic kidney using an adenovirus vector encoding the human erythropoietin gene.
Kidney Int. **1999**, 55, 1234-1240.

- Ozturk S. S. et Palsson B.O.
Physiological changes during the adaptation of hybridoma cells to low serum and serum-free media.
Biotechnol. Bioeng. **1991**, 37, 35-46.
- Parekh R.B., Dwek R.A., Thomas J.R., Opdenaker G. et Rademacher T.W.
Cell-type-specific and site-specific N-glycosylation of type I and type II human tissue plasminogen activator.
Biochemistry **1989**, 28, 7644-7662.
- Parekh R.B., Dwek R.A., Rudd P.M., Thomas J.R. et Rademacher T.W.
N-glycosylation and *in vitro* enzymatic activity of human recombinant tissue plasminogen activator expressed in CHO cells and a murine cell line.
Biochemistry **1989**, 28, 7670-7679.
- Parekh R.B. et Patel T.P.
Comparing the glycosylation patterns of recombinant glycoproteins.
Trends Biotechnol. **1992**, 10, 276-280.
- Patel T.P., Parekh, R.B., Moellering B.J. et Prior C.P.
Different culture methods lead to differences in glycosylation of a murine IgG monoclonal antibody.
Biochem. J. **1992**, 285, 839-845.
- Pattison R.N., Swamy J., Mendenhall B., Hwang C. et Frohlich B.T.
Measurement and control of dissolved carbon dioxide in mammalian cell culture processes using an in situ fiber optic chemical sensor.
Biotechnol. Prog. **2000**, 16, 769-774.
- Paulson J.C. et Colley K.J.
Glycosyltransferases.
J. Biol. Chem. **1989**, 264, 17615-17618.
- Peeters K., De Wilde C., De Jaeger G., Angenon G. et Depicker A.
Production of antibodies and antibody fragments in plants.
Vaccine **2001**, 19, 2756-2761.
- Pollock D.P., Kutzko J.P., Birck-Wilson E., Williams J.L., Echelard Y. et Meade H.M.
Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies.
J. Immunol. Methods **1999**, 231, 147-157.
- Potier M., Beauregard G., Belisle M., Mamel L., Hong V.N., Melancon S.B. et Dallaire L.
Neuraminidase activity in the mucopolidoses (types I, II and III) and the cherry-red spot myoclonus syndrome.
Clin. Chim. Acta. **1979**, 99, 97-105.
- Potvin B., Kumar R., Howard D.R., Stanley P.
Transfection of a human α 1,3-fucosyltransferase gene into Chinese hamster ovary cells. Complications arise from activation of endogenous α -1,3-fucosyltransferases.
J. Biol. Chem. **1990**, 265, 1615-22.

- Quelle F.W., Caslake L.F., Burkert R.E. et Wojchowski D.M.
High-level expression and purification of a recombinant human erythropoietin produced using a baculovirus vector.
Blood **1989**, 74, 652-657.
- Qiu J.
Protein expression systems.
Gen. Eng. News **1998**, 18, 17-40.
- Qiu J., Swartz J.R. et Georgiou G.
Expression of active human tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*.
Appl. Environ. Microbiol. **1998**, 64, 4891-4896.
- Recny M.A., Scoble H.A. et Kim Y.
Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin.
J. Biol. Chem. **1987**, 262, 17156-17163.
- Rice K.G., Takahashi N., Namiki Y., Tran A.D., Lisi P.J. et Lee Y.C.
Quantitative mapping of the N-linked sialyloligosaccharides of recombinant EPO : combination of direct high-performance anion-exchange chromatography and 2-aminopyridine derivatization.
Anal. Biochem. **1992**, 206, 278-287.
- Ridder R., Schmitz R., Legay F. et Gram H.
Generation of rabbit monoclonal antibody fragments from a combinatorial phage display library and their production in the yeast *Pichia Pastoris*.
Bio/Technology **1995**, 13, 255-260.
- Robertson E.R. et Kennedy J.F.
Glycoproteins : a consideration of the potential problems and their solutions with respect to purification and characterization.
Bioseparation **1996**, 6, 1-15.
- Romanowski R.R. et Sytkowski A.
The molecular structure of human EPO.
Hematol. Oncol. Clin. North Am. **1994**, 8, 885-894.
- Rush R.S., Derby P.L., Strickland T.W. et Rohde M.F.
Peptide mapping and evaluation of glycopeptide microheterogeneity derived from endoproteinase digestion of EPO by affinity high-performance capillary electrophoresis.
Anal. Chem. **1993**, 65, 1834-1842.
- Rush R.S., Derby P.L., Smith D.M., Merry C., Rogers G., Rhode M.F., Katta V.
Microheterogeneity of EPO carbohydrate structure.
Anal. Chem. **1995**, 67, 1442-1452.
- Ryll T., Valley U. et Wagner R.
Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells.
Biotechnol. Bioeng. **1994**, 184-193.

Ryu D.D.Y. et Nam D.Y.

Recent progress in biomolecular engineering.

Biotechnol. Prog. **2000**, 16, 2-16.

Sasaki H., Bothner B., Dell A. et Fukuda M.

Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in CHO cells by a human erythropoietin cDNA.

J. Biol. Chem. **1987**, 262, 12059-12076.

Sasaki H., Ochi N., Dell A. et Fukuda M.

Site-specific glycosylation of human recombinant erythropoietin : analysis of glycopeptides or peptides at each glycosylation site by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry.

Biochemistry **1988**, 27, 8618-8626.

Saxena A., Ashani Y., Raveh L., Stevenson D., Patel T. et Doctor B.P.

Role of oligosaccharides in the pharmacokinetics of tissue-derived and genetically engineered cholinesterases.

Mol. Pharmacol. **1998**, 53, 112-122.

Schauer R.

Sialic acids as antigenic determinants of complex carbohydrates.

Adv. Exp. Med. Biol. **1988**, 228, 47-72.

Schenerman M.A., Hope J.N., Kletke C., Singh J.K., Kimura R., Tsao E.I. et Folena-Wasserman G.

Comparability testing of a humanized monoclonal antibody (Synagis) to support cell line stability, process validation, and scale-up for manufacturing.

Biologicals **1999**, 27, 203-215.

Schlenke P., Grabenhorst E., Nimtz M. et Conradt H.S.

Construction and characterization of stably transfected BHK-21 cells with human-type sialylation characteristic.

Cytotechnology **1999**, 30, 17-25.

Schneider M., Marison I.W. et von Stockar U.

The importance of ammonia in mammalian cell culture.

J. Biotechnol. **1996**, 46, 161-185.

Schnieke A.E., Kind A.J., Ritchie W.A., Mycock K., Scott A.R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A. et Campbell K.H.

Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts.

Science **1997**, 278, 2130-2133.

Shoemaker C.B. et Mitscock L.D.

Murine erythropoietin gene : cloning, expression, and human gene homology.

Mol. Cell. Biol. **1986**, 6, 849-858.

Sinacore M.S., Charlebois T.S., Harrison S. et Adamson S.R.
CHO DUKX cell lineages preadapted to growth in serum-free suspension culture enable rapid development of cell culture processes for the manufacture of recombinant proteins.
Biotechnol. Bioeng. **1996**, 52, 518-528.

Skibeli V., Nissen-Lie G et Torjesen P.
Sugar profiling proves that human serum EPO differs from recombinant human erythropoietin.
Blood **2001**, 98, 3626-3634.

Spellman M.W.
Carbohydrate characterization of recombinant glycoproteins of pharmaceutical interest.
Anal. Chem. **1990**, 62, 1714-1722.

Spivak J.L. et Hogans B.B.
The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat.
Blood. **1989**, 73, 90-99.

Stanley S.M. et Poljak A.
Matrix-assisted laser-desorption time-of flight ionisation and high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectral analyses of two glycosylated recombinant epoetins.
J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. **2003**, 785, 205-218.

Stark N.J. et Heath E.C.
Glucose-dependent glycosylation of secretory glycoprotein in mouse myeloma cells.
Arch. Biochem. Biophys. **1979**, 192, 599-609.

Storring P.L., Tiplady R.J., Gaines Das R.E., Rafferty B. et Mistry Y.G.
Lectin-binding assays for the isoforms of human EPO: comparison of urinary and four recombinant erythropoietins.
J. Endocrinol. **1996**, 150, 401-412.

Swartz J.R.
Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins.
Curr. Opin. Biotechnol. **2001**, 12, 195-201.

Tahrat-Benslimane H.
Etude cinétique de la production d'une fucosyltransférase soluble et instable par des cellules CHO recombinées : effets de différents paramètres physicochimiques au cours de procédés discontinus et continus.
Thèse de doctorat INPL, Nancy, **2002**.

Takeuchi M., Takasaki S., Miyazaki H., Kato T., Hoshi S., Kochibe N. et Kobata A.
Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant CHO cells.
J. Biol. Chem. **1988**, 263, 3657-3663.

- Takeuchi M., Inoue N., Strikland T.W., Kubota M., Wada M., Shimizu R., Hoshi S., Kozutsumi H., Takasaki S. et Kobata A.
Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1989**, 86, 7819-7822.
- Takeuchi M., Takasaki S., Shimada M. et Kobata A.
Role of sugar chains in the *in vitro* biological activity of human EPO produced in recombinant CHO cells.
J. Biol. Chem. **1990**, 265, 12127-12130.
- Takeuchi M. et Kobata A.
Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins.
Glycobiology **1991**, 1, 337-346.
- Tam R.C., Coleman S.L., Tiplady R.J., Storrington P.L. et Cotes P.M.
Comparisons of human, rat and mouse erythropoietins by isoelectric focusing: differences between serum and urinary erythropoietins.
Br. J. Haematol. **1991**, 79, 504-511.
- Thorens B. et Vassalli P.
Chloroquine and ammonium chloride prevent terminal glycosylation of immunoglobulins in plasma cells without affecting secretion.
Nature **1986**, 321, 618-620.
- Tebbutt S.J.
Technology evaluation: transgenic α -1-antitrypsin (AAT), PPL therapeutics.
Curr. Opin. Mol. Ther. **2000**, 2, 199-204.
- Terashima S., Kamihira M., Ogawa T., Ohno M., Iijima S. et Kobayashi T.
Continuous production of human EPO by immobilized recombinant L929 cells.
J. Ferm. Bioeng. **1994**, 77, 52-56.
- Tomiya, N. ; Betenbaugh, M.J.; Lee, Y.C.
Humanization of lepidopteran insect-cell-produced glycoproteins.
Acc. Chem. Res. **2003**, 36, 613-620.
- Toyoda T., Itai T., Arakawa T., Aoki K.H. et Yamaguchi H.
Stabilization of human recombinant EPO through interactions with the highly branched N-glycans.
J. Biochem. **2000**, 128, 731-737.
- Tran A.D., Park S., Lisi P.J., Huynh O.T., Ryall R.R. et Lane P.A.
Separation of carbohydrate-mediated microheterogeneity of recombinant human erythropoietin by free solution capillary electrophoresis. Effects of pH, buffer type and organic additives.
J. Chromatogr. **1991**, 542, 459-471.
- Tsao E.I., Bohn M.A., Omstead D.R. et Munster M.J.
Optimization of a roller bottle process for the production of recombinant EPO
Ann. N. Y. Acad. Sci. **1992**, 665, 127-136.

Tsuda E., Goto M., Murakami A., Akai K., Ueda M. et Kawanishi G.
Comparative structural study of N-linked oligosaccharides of urinary and recombinant erythropoietins.
Biochemistry **1988**, 27, 5646-5654.

Tsuda E., Kawanishi G., Ueda M., Masuda S. et Sasaki R.
The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin.
Eur. J. Biochem. **1990**, 188, 405-411.

Tsuji J., Noma S., Suzuki J., Okumura K. et Shimizu N.
Specificity of human natural antibody to recombinant tissue-type plasminogen activator (t-PA) expressed in mouse C127 cells.
Chem. Pharm. Bull. **1990**, 38, 765-768.

Urlaub G. et Chasin L.A.
Isolation of CHO cells mutants deficient in dihydrofolate reductase activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. **1980**, 77, 4216-4220.

Utsumi J., Mizuno Y., Hosoi K., Okano K., Sawada R., Kajitani M., Sakai I., Naruto M. et Shimizu H.
Characterization of four different mammalian-cell-derived recombinant human interferon- β 1.
Eur. J. Biochem. **1989**, 181, 545-553.

Valley U., Nimtz M., Conradt H.S. et Wagner R.
Incorporation of ammonium into intracellular UDP-activated N-acetylhexosamines and into carbohydrate structures in glycoproteins.
Biotechnol. Bioeng. **1999**, 64, 401-417.

Verbert A.
La glycosylation des protéines recombinantes.
Biofutur **1993**, 125, 40-43.

Wagner A.
Production de PUK par des cellules humaines tumorales cultivées en bioréacteurs discontinues et perfusés : cinétiques, physiologie et modélisation.
Thèse de doctorat INPL, Nancy, **1990**.

Wang M.D., Yang M., Huzel N. et Butler M.
Erythropoietin production from CHO cells grown by continuous culture in a fluidized-bed bioreactor.
Biotechnol. Bioeng. **2002**, 77, 194-203.

Warner T.G., Chang J., Ferrari J., Harris R., McNerney T., Bennett G., Burnier J. et Sliwkowski M.B.
Isolation and properties of a soluble sialidase from the culture fluid of CHO cells.
Glycobiology **1993**, 3, 455-463.

Wasley L.C., Timony G., Murtha P., Stoudemire J., Dorner A.J., Caro J., Krieger M. et Kaufman R.

The importance of N- and O-linked oligosaccharides for the biosynthesis and *in vitro* and *in vivo* biologic activities of erythropoietin.

Blood **1991**, 77, 2624-2632.

Watson E. et Yao F.

Capillary electrophoretic separation of human recombinant EPO glycoforms.

Anal. Biochem. **1993**, 210, 389-393.

Watson E., Bhide A. et van Halbeek H.

Structure determination of the intact major sialylated oligosaccharide chains of recombinant human erythropoietin expressed in CHO cells.

Glycobiology **1994**, 4, 227-237.

Weikert S., Papac D., Briggs J., Cowfer D., Tom S., Gawlitzek M., Lofgren J., Metha S., Chrisholm V., Modi N., Eppler S., Carroll K., Chamow S., Peers D., Berman P. et Krumm L.

Engineering CHO cells to maximize sialic acid content of recombinant glycoproteins.

Nat. Biotechnol. **1999**, 17, 1116-1121.

Werner R.G.

Innovative and economic potential of mammalian cell culture.

Arzneim. Forsch./Drug Res. **1998**, 48, 423-426.

Werner R.G., Noe W., Kopp K. et Schluter M.

Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals.

Arzneim. Forsch./Drug Res. **1998**, 48, 870-880.

Wimmer K., Harant H., Reiter M., Bluml G., Gaida T. et Katinger H.

Two-dimensional gel electrophoresis for controlling and comparing culture supernatants of mammalian cell culture productions systems.

Cytotechnology **1994**, 16, 137-146.

Wojchowski D.M., Orkin S.H. et Sytkowski J.

Active human EPO expressed in insect cells using a baculovirus vector : a role for N-linked oligosaccharide.

Biochim. Biophys. Acta **1987**, 910, 224-232.

Wojchowski D.M., Sue J. et Sytkowski J.

Site-specific antibodies to human erythropoietin : immunocaffinity purification of urinary and recombinant hormone.

Biochim. Biophys. Acta **1987**, 913, 170-178.

Wyss D.F. et Wagner G.

The structural role of sugars in glycoproteins.

Curr. Opin. Biotechnol. **1996**, 7, 409-416.

Xie L. et Wang D.I.C.

Applications of improved stoichiometric model in medium design and fed-batch cultivation of animal cells in bioreactor.

Cytotechnology **1994**, 15, 17-29.

Xie L., Nyberg G., Gu X., Li H., Mollborn F. et Wang D.I.C.

Gamma-IFN production and quality in stoichiometric fed-batch cultures of CHO cells under serum-free conditions.

Biotechnol. Bioeng. **1997**, 56, 577-582.

Yamaguchi K., Akai K., Kawanishi G., Ueda M., Masuda S. et Sasaki R.

Effects of site-directed removal of N-glycosylation sites in human EPO on its production and biological properties.

J. Biol. Chem. **1991**, 266, 20434-20439.

Yamauchi T., Asakura E., Amatsuji Y., Uno S., Furuta R., Tujikawa M et Tanabe T.

Production of human AT-III in a serum-free culture of CHO cells.

Biosci. Biotech. Biochem. **1992**, 56, 600-604.

Yang M. et Butler M.

Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production and glycosylation.

Biotechnol. Bioeng. **2000**, 68, 370-380.

Yang M. et Butler M.

Effect of ammonia on the glycosylation of human recombinant erythropoietin in culture.

Biotechnol. Prog. **2000**, 16, 751-759.

Yang M. et Butler M.

Enhanced erythropoietin in a CHO culture is caused by proteolytic degradation and can be eliminated by a high glutamine level.

Cytotechnology **2000**, 34, 83-89.

Yang M. et Butler M.

Effects of ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms.

Biotechnol. Prog. **2002**, 18, 129-138.

Yanagi H., Yoshima T., Ogawa I. et Okamoto M.

Recombinant human EPO produced by Namalwa cells.

DNA **1989**, 8, 419-427.

Yoon S.K., Song J.Y et Lee G.M.

Effect of low temperature on specific productivity, transcription level and heterogeneity of erythropoietin in CHO cells.

Biotechnol. Bioeng. **2003**, 82, 289-298.

Yoshida H., Mizutani S. et Ikenaga H.

Continuous production of EPO using a radial flow bioreactor.

In : *Animal Cell Culture and Production of Biologicals* (Sasaki R. et Ikura K. Eds.), Kluwer Academic Publishers, **1991**, 329-334.

Yu H.K, Choi S.K., Lee Y.S., Shin K.S., Hwang H.K. et Lee H.Y.

Kinetics of cultivating mammalian cells in fed-batch process for the production of EPO.

Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **1991**, 19, 504-508.

Zanette D., Soffientini A., Sottani C. et Sarubbi E.
Evaluation of phenylboronate agarose for industrial-scale purification of erythropoietin from mammalian cell cultures.

J. Biotechnol. **2003**, 101, 275-287.

Zang M., Trautmann H., Gandor C., Messi F., Asselbergs F., Leist C., Fiechter A. et Reiser J.
Production of recombinant proteins in CHO cells using a protein-free cell culture medium.

Biotechnology **1995**, 13, 389-392.

Zhang J. et Wang D.I.C.

Quantitative analysis and process monitoring of site-specific glycosylation microheterogeneity in recombinant human interferon- γ from CHO cell culture by hydrophilic interaction chromatography.

J. Chromatogr. B **1998**, 712, 73-82.

Zhang, F.; Murhammer, D.W.; Linhardt, R.J.

Enzyme kinetics and glycan structural characterization of secreted alkaline phosphatase prepared using the baculovirus expression vector system.

Appl. Biochem. Biotechnol. **2002**, 101, 197-210.

Zhang, F.; Saarinen M.A.; Itle, L.J.; Lang S.C.; Murhammer, D.W.; Linhardt, R.J.

The effect of dissolved oxygen (DO) concentration on the glycosylation of recombinant protein produced by the insect cell-baculovirus expression system.

Biotechnol. Bioeng. **2002**, 77, 219-224.

Zanghi J.A., Mendoza T.P., Schmelzer A.E., Knop R.H. et Miller W.M.

Role of nucleotide sugar pools in the inhibition of NCAM polysialylation by ammonia.

Biotechnol. Prog. **1998**, 14, 834-844.

Zanghi J.A., Mendoza T.P., Knop R.H. et Miller W.M.

Ammonia inhibits neural cell adhesion molecule polysialylation in Chinese hamster ovary and small cell lung cancer cells.

J. Cell. Physiol. **1998**, 177, 248-263.

Zhou G.H., Luo G.A., Zhou Y., Zhou K.Y., Zhang X.D., Huang L.Q.

Application of capillary electrophoresis, liquid chromatography, electrospray – mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight – mass spectrometry to the characterization of recombinant human erythropoietin.

Electrophoresis **1998**, 19, 2348-2355.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame Nicole **KESSLER**, Professeur, Faculté de Médecine Grange Blanche, Université de Lyon
Madame Anne **HARDUIN-LEPERS**, Chargée de Recherche, LCB, Université des sciences de Lille

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur LE FLOCH François

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

« Production et glycosylation d'EPO par cellules CHO : caractérisation par
électrophorèse capillaire au cours de procédés discontinus »

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDOEUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés biotechnologiques et alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 10 octobre 2003

Le Président de l'IN.P.L.

L. SCHUFFENECKER



Résumé : Ce travail a pour objectif d'améliorer la maîtrise de la glycosylation des protéines recombinantes produites par culture de cellules animales, ceci par l'étude de l'influence du procédé de culture sur la structure glycanique d'une protéine modèle : l'érythropoïétine (EPO) produite par cellules CHO.

La construction du système d'étude a d'abord nécessité plusieurs étapes : la génération d'un clone CHO producteur d'EPO performant, la mise au point d'une méthode de purification de la protéine par immuno-affinité et l'adaptation d'une technique d'analyse de la glycosylation aux contraintes de notre système. Deux paramètres particuliers du procédé de culture ont donc été plus précisément étudiés au cours de ce travail : l'avancement de la culture et la présence de sérum dans le milieu.

L'étude du suivi de la glycosylation de l'EPO en cours de culture discontinue avec sérum a mis en évidence une désialylation progressive de la protéine durant la deuxième partie de la culture, de même qu'une lyse cellulaire importante. Une activité sialidasique significative ayant également été observée simultanément, une dégradation enzymatique faisant suite à la lyse cellulaire semble être à l'origine de ce phénomène en présence de sérum.

Après adaptation des cellules au milieu sans sérum, la désialylation de l'EPO s'est par contre révélée stable tout au long des cultures réalisées en l'absence de sérum. L'étude de la glycosylation de l'EPO produite en présence de sérum par des cellules adaptées à la culture sans sérum a montré que la désialylation de l'EPO était directement liée à la présence de sérum, et non à la procédure d'adaptation des cellules au milieu sans sérum.

En conclusion, cette étude a mis en évidence l'influence significative que pouvait avoir certains paramètres du procédé de culture sur la qualité de l'EPO produite par notre système.

Abstract : The scope of this work is to improve the control of the glycosylation of recombinant proteins produced by animal cell culture by studying the influence of the culture process on the glycan structure of a model protein : CHO cell produced EPO.

For building the system, several step were necessary : the generation of a high-EPO-producer CHO cell clone, the set-up of an immuno-affinity purification method and the adaptation of a technique for analysis of protein glycosylation to our system constraints. Then, two parameters of the culture process were studied more precisely : the culture time and the presence of serum.

By monitoring EPO glycosylation in the course of serum-containing batch cultures, we observed a progressive desialylation of the protein during the second part of the culture and an important cell lysis. Since a significative sialidase activity was also found in the same time, this phenomenon seemed to be induced by an enzymatic degradation following cell lysis in serum-containing cultures.

On the other hand, after serum-free adaptation, EPO sialylation was found constant during the whole serum-free cultures. Analysis of EPO glycosylation produced in serum-containing medium by serum-free adapted cells showed that the occurring desialylation was directly linked to the presence of serum and not to the serum-free adaptation procedure.

To conclude, this work clearly shows the important influence of some process parameters on the quality of EPO when produced in our system.

