

Titre: Surexpression de la glucose-6-phosphate déshydrogénase pour l'étude du métabolisme primaire de cellules de mammifères en mode cuvée
Title:

Auteur: Edwige Arnold
Author:

Date: 2015

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Arnold, E. (2015). Surexpression de la glucose-6-phosphate déshydrogénase pour l'étude du métabolisme primaire de cellules de mammifères en mode cuvée
Citation: [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
<https://publications.polymtl.ca/1851/>

Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/1851/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Mario Jolicoeur
Advisors:

Programme: Génie chimique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

SUREXPRESSION DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DÉSHYDROGÉNASE
POUR L'ÉTUDE DU MÉTABOLISME PRIMAIRE DE CELLULES DE
MAMMIFÈRES EN MODE CUVÉE

EDWIGE ARNOLD

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)
AOÛT 2015

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

SUREXPRESSION DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DÉSHYDROGÉNASE
POUR L'ÉTUDE DU MÉTABOLISME PRIMAIRE DE CELLULES DE
MAMMIFÈRES EN MODE CUVÉE

présenté par : ARNOLD Edwige

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. HENRY Olivier, Ph. D., président

M. JOLICOEUR Mario, Ph. D., membre et directeur de recherche

Mme HOEMANN Caroline, Ph. D., membre

DÉDICACE

«To see a World in a Grain of Sand

And a Heaven in a Wild Flower,

Hold Infinity in the palm of your hand

And Eternity in one hour.»

William Blake

REMERCIEMENTS

Je souhaite dans un premier temps remercier mon directeur de maîtrise, le Professeur Mario Jolicoeur, tant sur les plans professionnel qu'humain, pour m'avoir fait confiance tout au long du projet et prodigué des conseils avisés. Je le remercie également pour m'avoir permis d'avoir mes premières expériences d'enseignement. Merci à Ines pour avoir initié ce projet avec moi et m'avoir formée. A vous deux, vous avez réussi à me donner le goût de la culture cellulaire.

Je remercie tous les partenaires sans qui ce projet n'aurait pas été possible : Dr. Patrick Benoist et Dr. Patrick Daoust de Viropro International Inc. pour les cellules CHO-HP, Dr. Yves Durocher de l'IRB pour les cellules HEK, le réseau Mabnet pour les cellules CHO-EG2, Dr. Sachin A. Gupte pour le plasmide. Je suis reconnaissante envers l'École Centrale de Marseille pour m'avoir donné la possibilité de poursuivre mes études à l'étranger; cette expérience est certainement une des plus enrichissantes et bénéfiques de ma vie.

Un grand merci à tous les étudiants, et amis du laboratoire, ça aurait été ben moins l'fun sans vous. Du coup, je remercie Julien quoi, pour avoir bien trop secoué sa lunch box à côté de mon oreille et ses prévisions météo en chinois, merci à Xiaojie et Xinhe pour les dits cours de chinois. Merci à Anaïs et Cécile pour les conversations féministes, à Kahina pour les soirées grasses, à Yuan pour les parties de badminton, à Adrien pour la MAD JAK, à Charles, Sam, Fred, Éric, Benoît, Olga, Aldo, Pauline, Nesrine, July, Guillaume, Cyril, Sofia, Zhihui, Prajwal, Mengjiao, Florian, Adeline, Laurence et Mayssa pour leurs sourires et toutes les conversations et soirées partagées. Une attention particulière pour Jingkui, tant pour son support technique que sa bonne humeur et pour Christian, le meilleur agent de sécurité ever. À Jean-Sébastien et Jasmin que j'ai eu le plaisir de superviser lors de leurs stages, j'espère que votre expérience a été aussi enrichissante que la mienne.

Enfin, ces dernières lignes vont directement à ma famille, mes amis et à Sylvain. Merci d'avoir rendu ces moments enrichissants. Merci à Sylvain pour son soutien inégalable (et pour m'avoir supportée!), j'espère que tu le feras encore longtemps. Une pensée pour la petite Tiny qui m'attend en miaulant derrière la porte tous les soirs.

À vous, à nous!

RÉSUMÉ

Les cellules de mammifères sont l'hôte privilégié pour la production de protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique, et parmi elles, les cellules CHO qui dominent le marché et les cellules HEK qui connaissent un regain d'intérêt. Même si elles présentent l'avantage de performer les modifications post-traductionnelles appropriées pour la compatibilité des molécules avec l'être humain, les coûts de production demeurent important devant la demande croissante. De plus, ces cellules présentent un métabolisme lent et n'atteignent pas des densités cellulaires aussi élevées comparé aux microorganismes. De nombreuses améliorations ont été obtenues grâce à l'optimisation des milieux de culture et stratégies de culture, l'amélioration des lignées, et plus récemment l'essor des études sur le métabolisme cellulaire. L'identification des limitations du métabolisme a permis d'orienter les stratégies d'ingénierie des lignées, notamment pour limiter l'effet des sous-produits toxiques de culture ou l'activation des voies apoptotiques. Récemment, des études ont montré un changement de métabolisme entre la phase de croissance et la phase de production. En phase exponentielle, la majorité des flux sont dirigés vers la glycolyse alors que le pic de production correspond à une activité majoritaire des branches oxydatives comme le cycle des acides tricarboxyliques et la voie des pentoses phosphates. C'est dans ce cadre que s'inscrit le présent projet qui consiste en la redirection des flux métaboliques vers la voie des pentoses phosphates. En accord avec les prévisions d'un modèle métabolique disponible dans notre laboratoire, il a été supposé qu'une augmentation de l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase, première enzyme de la voie, permettrait de rediriger les flux vers la voie des pentoses phosphates et de soulager la charge métabolique imposée par la production de protéines recombinantes. Cette enzyme a donc été transfectée de manière transitoire dans des cellules HEK293, une lignée parentale et une lignée dérivée exprimant la pyruvate carboxylase, et des cellules CHO afin d'observer son effet sur la production de protéines et la croissance cellulaire en mode cuvée. Les résultats en termes de croissance cellulaire, viabilité, production de protéines et concentrations de métabolites intracellulaires comme extracellulaires ont révélé la robustesse du métabolisme de ces cellules face à la perturbation étudiée. En revanche, les signatures métaboliques des deux lignées cellulaires HEK293 sont très caractéristiques, en raison des changements importants apportés par la pyruvate carboxylase.

ABSTRACT

Mammalian cells are the preferred host for the production of recombinant proteins of therapeutic interest. Among them, CHO cells are prevailing on the market and HEK are raising interest. Even if they possess the advantage of performing appropriate post-translational modifications for human compatibility of those molecules, production costs are still inhibitory regarding the growing demand. Moreover, mammalian cells possess a slow metabolism and can't reach high cell densities compared to what is observed in microorganisms. Numerous significant improvements have been made thanks to media and culture strategies optimization, cell lines improvement, and more recently the advances in cell metabolism studies. The identification of metabolism bottlenecks allowed to guide cell line engineering, especially to avoid toxic effects of metabolic by-products or activation of pro-apoptotic signals. Recently, studies have shown a metabolic switch between growth phase and production phase. In exponential phase, most of the flux are routed towards glycolysis. However, pic protein production was associated with an elevated oxidative metabolism in the TCA cycle and the pentose phosphate pathway. Given that, the present work aims at redirecting metabolic fluxes through the pentose phosphate pathway. According to a predictive metabolic model developed in our laboratory, we hypothesized that an increase in glucose-6-phosphate dehydrogenase – the first enzyme in the pathway- activity could reroute the fluxes and alleviate the metabolic burden imposed by recombinant protein secretion. This enzyme was thus transiently transfected in two HEK293 cell lines, the parental cells and the derived cell line stably expressing pyruvate carboxylase, and CHO cells in order to assess its effect on protein production and cell growth in batch mode. The results, in terms of growth, viability, recombinant protein production, and the concentrations of intra- and extracellular metabolites demonstrated the robustness of these cells regarding the perturbation studied in this work. However, metabolic signatures of the two HEK293 cell lines are really characteristic of the changes brought by the expression of pyruvate carboxylase in one of the cell lines.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIV
LISTE DES ANNEXES.....	XVIII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE.....	5
2.1 L'importance des cellules de mammifères en tant que plateforme de production.....	5
2.1.1 Généralités.....	5
2.1.2 Modifications post-traductionnelles.....	8
2.1.3 Conditions et modes de culture	11
2.1.4 Milieux de culture	13
2.1.5 Métabolisme	15
2.1.5.1 Glycolyse.....	17
2.1.5.2 Voie des pentoses phosphates	17
2.1.5.3 Cycle des acides tricarboxyliques	19
2.1.5.4 Énergétique.....	20
2.2 Ingénierie cellulaire et stratégies de culture pour l'augmentation de la production	21
2.2.1 Systèmes d'expression inductibles.....	21

2.2.2 Stratégies anti-apoptose.....	23
2.2.3 Diminuer l'accumulation de déchets toxiques	26
2.2.4 Modélisation du métabolisme	29
2.2.5 Analyses des flux métaboliques	34
2.2.6 Le rôle et l'intérêt de la G6PDH	37
2.3 Transfection.....	45
2.3.1 Transfection transitoire vs lignée stable	45
2.3.2 Différentes méthodes.....	46
2.3.3 Facteurs influençant la transfection au PEI.....	48
2.3.4 Sélection des clones	50
CHAPITRE 3 MATÉRIEL ET MÉTHODES	55
3.1 Lignées cellulaires et conditions de culture	55
3.1.1 CHO-HP	55
3.1.2 CHO-EG2.....	55
3.1.3 HEK293.....	55
3.1.4 Conditions de culture	56
3.1.5 Adaptation des cellules à un nouveau milieu de culture	56
3.1.6 Congélation et décongélation des cellules	57
3.2 Transfection.....	57
3.2.1 Plasmides.....	57
3.2.2 Transfection au PEI	58
3.2.3 Suivi de la transfection.....	58
3.2.4 FACS.....	59
3.3 Analyses	59

3.3.1	Comptes cellulaires et viabilité	59
3.3.2	Détermination des concentrations en glucose, glutamine, lactate, glutamate	59
3.3.3	Test ELISA pour la quantification des protéines produites	59
3.3.4	Western Blot.....	60
3.3.5	Activité de la G6PDH	61
3.3.6	Analyse métabolomique.....	61
3.3.6.1	Extraction des métabolites	61
3.3.6.2	Concentrations en nucléotides et en molécules redox intracellulaires	61
3.3.6.3	Concentrations en acides organiques et glucides phosphatés intracellulaires....	62
3.3.6.4	Concentrations en acides aminés extracellulaires	63
3.3.6.5	Concentration en ions extracellulaires	63
CHAPITRE 4	ARTICLE 1 : OVEREXPRESSION OF G6PDH DOES NOT ENHANCE THE BEHAVIOR OF HEK-293 CLONES STABLY EXPRESSING INTERFERON-A2B	64
4.1	Présentation de l'article	64
4.2	Auteurs	65
4.3	Abstract	66
4.4	Introduction	67
4.5	Materials and Methods	68
4.6	Results and discussion.....	71
4.7	Conclusions	84
4.8	Acknowledgements	85
4.9	References	85
CHAPITRE 5	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	89
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	96
BIBLIOGRAPHIE	99

ANNEXES	114
---------------	-----

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Équation d'activation et d'inhibition des enzymes (Robitaille, 2015)	31
Tableau 2 Équations du taux spécifique de croissance (Robitaille, 2015).....	31
Tableau 3 Récapitulatif des études liées à la G6PDH.....	42
Tableau 4 : Cell specific consumption/production rates during exponential phase.	75

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1: Schéma d'un anticorps (Alberts et al., 2004)	8
Figure 2-2: Différents modes de culture (Birch & Racher, 2006)	13
Figure 2-3 : Régulation des flux métaboliques par les métabolites (Wegner et al., 2015)	16
Figure 2-4: Glycolyse et voie des pentoses phosphate.....	18
Figure 2-5: Cycle des acides tricarboxyliques	19
Figure 2-6: Phosphorylation oxydative (Ho et al., 2012).....	21
Figure 2-7: Systèmes inductibles au cumate (Bruno Gaillet et al., 2010).....	23
Figure 2-8: Voies menant à l'apoptose (Arden & Betenbaugh, 2004).....	25
Figure 2-9: Représentation du modèle métabolique (Ghorbaniaghdam et al., 2014a)	33
Figure 2-10: Augmentation de la production d'anticorps simulée avec le modèle métabolique pour la G6PDH/6PGD (à gauche : production en fonction du temps pour différents v_{max} , à droite : titre maximal en fonction du v_{max}) (N Pham, 2013)	34
Figure 2-11: Aperçu schématique de l'analyse de flux basée sur le marquage au ^{13}C (Sauer, 2006)	36
Figure 2-12: Mécanisme de polyfection (Jin et al., 2014)	48
Figure 2-13: Principe de la cytométrie en flux (Department of Biology Davidson College)	54
Figure 3-1: Cartes de restriction et sites de clonage multiple des plasmides (pDsRed-Monomer-N1 à gauche, pDsRed1-N1 à droite) (Clontech Laboratories, Inc., USA)	58
Figure 4-1: Fluorescence microscopy of transfected cells 48 h and 72 h post-transfection. C+ stands for cells transfected with empty plasmid (max. excitation/emission at 557/592 nm) and T for cells transfected with fusionned DsRed-G6PDH (558/583 nm) (A) and western blot analysis of G6PDH expression. C stands for the control (non-transfected), C+ for cells transfected with empty plasmid, and T for cells transfected with G6PDH (B).	72
Figure 4-2 : G6PDH, 6PGDH and total (G6PDH + 6PGDH) activities in PYC expressing (293-F5) at 48 h post-transfection (A) and 72 h post-transfection (C) and parental cells (293-D9)	

cells at 48 h post-transfection (B) and 72 h post-transfection (D). Error bars are standard error of the mean. U is defined as the amount of enzyme that will catalyse the conversion of 1 umol of substrate per minute.....	73
Figure 4-3 : Viable cell (A), viability (B), glucose (C), lactate (D), glutamine (E) and ammonia (F) concentration profiles during batch cultivation in shake flasks of parental (293-D9) and PYC expressing (293-F5) cells. Error bars are standard error of the mean.	74
Figure 4-4 : Recombinant interferon titers. Same legend as in Figure 4 applies.	76
Figure 4-5 : Major energetic and redox intracellular components ratios post-transfection. NADH/NAD ⁺ (A), NADPH/NADP ⁺ (B), ATP/ADP (C) and ATP/ADP (D). Same legend as in Figure 4 applies.	77
Figure 4-6 : Intracellular nucleotides concentrations post-transfection. NAD ⁺ (A), NADH (B), NADP ⁺ (C), NADPH (D), CTP (E), GTP (F), UTP (G), UDPG (H), ATP (I), ADP (J) and AMP (K). Same legend as in Figure 4 applies.....	79
Figure 4-7 : Major intracellular metabolites concentrations post-transfection. Pyruvate (A), Malic acid (B), Glycerol 3-phosphate (C), Succinic acid (D), Glucose-6-phosphate (E), Glyceraldehyde-3-phosphate (GA3P) & Dihydroxyacetone phosphate (DHAP) (F), Fumaric acid (G) and Alpha-ketoglutarate (H). Same legend as in Figure 4 applies.....	82
Figure 4-8 : Extracellular amino acids concentrations during batch culture. Threonine (A), Isoleucine (B), Leucine (C), Methionine (D), Tyrosine (E), Valine (F), Proline (G), Alanine (H), Glycine (I), Serine (J), Glutamate (K), Asparagine (L), Aspartic acid (M), Arginine (N), Lysine (O), Histidine (P) and Phénylalanine (Q). Same legend as in Figure 4 applies.	83
Figure 4-9 : Comparison of amino acids utilization (from 0 and 166 h). Positive values indicate production.....	84

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

μ	Taux de croissance
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
Ala	Alanine
AMP	Adénosine monophosphate
Arg	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
Asn	Asparagine
Asp	Acide aspartique
ATP	Adénosine triphosphate
BHK	<i>Baby hamster kidney</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
DHFR	Dihydrofolate réductase
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	<i>Antigen-binding fragments</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FAD	Flavine adenine dinucleotide (quinone)
FADD	<i>Fast-associated death domain</i>
FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide (hydroquinone)
Fc	<i>Fragments crystallizable region</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

G6P	Glucose-6-phosphate
G6PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GA3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
GDP	Guanosine diphosphate
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Glc	Glucose
Gln	Glutamine
GLNase	Glutaminase
Glt ou Glu	Glutamate
GLUT	Transporteur du glucose
Gly	Glycine
Gly3P	Glycérol-3-phosphate
GS	Glutamine synthétase
GTP	Guanosine triphosphate
h	Heures
HC	<i>Heavy chain</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HEK293-D9	Lignée parentale utilisée dans ce travail
HEK293-F5	Lignée exprimant la pyruvate carboxylase utilisée dans ce travail
His	Histidine
HP	<i>High producer</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IFN	Interféron
IgG	Immunoglobuline G

Ile	Isoleucine
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
Lac	Lactate
LC	<i>Light chain</i>
LDH	Lactate déshydrogénase
Leu	Leucine
Lys	Lysine
mAb	Anticorps monoclonal
MCA	<i>Metabolic control analysis</i>
Met	Méthionine
MFA	<i>Metabolic flux analysis</i>
MFBA	<i>Metabolic flux balance analysis</i>
MTS	Méthionine sulfoximine
MTX	Méthotrexate
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (réduite)
NADP ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (réduite)
6PGD ou 6PGDH	6-phosphogluconate déshydrogénase
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEI	Polyéthylène imine
Phe	Phénylalanine
PKA	Protéine kinase A
PPP	<i>Pentose Phosphate Pathway</i>

Pro	Proline
PYC, PYC2	Pyruvate carboxylase
q	Taux spécifique de production/consommation
R5P	Ribose-5-phosphate
rcTA	<i>Reverse cimate transactivator</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SEAP	<i>Protein-secreted alkaline phosphatase</i>
Ser	Serine
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
t	Temps
TCA	Cycle des acides tricarboxyliques
Thr	Thréonine
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Tyr	Tyrosine
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
Val	Valine
V _H	Domaine variable de la chaîne lourde HC
V _L	Domaine variable de la chaîne légère LC
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 Résultats de surexpression de la G6PDH sur les HEK293 avec transfection à 24h et deux ratios PEI/ADN différents	114
Annexe 2 Résultats de surexpression de la G6PDH sur les CHO-HP en plaque 6-puits.....	118
Annexe 3 Résultats de surexpression de la G6PDH sur les CHO-EG2 en plaque 6-puits	120
Annexe 4 Résultats de surexpression de la G6PDH sur les CHO-HP en flacons agités.....	122
Annexe 5 Résultats de surexpression de la G6PDH sur les CHO-HP en flacons agités après FACS.....	124

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

La demande pour les protéines recombinantes ne cesse d'augmenter, notamment en raison de leur intérêt pour traiter les cancers et maladies auto-immunes. Ces molécules sont produites majoritairement via des plateformes cellulaires animales. Les cellules de mammifères présentent en effet l'avantage d'effectuer les modifications post-traductionnelles appropriées (Bailey & Ollis, 1986). Les cellules d'ovaires de hamster chinois sont les cellules les plus utilisées pour la production de protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique (M. Butler, 2004), représentant à elles seules environ 60% du marché global (Ahn & Antoniewicz, 2012). Mais les cellules HEK293 connaissent un regain d'intérêt car elles sont d'origine humaine, ceci permettant d'obtenir une glycosylation très similaire à celle de l'homme, facilement transfectables et cultivables en suspension (Baldi et al., 2005; Durocher et al., 2007). La production à grande échelle se fait majoritairement en cuvée alimentée (Neil Templeton et al., 2013), où des nutriments sont ajoutés périodiquement pour étendre la culture et la production (Bailey & Ollis, 1986; M. Butler, 2004). L'augmentation de la quantité de protéines produites via les bioprocédés est un objectif majeur de l'industrie. En effet, l'enjeu économique est très important car ces molécules complexes ne peuvent être synthétisées chimiquement ou par d'autres voies, et les doses requises pour certains traitements sont importantes.

La problématique du taux de production n'est pas nouvelle. On peut chiffrer la production d'une lignée de CHO fortement productrice d'IgG à 40 pg/cell.jour (Gargi Seth et al., 2006). L'accumulation de sous-produits, comme le lactate et l'ion ammonium, nuit à la culture tant sur la croissance que la production (Ahn & Antoniewicz, 2011; Gargi Seth et al., 2006), et leur minimisation est un des objectifs principaux de l'industrie. Les études se sont attachées à optimiser le milieu de culture, les conditions de culture telles que le pH et la température, à modifier le métabolisme des lignées, à proposer des stratégies de cuvée alimentée adaptées (Costa et al., 2010; Stefanie Dietmair et al., 2011). De grandes avancées ont déjà été opérées et des titres de l'ordre de 5-10 g/L sont désormais reportés (Birch & Racher, 2006; JY Kim et al., 2012). (Elias et al., 2003; Henry & Durocher, 2011) ont déjà publié l'amélioration d'une lignée HEK293 en lui faisant exprimer la pyruvate carboxylase, menant à une baisse de la production de lactate et en ion ammonium avec une densité cellulaire augmentée. D'autres stratégies comme la sous-expression de la lactate déshydrogénase ont été utilisées avec succès (SH Kim & Lee,

2007). Il est de plus bien connu que la production de protéines recombinantes impose une charge métabolique supplémentaire sur la cellule hôte, très demandeuse en énergie et en intermédiaires métabolites pour les voies de synthèse cellulaires (Klein et al., 2015). L'optimisation d'un bioprocédé est donc très complexe et doit, pour l'instant, être faite au cas par cas tant il y a d'éléments à prendre en compte ainsi qu'il y a d'interactions synergétiques entre eux. Cette optimisation passe par la recherche d'outils permettant de guider l'ingénierie des cellules et des procédés.

Avec l'essor de l'analyse des flux métaboliques, nous disposons d'un outil de poids pour l'optimisation de la production. Les flux dans les diverses voies du carbone central ne sont pas constants et passent par plusieurs phases. Les études récentes sur des lignées de CHO en cuvée alimentée ont identifié les voies métaboliques prédominantes lors des différentes phases de la culture. Un parallèle a été établi entre le pic de production de protéines et un changement vers un fort état oxydatif, notamment dans la voie des pentoses-phosphates (PPP) (Ahn & Antoniewicz, 2011; Sengupta et al., 2011; Neil Templeton et al., 2013). Cette voie métabolique comporte une phase oxydative mettant en jeu plusieurs enzymes, dont la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), et fournit la cellule en NADPH, navette d'électrons pour les réactions de biosynthèse dans la cellule. La voie des pentoses aboutit également à la formation de ribose-5-phosphate et d'érythrose-4-phosphate qui sont requis pour la synthèse des nucléotides et acides aminés. L'utilisation du NADPH lors du changement vers l'état oxydatif de la phase de production augmente soit pour lutter contre le stress oxydatif, soit pour fabriquer des biomolécules (Sengupta et al., 2011). L'importance de la G6PDH a déjà été largement étudiée en regard de son implication dans la croissance cellulaire et la lutte contre le stress oxydatif (Pandolfi et al., 1995; W-N Tian et al., 1998; Ursini et al., 1997; Zhang et al., 2012). Sa surexpression en vue d'augmenter la production dans des études sur les bactéries et les levures a déjà été utilisée (Fang et al., 2013; Kwon et al., 2006). Finalement, des études *in silico* (résultats non publiés du laboratoire du Prof. Mario Jolicoeur), générées à l'aide d'un modèle métabolique dynamique développé pour les cellules CHO (Ghorbaniaghdam et al., 2014a), ont supporté l'hypothèse de l'effet positif de la surexpression de la G6PDH sur la productivité en une protéine recombinante. Aussi, à notre connaissance, forcer les flux métaboliques vers la voie des pentoses phosphates afin d'augmenter la production de protéines n'a pas encore été testé sur les cellules de mammifères. Ce projet consiste donc en la redirection des flux métaboliques vers la voie des

pentoses-phosphates, via la surexpression de la première enzyme de cette voie, à savoir la glucose-6-phosphate déshydrogénase. Pour cela, il faut insérer dans les cellules du matériel génétique codant pour cette enzyme et la leur faire exprimer.

Objectifs

Le principal objectif de ce projet de maîtrise a été de rediriger les flux métaboliques vers la voie des pentoses phosphates par surexpression de la glucose-6-phosphate déshydrogénase, afin de maximiser la production, la croissance et la viabilité des lignées principales de cellules de mammifères, soit les cellules CHO et HEK293, dont une lignée exprimant la pyruvate carboxylase. Pour ce faire, plusieurs objectifs spécifiques ont été formulés :

- Développer un protocole de transfection transitoire afin de surexprimer la glucose-6-phosphate déshydrogénase, enzyme limitante de la PPP, afin d'augmenter les flux vers cette voie;
- Analyser quantitativement l'effet de cette modification sur la production, la croissance, la viabilité, l'activité de la G6PDH, les nutriments et métabolites extra- et intracellulaires;
- Améliorer les connaissances métaboliques sur la régulation de la voie des PPP et le métabolisme central en condition de surcharge métabolique par la production de protéines recombinantes chez les cellules hôtes
- Analyser les différences métaboliques dues à l'expression de la pyruvate carboxylase dans les deux lignées HEK293 affiliées

Organisation du mémoire

Ce mémoire est divisé en quatre chapitres, à savoir une revue de littérature, le matériel et méthodes, les résultats principaux regroupés en un manuscrit soumis à un journal scientifique puis une discussion générale. Le premier chapitre abordera des thèmes généraux répondant aux questions pourquoi et comment utiliser des cellules de mammifères pour la production de protéines recombinantes, et couvrira le métabolisme central de ces cellules. Des thèmes plus

inhérents au projet seront ensuite abordés, comme la voie métabolique d'intérêt et les travaux qui y sont reliés, ainsi que les moyens pour rediriger les flux métaboliques vers cette voie. Le second chapitre rapporte l'ensemble des techniques et lignées cellulaires utilisées lors de ce travail, y compris celles qui ne figurent pas dans le manuscrit du chapitre 4. Ce dernier présente les principaux résultats obtenus dans le cadre de cette maîtrise sur les cellules HEK293 et l'analyse de ces résultats. Finalement, une conclusion et des recommandations sont formulées.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

Le présent chapitre consiste en une revue de littérature, allant du plus général vers le cœur du projet. Il sera d'abord question de la production de protéines recombinantes dans les cellules de mammifères, du choix des plateformes ainsi que des conditions de culture (milieux, modes d'opération) et du métabolisme central de ces cellules. Ensuite, les problématiques d'ingénierie en vue d'augmenter la production, la croissance et la viabilité seront abordées, notamment les stratégies anti-apoptose, les stratégies visant à diminuer l'effet des sous-produits toxiques, ainsi que l'ingénierie métabolique via l'analyse des flux métaboliques et la redirection des flux. Enfin, les méthodes de transfection et de sélection utilisées pour induire la production de protéines chez une cellule hôte seront décrites.

2.1 L'importance des cellules de mammifères en tant que plateforme de production

Cette première section est principalement dédiée à la production de protéines recombinantes via les plateformes de cellules de mammifères. Ces dernières sont en effet préférées aux microorganismes pour plusieurs raisons qui seront détaillées, notamment parce qu'elles opèrent une glycosylation appropriée pour les traitements humains. Il est également important de connaître les conditions optimales de culture de ces cellules et les stratégies opérées à grande échelle en industrie. Enfin, les caractéristiques du métabolisme de ces cellules seront abordées. Une cellule peut être vue, en première approche, comme une boîte noire dans laquelle entrent des nutriments et sortent des produits. Or, la maîtrise des réactions métaboliques internes peut permettre d'orienter les stratégies de production.

2.1.1 Généralités

Les protéines recombinantes et les anticorps monoclonaux (mAbs) se sont avérés efficaces pour le traitement de nombreuses maladies (cancer, maladies auto-immunes, cardiovasculaires, infectieuses, allergies, greffes), seuls ou combinés à d'autres molécules, comme des agents cytotoxiques ou même à d'autres mAbs (Cacciatore et al., 2010; Costa et al., 2010; Stefanie Dietmair et al., 2011; Rasmussen et al., 2012). Soit les médicaments individuels sont administrés en même temps, soit les substances individuelles sont formulées dans un seul

médicament, soit les substances sont produites simultanément par une même lignée ou une seule cuvée (Rasmussen et al., 2012). La demande pour ces protéines complexes ne cesse d'augmenter (M. Butler & Meneses-Acosta, 2012) et crée de nombreux défis dans l'industrie biopharmaceutique.

Les plateformes procaryotes (e.g. microorganismes) sont plus faciles à mettre en œuvre car plus simples à manipuler, atteignant de hauts rendements grâce à une croissance rapide et des densités cellulaires élevées, et ce, à faible coût. Mais les bactéries, ainsi que les levures (eucaryotes) et les cellules d'insectes (eucaryotes), sont limitées dans la production de protéines destinées aux humains : elles ne permettent pas d'avoir les modifications post-traductionnelles appropriées (B Gaillet et al., 2007; Bruno Gaillet et al., 2010; Liu et al., 2008). C'est pourquoi la culture de cellules de mammifères est aujourd'hui l'outil de prédilection pour la production de protéines recombinantes d'intérêt clinique (Andersen & Krummen, 2002; Rasmussen et al., 2012; Wurm, 2004). On estime que 60-70% des protéines recombinantes du marché sont produites via ces plateformes (Wurm, 2004). Mais la production reste couteuse, car les cellules de mammifères sont bien plus complexes et nécessitent des milieux de culture plus élaborés: la productivité et les titres finaux sont encore, en règle générale, trop faibles en comparaison aux hautes doses nécessaires (Stefanie Dietmair et al., 2011; Rasmussen et al., 2012), ce qui complique les étapes de purification. Un exemple de ces coûts, exerçant une forte pression financière sur le système de santé, est fourni par (Berenson, 2006): le traitement du cancer colorectal par l'Avastin (Genentech) reviendrait autour de 50 000 \$US par année par patient. Il apparaît d'ores et déjà que l'augmentation des titres et la diminution des couts de production représentent un enjeu primordial.

Les cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO) sont aujourd'hui considérées comme l'hôte prédominant pour la production de protéines recombinantes de type humain : elles bénéficient d'être bien caractérisées, efficaces, de pouvoir atteindre de hautes densités en suspension et de posséder une plasticité génétique. Bénéficiant d'un historique positif, l'approbation des produits provenant de ces cellules est plus rapide (Andersen & Krummen, 2002; M. Butler & Meneses-Acosta, 2012; Cacciatore et al., 2010; B Gaillet et al., 2007; Bruno Gaillet et al., 2010; Rasmussen et al., 2012). Les cellules humaines *Human Embryonic Kidney* (HEK) sont aussi beaucoup utilisées, mais dans une moindre mesure, notamment pour la production de vecteurs viraux, car elles sont hautement transfectables et parce qu'elles

permettent, de par leur origine humaine, d'obtenir les modifications post-traductionnelles adéquates (M. Butler & Meneses-Acosta, 2012; Henry & Durocher, 2011; Henry et al., 2011). Mais l'origine humaine de ces cellules demande plus de vigilance quant aux risques de pathogénicité liés aux contaminants potentiels.

La production s'effectue principalement par la technologie d'ADN recombinant, selon des étapes établies, bien connues et un long processus de sélection (6 mois): le transgène est inséré dans les cellules, souvent avec un gène codant pour un marqueur de sélection. En présence de l'agent de sélection, seules les cellules qui ont intégré le transgène sont capables de survivre. S'en suit la culture monoclone des cellules sélectionnées et leur expansion, et une lignée cellulaire est choisie en raison de ses paramètres de croissance et de production. Les caractéristiques clés pour le choix d'une lignée cellulaire sont sa capacité à produire de fortes concentrations de protéines de qualité uniforme, la vitesse d'obtention d'une lignée hautement productrice et les modifications post-traductionnelles (Birch & Racher, 2006). Les cellules sont également adaptées à la culture en suspension et au milieu sans sérum, puis la culture en bioréacteur est adaptée à grande échelle ($\sim 10 \text{ m}^3$) (Birch & Racher, 2006; Costa et al., 2010; Rasmussen et al., 2012; Wurm, 2004).

La production en bioréacteur se compte à présent en grammes par litre en raison d'améliorations significatives dans la composition des milieux de culture, le contrôle de procédé, la sélection de lignées hautement productrices, les méthodes de purification, ainsi que par le développement de procédés en perfusion et en cuvée alimentée (Birch & Racher, 2006; M. Butler & Meneses-Acosta, 2012; Rasmussen et al., 2012; Wurm, 2004). De plus hautes densités cellulaires - de l'ordre de 10 millions de cellules par mL - sont désormais atteintes. Une meilleure connaissance du métabolisme, des besoins nutritionnels et de l'expression génétique a permis d'augmenter la productivité cellulaire (Birch & Racher, 2006; M. Butler & Meneses-Acosta, 2012; Wurm, 2004). Mais les améliorations récentes sont encore trop dépendantes du contexte, à savoir de la lignée, du produit ainsi que du mode de culture, et les études doivent ainsi être menées au cas par cas (Stefanie Dietmair et al., 2011). La productivité est généralement encore trop faible, voire variable, et trop couteuse face à la demande. À ce propos, l'ingénierie métabolique présente un grand intérêt pour l'obtention de lignées productrices plus robustes.

2.1.2 Modifications post-traductionnelles

Les anticorps sont des protéines telles que présentées à la Figure 2-1. Ils sont formés de quatre chaînes polypeptidiques, deux chaînes lourdes (HC) identiques et deux chaînes légères (LC) identiques, reliées entre elles par des ponts disulfure. La première permet de les trier en classes (IgA, IgD, IgE, IgG et IgM). Le haut de l'anticorps, à savoir la région Fab (*antigen-binding fragments*), permet la liaison spécifique aux antigènes (Jefferis, 2005), là où se rapprochent les domaines variables de la chaîne lourde (V_H) et de la chaîne légère (V_L). Les parties variables de cette région sont les mêmes chez les anticorps monoclonaux du même type. La base de la protéine, également appelée région Fc (*fragment crystallizable region*), se lie à d'autres ligands, effecteurs de l'immunité. Lorsqu'elles sont produites par la cellule, les protéines sont sujettes à des modifications post-traductionnelles, lesquelles sont essentielles pour la fonction biologique, la demi-vie et la localisation de la molécule. Ces modifications peuvent être de divers types: glycosylation, alkylation, acétylation, méthylation, sulfation, phosphorylation... En particulier, les études s'accordent sur le fait qu'une glycosylation appropriée est essentielle, également d'un point de vue réglementaire (Jefferis, 2005) et c'est la seule modification qui sera traitée dans cette partie.

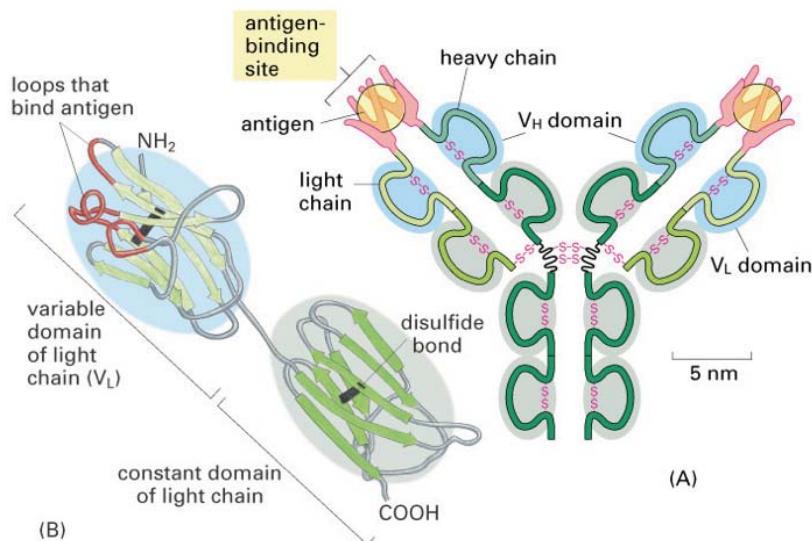


Figure 2-1: Schéma d'un anticorps (Alberts et al., 2004)

La capacité à réaliser les modifications post-traductionnelles propices est un argument de poids qui fait que les cellules de mammifères sont principalement utilisées aujourd'hui pour la production de protéines recombinantes (Hossler et al., 2009; Loignon et al., 2008). Les cellules

de mammifères, contrairement aux bactéries, présentent l'avantage d'opérer les modifications post-traductionnelles appropriées et nécessaires dans le contexte d'une application thérapeutique (Wurm, 2004). La glycosylation est une de ces propriétés qui est importante en matière de réglementation car elle a une influence sur l'efficacité, la solubilité, la stabilité, la demi-vie, l'immunogénicité, et la résistance aux protéases d'une molécule (Beck et al., 2008; M. Butler, 2004; Hossler et al., 2009; McAtee et al., 2014; Zheng et al., 2011). Effectivement, les variations des glycanes affectent la bioactivité et la solubilité. Des altérations des glycoformes apparaissent notamment dans certaines pathologies des immunoglobulines (M. Butler & Meneses-Acosta, 2012). Les stratégies de production ne doivent pas nuire aux profils de glycosylation et s'assurer qu'un profil constant est maintenu lors des étapes de purification et de formulation. Les profils varient en fonction de la lignée cellulaire, des conditions de culture et du milieu de culture (Beck et al., 2008; Hossler et al., 2009). Il est donc important d'utiliser des cellules capables de synthétiser des protéines avec les bons profils de glycosylation. Les plus utilisées à ce jour sont les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO). Elles possèdent, en effet, des gènes homologues pour 99% des enzymes humaines de glycosylation (M. Butler & Meneses-Acosta, 2012).

Le processus de glycosylation consiste à lier un glucide spécifique à une chaîne peptidique, de manière covalente (McAtee et al., 2014). Les liens peuvent être de plusieurs types : sur des atomes d'azote (groupement amine de l'asparagine), de carbone (cercle indole du tryptophane), d'oxygène (groupe hydroxyle de la sérine ou la thréonine), lien à la sérine via une liaison phosphodiester (phosphoglycosylation). Ce phénomène débute dans le réticulum endoplasmique et se complète dans l'appareil de Golgi. Elle aboutit à une grande diversité protéomique, et une diversité d'activités également assurées par les modifications post-traductionnelles. Elle est aussi considérée comme la plus complexe car elle implique de nombreuses étapes et enzymes. La galactosylation consiste en l'addition d'une molécule de galactose sur le site terminal des oligosaccharides. La sialylation est la dernière étape de la glycosylation, lorsque des groupements acide sialique sont ajoutés sur les glycanes en position terminale (McAtee et al., 2014).

De nombreux paramètres soupçonnés d'intervenir dans le processus de glycosylation ont été étudiés, le premier étant le mode de culture, à savoir en mode cuvée, cuvée alimentée ou perfusion. Les profils de glycosylation d'une lignée CHO DG44 produisant la protéine SEAP (*protein-secreted alkaline phosphatase*) selon ces trois modes de culture, avec des cellules

amplifiées au MTX (méthotrexate) ou non (Lipscomb et al., 2005). En mode cuvée, les profils de glycosylation entre les protéines produites de cellules amplifiées et non ont présenté peu de variations. Le mode perfusion, avec une croissance plus lente, a permis d'obtenir de plus hauts niveaux de sialylation que le mode cuvée alimentée (Lipscomb et al., 2005). La rapidité des différents processus joue donc un rôle et ceci se retrouve dans la réponse UPR (*unfolded protein response*), qui apparaît notamment lors de l'utilisation de promoteurs forts sur les plasmides permettant une sécrétion rapide mais de mauvais repliements. Ceci entraîne l'arrêt de la sécrétion et requiert des protéines chaperonnes pour gérer les mauvais repliements, ce qui est exigeant aux niveaux métabolique et énergétique pour la cellule (Klein et al., 2015). La glycosylation, lors de la production en culture, est affectée par la disponibilité en glycanes (M. Butler & Meneses-Acosta, 2012). Ceci est important à prendre en compte dans l'élaboration de stratégies cuvée-alimentée, car il ne faut pas réduire les concentrations en substrats au point de limiter la glycosylation (M. Butler & Meneses-Acosta, 2012). (Wong et al., 2010) ont d'ailleurs montré l'importance de maintenir un niveau de 0.5 mM en glutamine pour assurer la glycosylation, lorsque c'est le nutriment utilisé. Les stratégies de cuvée alimentée visant à réduire l'accumulation de sous-produits toxiques en culture peuvent avoir un impact négatif sur les processus liés à la glycosylation (Kochanowski et al., 2008).

Les paramètres de procédé, tels que le pH et l'oxygène dissous ont également un impact sur les profils (Müthing et al., 2003). Les études ayant porté sur le paramètre oxygène dissous, notamment en conditions d'hypoxie, ont donné des résultats variés : des conditions d'hypoxie douce n'ont pas affecté la qualité ni l'activité de la tPa recombinante produite par une culture de CHO (Lin et al., 1993), mais des changements importants en termes de sialylation ont été notés chez une lignée CHO produisant la hFSH (Chotigeat et al., 1994). Notons que la production en hypothermie permet d'augmenter la productivité volumique tout en conservant des profils de glycosylation à faible disparité (Sung Kwan Yoon et al., 2003). L'ajout de butyrate de sodium, largement utilisé pour augmenter la productivité spécifique en protéine, mène cependant à des profils de glycosylation variés et une baisse de la qualité (activité spécifique) des protéines (Sung et al., 2004). Les cellules cultivées en l'absence de sérum présentent des niveaux de N- et O-glycosylation plus importants avec une sialylation améliorée (M. Butler, 2004). L'ion ammonium, sous-produit de culture présentant un haut niveau de toxicité à haute concentration, a été rapporté affecter négativement la sialylation (M. Butler, 2004; McAtee et al., 2014). Les

glycanes peuvent également être dégradés une fois les protéines sécrétées dans le milieu de culture, par des glycosidases ou sialidases, ou même des protéases, également sécrétées dans le milieu ou relarguées après lyse cellulaire (M. Butler, 2004).

L'ingénierie de la glycosylation vise donc non seulement à fournir aux cellules les enzymes nécessaires à l'obtention de profils adéquats mais également à inhiber l'activité des glycosidases. Elle est intéressante car la modification des conditions de culture n'a que des effets limités (Jefferis, 2005). Par exemple, les cellules CHO ne possèdent pas certaines enzymes présentes chez les humains, à savoir : l' α 2,6 sialyltransférase, l' α 1,3 fucotransférase et la β -1,4-N-acétylglucosaminyltransférase III. Ces enzymes ont été exprimées avec succès chez les cellules CHO et les BHK (*baby hamster kidney*) (Grabenhorst et al., 1999; Lamotte et al., 1999; Sburlati et al., 1998). Des stratégies utilisant des siARN ont, quant à elles, permis d'inhiber la sialidase chez des CHO (Ferrari et al., 1998), même si les améliorations en termes de sialylation étaient modestes.

L'importance d'obtenir des modifications post-traductionnelles appropriées lors de la production n'est plus à démontrer. Les différentes stratégies de culture, qui ne visent pas nécessairement l'optimisation de ces paramètres au premier abord, doivent prendre en compte ces paramètres, car un gain de production volumétrique peut se faire au détriment de la qualité et de l'activité de la protéine d'intérêt.

2.1.3 Conditions et modes de culture

Les lignées cellulaires sont obtenues de tissus ou d'organes et peuvent continuer de pousser, *in vitro*, de manière indépendante, après immortalisation. On ne cultive généralement qu'un seul type de cellules à la fois (M. Butler, 2004). Mais les caractéristiques des cellules peuvent changer en cours de culture et être différentes de l'organe original, ce qui pose problème pour les applications *in vivo* (M. Butler, 2004). Le clonage permet d'obtenir une population possédant le même phénotype. À la base, les cellules ne peuvent pas croître indéfiniment car elles entrent dans un état de sénescence, des lignées continues immortalisées ont donc été établies, avec une croissance théoriquement infinie, par des mutagènes, virus ou oncogènes, comme par exemple par transfection avec de l'ADN d'adénovirus (M. Butler, 2004; F. L. Graham et al., 1977).

Les cellules peuvent être cultivées de deux façons différentes : soit en suspension soit en adhérence, la suspension étant préférable pour la production à grande échelle car la croissance adhérente est limitée par la surface disponible. Elles sont placées à l'incubateur dans des conditions physiologiques, à 37°C, des températures supérieures les tuant, ou plus bas en hypothermie douce (33°C) dans des stratégies de production. L'atmosphère humide permet d'éviter l'évaporation du milieu de culture; elle contient également 5% de CO₂ comme tampon avec le bicarbonate du milieu de culture pour maintenir le pH de ce dernier autour de 7. Les cellules ont également besoin d'oxygène, pour la respiration, généralement entre 30-40% de la saturation en oxygène dissous. L'agitation des suspensions permet une répartition uniforme du milieu de culture ainsi que des transferts gazeux efficaces. Cependant, les cellules de mammifères sont sensibles au cisaillement.

Plusieurs modes de cultures sont disponibles à savoir le mode cuvée, le mode cuvée alimentée, le mode perfusion et le mode continu (voir Figure 2-2), bien que les modes en cuvée alimentée et en perfusion continu soit préférées pour la production à grande échelle (Birch & Racher, 2006). Ces modes permettent de mettre en place des stratégies pour contrer l'accumulation des sous-produits néfastes de culture. Le mode cuvée est le plus simple et correspond à une cuve fermée à laquelle rien n'est rajouté en cours de culture. Dans ce type de mode opératoire, l'accumulation des sous-produits toxiques et/ou la déplétion des nutriments causent rapidement l'arrêt de la culture et dictent la densité cellulaire maximale et les faibles taux de production (Rodrigues et al., 2010; Xie & Wang, 2006). Cette limitation peut être contrée par le mode cuvée alimentée, dans lequel de petits volumes de nutriments sont rajoutés pendant la production et la récolte a lieu en fin de production (Birch & Racher, 2006; Dean & Reddy, 2013). Cela permet d'éviter la déplétion des nutriments clés. Ses stratégies permettent une meilleure utilisation du métabolisme et la minimisation de la production de sous-produits toxiques en fournissant les quantités minimales de substrats nécessaires, ce qui entraîne une culture étendue et une plus haute viabilité (M. Butler & Meneses-Acosta, 2012; Cruz et al., 2000b; Xie & Wang, 2006). Le mode continu, quant à lui, consiste en un apport constant de milieu frais et une récolte continue du milieu de culture contenant le produit et les cellules, le problème étant que les cellules sont retirées en même temps. Les cultures en perfusion permettent de pallier ce problème, car les cellules sont retenues et seul le milieu quitte le bioréacteur. Elles permettent d'atteindre des densités cellulaires plus élevées de l'ordre de 10⁸ cellules/mL (Clincke et al.,

2013) et peuvent être maintenues pendant des semaines, mais sont plus complexes à développer (Birch & Racher, 2006; Rodrigues et al., 2010). De plus, comme des volumes importants sont récoltés continuellement, le produit est plus dilué ce qui complexifie les opérations de purification, et augmente leurs coûts (Mercille et al., 2000).

Même si les cellules sont le plus souvent cultivées dans des conditions physiologiques (i.e. 37°C), d'autres températures ont été essayées. La production en hypothermie douce (30-33°C) s'est avérée efficace pour augmenter la production spécifique des cellules (Fox et al., 2004; Kou et al., 2011; S. K. Yoon et al., 2004).

L'augmentation de la taille des réacteurs et de la capacité des industries est une conséquence de la demande croissante en mAbs (Birch & Racher, 2006). À petite échelle, on constate l'essor de l'utilisation des réacteurs jetables, dans les premières étapes de développement, limitant ainsi les coûts de nettoyage et de stérilisation (Birch & Racher, 2006; Rodrigues et al., 2010).

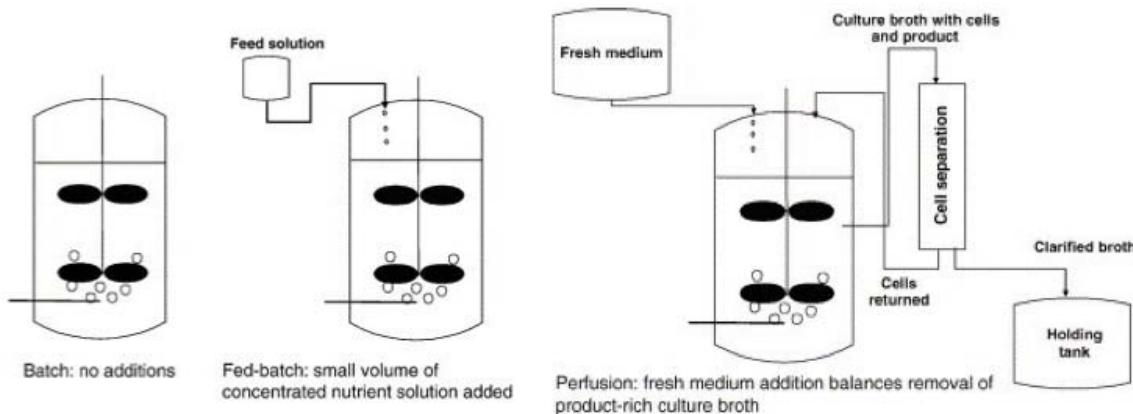


Figure 2-2: Différents modes de culture (Birch & Racher, 2006)

2.1.4 Milieux de culture

Les milieux de culture pour les cellules de mammifères sont bien plus complexes que ceux des microorganismes. Des milieux de culture de haute qualité sont maintenant disponibles et les fabricants de l'industrie pharmaceutique investissent beaucoup d'argent pour optimiser leurs milieux de culture, selon la nécessité imposée par les différentes phases de culture (Wurm, 2004). L'ingénierie des milieux de culture pour les cellules de mammifères est complexe: les milieux doivent supporter la croissance et des fortes viabilités cellulaires, permettre une production

quantitative et d'obtenir des protéines de haute qualité (Gawlitzek et al., 2010; Klein et al., 2015). Le développement de nouveaux milieux de culture doit permettre de soulager la charge métabolique imputée à la production de protéines recombinantes.

Originellement, le sérum bovin était nécessaire à la culture, mais aujourd'hui, les fabricants ne l'incluent plus dans la formulation (Wurm, 2004). En effet, étant un composé d'origine animale, le sérum augmente le risque de présence de certains virus et prions d'origine bovine pouvant représenter une menace à la santé humaine, ce qui n'est pas acceptable pour les organismes de règlementation (Gawlitzek et al., 2010; Merten, 2002). De plus, il est couteux, sa composition est variable et la purification du produit est plus difficile en sa présence (Birch & Racher, 2006; M. Butler & Meneses-Acosta, 2012; Costa et al., 2010; Wurm, 2004). L'avantage du sérum réside dans le fait qu'il protégeait les cellules, notamment via l'albumine, et supportait la croissance des cellules via les hormones et les facteurs de croissance, reproduisant ainsi des conditions physiologiques de culture (Michael Butler, 2005). Devant ces obligations réglementaires, les industriels se sont tournés vers des milieux sans composant d'origine animale, appelés « milieux définis ». Même s'ils sont définis, il est difficile d'en connaître la composition exacte. Les concentrations sont fixées de manière à réduire la variabilité entre lots, mais chaque milieu est en général optimisé pour une application spécifique et une lignée cellulaire, faisant de l'optimisation des milieux de culture une partie intégrante du développement d'un procédé. Comme cela sera abordé plus tard, certains milieux vont être des milieux de production et seuls certains milieux vont permettre la transfection des cellules.

Les milieux contiennent actuellement jusqu'à 70 composants différents incluant les sources de carbone (glucose), les acides aminés essentiels ou non essentiels (glutamine), les vitamines, les sels (Gawlitzek et al., 2010). Des additifs peuvent être ajoutés, notamment pour prévenir l'agrégation et les protéger du cisaillement pendant la culture (agents anti-agrégats, surfactants). Des hydrolats de protéines pour remplacer le sérum, d'origine non-animale, peuvent être ajoutés, mais leur composition est également variable de lot en lot (Gawlitzek et al., 2010). L'ajout de peptone peut par exemple augmenter la production (P. L. Pham et al., 2005). L'ajout de sodium butyrate a également un effet positif sur la production, une augmentation de 6 fois en termes de productivité spécifique a été rapportée par (Chun et al., 2003). Des ajustements de l'osmolarité selon les phases de culture permettent également d'améliorer la production (Shen & Kamen, 2012).

2.1.5 Métabolisme

La maintenance cellulaire, la croissance et la production de protéines sont la conséquence de réactions biochimiques au sein de la cellule, en utilisant les nutriments du milieu de culture, les découpant en leurs plus simples sous-unités pour produire de l'énergie ou des précurseurs de base. Il existe deux facettes complémentaires au métabolisme : le catabolisme et l'anabolisme. Le premier est en charge de la coupure des nutriments, fournissant ainsi les précurseurs, produisant également un peu d'ATP ainsi que du potentiel réducteur sous forme de NADH et NADPH. Le deuxième est responsable de la synthèse de macromolécules à partir des précurseurs. Les apports nutritionnels dans le milieu de culture sont sensés couvrir ces besoins, à savoir en carbone (pour les précurseurs et l'énergie) et en azote (eg acides aminés). Il existe 20 acides aminés dont 9 qui ne peuvent généralement pas être synthétisés par les cellules de mammifères à partir des autres; ils doivent donc être apportés par le milieu de culture.

Le métabolisme cellulaire est très complexe de par les milliers de réactions en jeu, et nous ne pourrons donc pas le présenter en détail. Les cellules de mammifères étant hautement compartimentées, les réactions métaboliques auront lieu dans des zones particulières et les métabolites seront gérés par des transporteurs pour les changements de zone. Le métabolisme cellulaire est une fonction des conditions de culture (Sengupta et al., 2011). Le métabolisme des cultures de cellules de mammifères est considéré comme étant inefficace en culture *in vitro*: il se caractérise par des taux de consommation en glucose et en glutamine élevés, avec un taux de production de lactate élevé (Quek et al., 2010). De plus, il est évident que la production de protéines recombinantes impose une charge supplémentaire au métabolisme. Dans certaines stratégies de culture, la production de protéines est ainsi séparée de la phase de croissance (Sengupta et al., 2011). Les flux métaboliques ne sont donc pas constants au cours de la culture et à travers les différentes phases. (Neil Templeton et al., 2013) ont montré que pendant la phase exponentielle d'une culture de CHO hautement productrices en cuvée alimentée, la principale utilisation du carbone consommé était pour la production de biomasse et que la production était minimale, contrairement à la phase stationnaire où la production de biomasse est négligeable et la production maximale. La production de lactate était également substantielle tôt en phase exponentielle, et le lactate était consommé en phase stationnaire. De plus, les flux vers la PPP et le TCA étaient minimaux en phase exponentielle puis augmentés dans les phases tardives de la croissance, corrélant cette redirection des flux avec le pic de production.

Les réactions métaboliques sont catalysées par des enzymes et la concentration des différents métabolites régule les flux. Les enzymes sont régulées de plusieurs manières, comme représenté à la Figure 2-3. Les concentrations en substrat(s) et en produit(s) et de faibles modifications dans les substrats peuvent induire des changements significatifs dans les flux métaboliques (Wegner et al., 2015). La régulation allostérique consiste en la liaison d'un régulateur sur le site allostérique de l'enzyme, qui est différent du site actif, ce qui induit un changement de conformation et donc d'activité enzymatique. Les métabolites régulent également l'activité des enzymes soit en régulant la transcription, ou plus tard la traduction des ARNm, ou en entraînant des modifications covalentes des enzymes (Wegner et al., 2015). Les microARN présentent également un intérêt car ils régulent l'expression génétique et donc affectent le métabolisme (Müller et al., 2008).

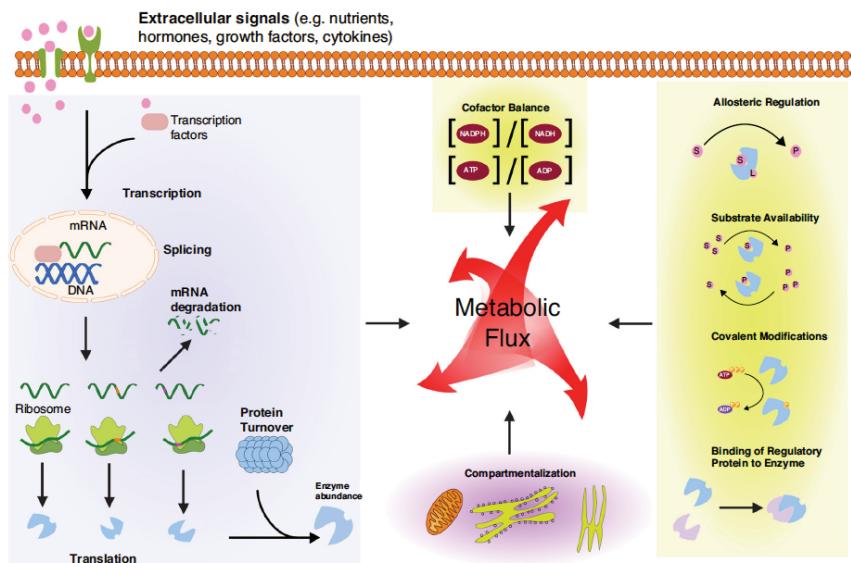


Figure 2-3 : Régulation des flux métaboliques par les métabolites (Wegner et al., 2015)

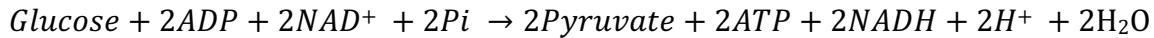
La synthèse des protéines est initiée dans le noyau, qui contient le matériel génétique, par la transcription de l'ADN en ARN. Ensuite, les ribosomes dans le réticulum endoplasmique vont traduire ces ARN en séquences peptidiques. Les protéines sont ensuite acheminées vers l'appareil de Golgi, puis sécrétées à l'extérieur de la membrane plasmidique ou transportées dans le cytosol. La réponse UPR peut intervenir lorsqu'il y a une accumulation de protéines mal repliées. S'en suit un arrêt de la traduction, l'activation des chaperones impliquées dans le repliement des protéines et la dégradation des protéines mal repliées. Nous ne décrirons dans les parties

suivantes que les voies métaboliques principales du carbone central, à savoir la glycolyse, le cycle des acides tricarboxyliques (TCA) et la voie des pentoses phosphates (PPP), qui concernent le catabolisme des cellules.

2.1.5.1 Glycolyse

La glycolyse transforme le glucose en pyruvate dans le cytosol (voir Figure 2-4). Cette voie produit également de l'énergie sous forme de deux ATP et deux NADH. Ainsi, par une suite de réactions enzymatiques, le glucose est transformé en glucose-6-phosphate, puis en fructose-6-phosphate, puis en fructose-1,6-diphosphate. Cette dernière molécule est scindée en glycéraldéhyde 3-phosphate et en dihydroxyacétone phosphate, qui peuvent être converties l'une en l'autre. Une nouvelle chaîne de réaction permet la conversion en phosphoénolpyruvate, lui-même converti en pyruvate via la pyruvate kinase.

Cette voie métabolique peut être résumée par le bilan chimique suivant (Stephanopoulos et al., 1998):



Plusieurs options sont alors possibles pour le pyruvate ainsi formé : soit il sera transformé en lactate soit il alimentera le cycle des acides tricarboxyliques. Les cellules de mammifères sont connues pour majoritairement transformer le pyruvate en lactate, sous-produit toxique, résultant en un métabolisme dit inefficace. Aussi, on fait intervenir des stratégies d'ingénierie métaboliques telles décrites dans la partie 2.2.3 Diminuer l'effet toxique des déchets et leur accumulation afin de limiter l'accumulation des métabolites toxiques, et donc améliorer artificiellement le métabolisme.

2.1.5.2 Voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphate consiste en la synthèse d'un pentose à partir du glucose. Le point d'entrée de cette voie se trouve au niveau du glucose-6-phosphate dans la glycolyse, comme montré à la Figure 2-4.

La voie se décompose en deux parties, une phase oxydative et une phase non oxydative. Le bilan de la phase oxydative se résume ainsi :

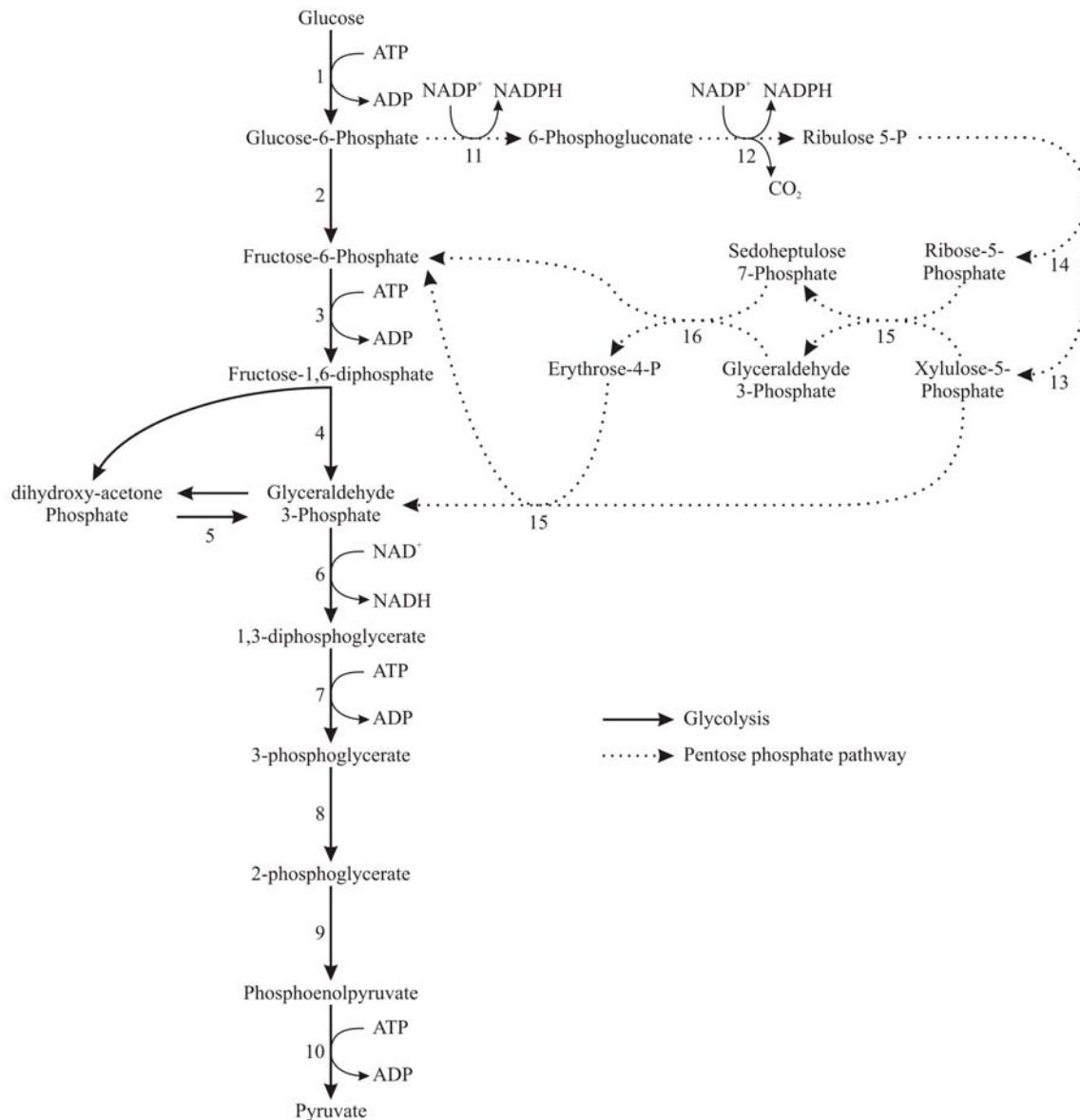
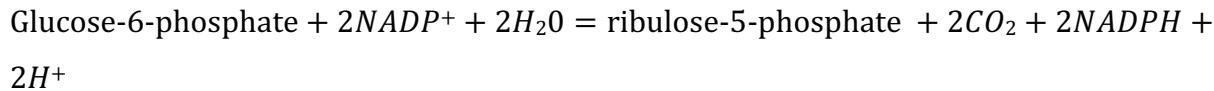


Figure 2-4: Glycolyse et voie des pentoses phosphate

(1 : hexokinase, 2 : phosphohexoisomérase, 3 : phosphofructokinase, 4 : aldolase, 5 : triophosphate isomérase, 6 : 3-phosphoglyceraldehyde déhydrogénase, 7 : 3-phosphoglycerate kinase, 8 : phosphoglycerate mutase, 9 : enolase, 10 : pyruvate kinase, 11 : glucose-6-phosphate déhydrogénase, 12 : 6-phosphogluconate déhydrogénase, 13 : ribulosephosphate-3-épimerase, 14 : ribosephosphate isomérase, 15 : transketolase, 16 : transaldolase)

Le glucose-6-phosphate est converti en 6-phosphogluconate par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), puis en ribulose-5-phosphate et CO₂ par la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGD), s'accompagnant de la formation de NADPH. La G6PDH, première

enzyme de la voie, est considérée comme limitante. Dans les étapes suivantes (phase non oxydative), le ribulose-5-phosphate est converti soit en ribose-5-phosphate soit en érythrose-4-phosphate, qui sont des précurseurs pour les nucléotides et les acides aminés. D'autres réactions sont possibles, où ces deux composés peuvent être transformés en fructose-6-phosphate ou en glycéraldéhyde-3-phosphate et ainsi retourner vers la glycolyse.

2.1.5.3 Cycle des acides tricarboxyliques

Ce cycle décrit la transformation du pyruvate en métabolites intermédiaires et en CO_2 dans les mitochondries, dans le cas où il n'est pas transformé en lactate (voir Figure 2-5). Le pyruvate est d'abord transformé en acétyl-CoA ou en oxaloacétate, mais cette deuxième réaction ne se fait pas dans les cellules de mammifères car la pyruvate carboxylase n'est pas active. L'oxaloacétate et l'acétyl-CoA se lient ensuite pour donner du citrate. Ce dernier est transformé en oxaloacétate par une série de réactions formant ainsi un cycle.

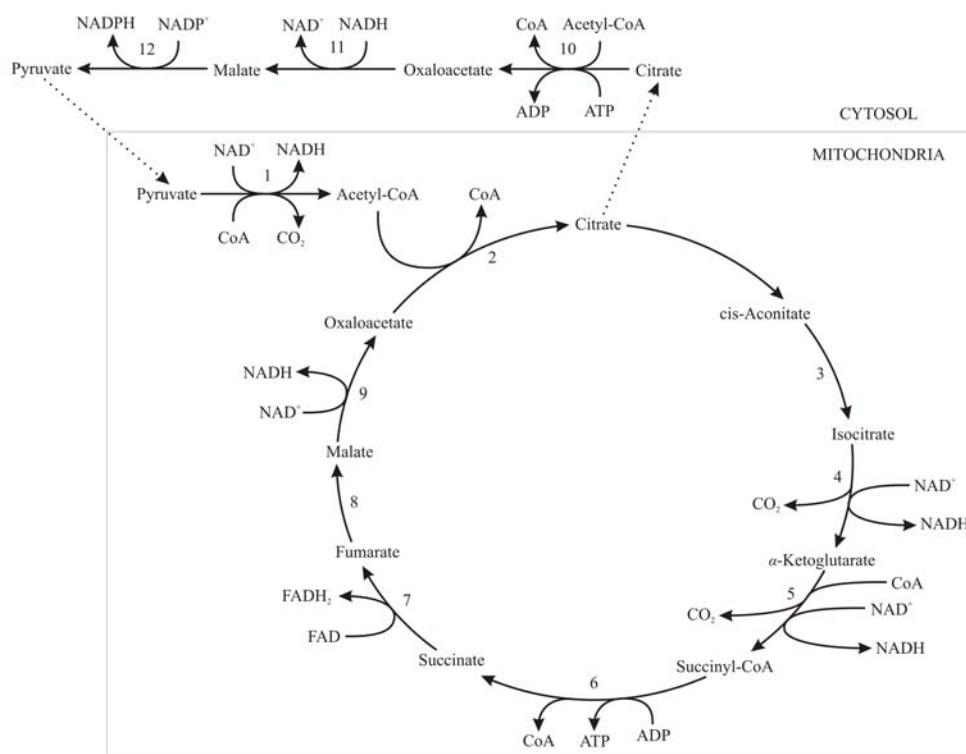
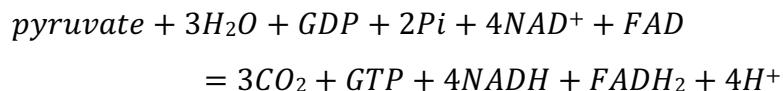


Figure 2-5: Cycle des acides tricarboxyliques

(1 : pyruvate dehydrogenase complex, 2 : citrate synthase, 3 : aconitase, 4 : isocitrate dehydrogenase, 5 : α -ketoglutarate dehydrogenase, 6 : succinate thiokinase, 7 : succinate dehydrogenase, 8 : fumarase, 9 : malate dehydrogenase, 10 : ATP-citrate lyase, 11 : malate dehydrogenase, 12 : malic enzyme)

Le bilan du cycle peut se résumer ainsi, lorsqu'aucun intermédiaire métabolite n'est durablement généré (Stephanopoulos et al., 1998):



Il est important de noter que les acides aminés contribuent eux aussi au TCA. 30% du citrate et 50% du malate et du succinate proviendraient des acides aminés, à savoir la glutamine et l'asparagine (Dean & Reddy, 2013). Le TCA a plusieurs fonctions : fournir des molécules réductrices pour la phosphorylation oxydative et des précurseurs pour la synthèse des acides aminés.

2.1.5.4 Énergétique

La synthèse de la protéine d'intérêt est énergivore. Les nucléotides jouent un rôle important dans le système énergétique de la cellule. L'ATP, est un transporteur d'énergie : son hydrolyse en ADP libère 30.54 kJ/mol à 37°C et pH 7 (Bailey & Ollis, 1986). La phosphorylation de l'ADP permet donc le stockage de l'énergie. La forme cyclique de l'AMP sert de régulateur dans plusieurs réactions, notamment dans la formation de sucres et de polymères pour le stockage de gras (Bailey & Ollis, 1986). La GTP est impliquée dans des réactions métaboliques telles que la synthèse de protéines et de polysaccharides de la membrane cellulaire. L'UTP est impliquée dans des réactions anaboliques reliées à la croissance cellulaire alors que la CTP affecte la synthèse des phospholipides. L'oxydation d'une molécule signifie que cette dernière perd des électrons, ceci se fait biologiquement par la perte d'atomes d'hydrogène. Les couples NAD⁺/NADH et NADP⁺/NADPH sont des navettes ou couples oxydant/réducteur de ce type, et la réaction est réversible.

La phosphorylation oxydative (Figure 2-6) est la voie principale de production d'énergie en mode aérobie et se produit dans la zone membranaire de la mitochondrie. L'oxygène agit comme un accepteur des électrons du NADH ou du FADH₂. Les électrons sont acheminés à travers la chaîne de transport d'électrons jusqu'à l'oxygène, créant un fort gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane, de par le transfert d'ions H⁺ dans l'espace intermembranaire. Ce gradient fournit l'énergie nécessaire au recyclage de l'ADP en ATP.

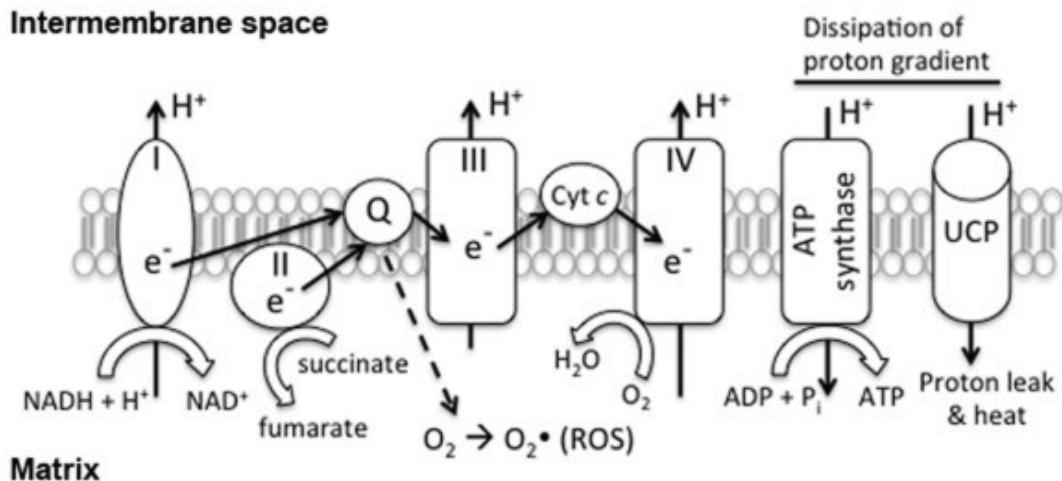


Figure 2-6: Phosphorylation oxydative (Ho et al., 2012)

2.2 Ingénierie cellulaire et stratégies de culture pour l'augmentation de la production

La synthèse et la sécrétion de protéines recombinantes imposent une forte charge supplémentaire sur le métabolisme. La demande concerne non seulement les sous-unités de base tels que les acides aminés et les nucléotides, mais également de l'énergie sous forme d'ATP et de NADPH, pour la synthèse de ces dites sous-unités, l'assemblage, le repliement et les modifications post-traductionnelles (Klein et al., 2015). Les acides aminés ne représentent généralement pas un problème car ils sont présents en quantité non limitante dans le milieu de culture, c'est plutôt leur transport et donc leur disponibilité qui posent problème (Klein et al., 2015). La production volumétrique dépend à la fois du taux de production spécifique mais aussi de l'intégrale de la concentration de cellules viables (Dinnis & James, 2005). En étudiant le métabolisme des cellules, il est possible d'orienter les stratégies de production. De nombreuses stratégies ont ainsi été mises en place, notamment pour limiter les signaux d'apoptose ou l'accumulation des sous-produits de culture. Les avancées en termes d'analyse des flux métaboliques ont permis de cibler des voies métaboliques d'intérêt. Malheureusement, les optimisations se font encore au cas par cas.

2.2.1 Systèmes d'expression inductibles

Comme certains produits peuvent être toxiques pour la cellule, il est intéressant de pouvoir faire en sorte que les cellules ne produisent un produit que lorsqu'elles auront atteint leur

densité maximale (M. Butler, 2004; Sheikholeslami et al., 2013a). Les systèmes inductibles permettent donc de découpler la culture en deux phases distinctes, une phase de croissance et une phase de production, et ainsi d'optimiser chaque phase séparément. D'un point de vue procédé, il est très intéressant de pouvoir optimiser séparément chaque phase (croissance puis production). De plus, les bénéfices des systèmes inductibles sont visibles avec des temps d'induction appropriés et des stratégies en cuvée alimentée bien adaptées.

Les systèmes inductibles se composent de deux éléments : un plasmide contenant le répresseur ou trans-activateur, et un plasmide avec le gène pour la protéine d'intérêt avec un promoteur régulé. La production de la protéine d'intérêt est donc régulée par l'ajout ou le retrait d'un composé du milieu de culture, lui-même régulant le répresseur ou l'activateur (Costa et al., 2010).

Les premiers systèmes incluaient la régulation par les métaux lourds (Heuchel et al., 1994), les hormones stéroïdes (Aoyama & Chua, 1997), les chocs thermiques (Brown & Rush, 1990), mais ils présentent des désavantages comme des fuites de production dans l'état désactivé ou des effets pléiotropiques. Des systèmes plus efficaces ont vu le jour : les systèmes à la tétracycline (Gossen & Bujard, 1992), à l'ecdysone (No et al., 1996), (Fussenegger et al., 2000; No et al., 1996, à la streptogramine {Fussenegger, 2000 #140) et le système au cumate dont il est question dans ce travail.

Le système au cumate a été décrit par (Bruno Gaillet et al., 2010; Mullick et al., 2006) et c'est ce système qui est présent dans les cellules CHO utilisées dans ce projet, représenté en B à la Figure 2-7 (activateur inversé). Brièvement, le transactivateur cumate inversé (rcTA) peut activer la transcription au niveau du promoteur CR5 en se liant à la séquence 6xCuO, en présence de cumate. Les cellules non induites présentent cependant une fuite dans la production de protéines (Sheikholeslami et al., 2013b).

(Sheikholeslami et al., 2013a) ont montré que le moment où l'on induit les cellules est très important, ayant un fort impact sur la productivité, car cela affecte la densité cellulaire et la productivité spécifique. En effet, une induction à de faibles densités cellulaires a permis d'atteindre des productivités spécifiques plus importantes, une meilleure longévité de la culture, mais des densités cellulaires plus faibles chez des cellules CHO (Sheikholeslami et al., 2013a). Le temps d'induction optimal (moment où l'on rajoute le cumate) dans cette étude a été de 48 h

après le début de la culture, à une densité cellulaire de 1.10^6 cellules/mL. Ces cultures ont mené à des titres finaux plus élevés. Ces travaux permettent également d'obtenir certaines informations en termes de métabolisme et d'utilisation de nutriment chez les cellules productrices. Les cellules induites à haute densité et présentant des productions spécifiques moins importantes, possèdent une branche oxydative de la PPP moins active (Sheikholeslami et al., 2013a). Les cellules induites, comparées aux non-induites, exhibent un taux de consommation de glutamine plus important et plus faible en glucose (Sheikholeslami et al., 2013b). Les cellules induites présentent une meilleure utilisation du glucose et un flux accru vers le TCA (Sheikholeslami et al., 2013b). De plus, les flux vers la PPP sont plus faibles chez les cellules induites, s'accompagnant d'une diminution de la réaction catalysée par la G6PDH, mais ceci est concordant avec la diminution de la croissance spécifique (Sheikholeslami et al., 2013b).

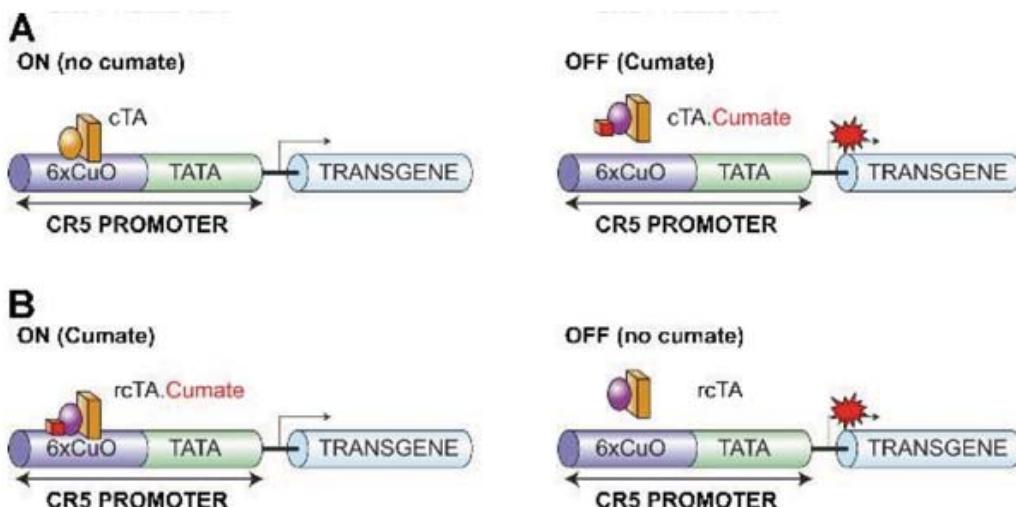


Figure 2-7: Systèmes inductibles au cumate (Bruno Gaillet et al., 2010)

2.2.2 Stratégies anti-apoptose

Deux types de mort cellulaire sont malheureusement observés chez les cellules de mammifères : la nécrose et l'apoptose. La première consiste en le relargage rapide du contenu cellulaire suite à des conditions extrêmes menant à la destruction ou à la perte de l'intégrité de la membrane cellulaire. D'autres parts, les cellules de mammifères soumises à différents stress ne menant pas à la nécrose peuvent activer les mécanismes d'apoptose, ou mort programmée. Des

conditions défavorables de croissance, comme la déplétion en glucose ou en glutamine, en oxygène ou l'accumulation de lactate et d'ion ammonium, entraînent ces signaux et donc la mort cellulaire, ce qui impacte sur la production, et ce même lorsque des stratégies cuvée-alimentée sont appliquées (Birch & Racher, 2006; Stefanie Dietmair et al., 2011; Yih Yean Lee et al., 2009). Il est donc intéressant de pouvoir maintenir la viabilité cellulaire et la production plus longtemps, en prévenant l'apoptose, et ainsi mener à une plus forte production (Birch & Racher, 2006; Costa et al., 2010; Stefanie Dietmair et al., 2011; Yih Yean Lee et al., 2009). Des stratégies de régulation de ce phénomène ont déjà montré avoir été fructueuses, telles que la surexpression de protéines anti-apoptotiques ou l'inhibition de protéines pro-apoptotiques, un meilleur contrôle des nutriments par ajouts périodiques ou l'utilisation du galactose au lieu du glucose (Costa et al., 2010; Stefanie Dietmair et al., 2011). L'élaboration de ces méthodes a été rendue possible par l'identification des molécules et voies impliquées dans la mort programmée.

La réponse apoptotique est très complexe et de nombreuses cascades de signalisation sont impliquées, comme schématisé à la Figure 2-8. Elle consiste en l'activation d'enzymes et de gènes pro- ou anti-apoptotiques menant à la mort cellulaire. Les réponses peuvent cependant être classées selon trois types : la voie mitochondriale, la voie des signaux de transduction de la surface cellulaire et la voie du réticulum endoplasmique (Arden & Betenbaugh, 2004). La plupart des voies aboutissent à l'activation de la voie des caspases, qui préexistent dans un état inactivé, et/ou convergent vers la mitochondrie. Cette dernière contient nombre de protéines pro-apoptotiques telles que le cytochrome c, et les relâche lorsque sa membrane est perturbée (Harris & Thompson, 2000). La famille des protéines bcl-2 contient à la fois des molécules pro-apoptose (contenant les domaines d'homologie BH1, BH2, BH3) et anti-apoptose (homologues de la bcl-2) (Harris & Thompson, 2000). Le relargage du cytochrome c est cruciale dans l'activation de la voie des caspases, et les molécules de la famille bcl-2, qu'elles soient pro- ou anti-apoptotiques, ont une influence sur ce phénomène (Harris & Thompson, 2000). Les molécules pro-apoptotiques Bax et Bak subissent notamment des modifications structurales et altèrent la membrane mitochondriale, ce qui aboutit à la libération de protéines pro-apoptotiques. L'apoptose induite par le réticulum endoplasmique est surtout induite par l'inhibition de la glycosylation, la réduction de la formation des ponts disulfures, et la déplétion du calcium (Oyadomari & E. Araki, 2002). La liaison de ligands aux récepteurs de mort cellulaire sur la surface cellulaire, comme le

TNF (*tumor necrosis factor*), provoque le recrutement de la protéine FADD (*fast-associated death domain*) qui recrute les pro-caspases.

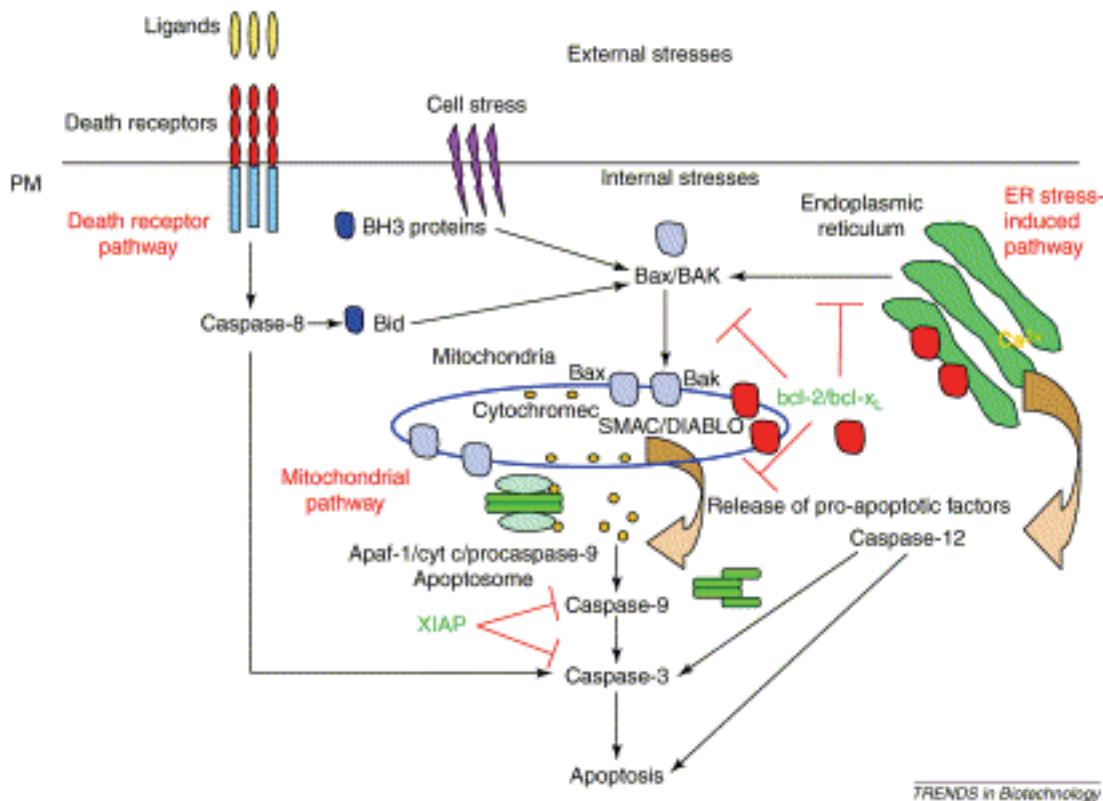


Figure 2-8: Voies menant à l'apoptose (Arden & Betenbaugh, 2004)

La première approche pour contrer l'apoptose consiste en la surexpression de protéines anti-apoptotiques. La surexpression des protéines telles que Bcl-2, Bcl-xl et Mcl-1, a augmenté la survie des cellules CHO et HEK293 soumises à des conditions défavorables de culture, menant à des viabilités améliorées et même de meilleurs titres de protéines en cuvée, cuvée alimentée et perfusion (Birch & Racher, 2006; M. Butler & Meneses-Acosta, 2012; Chiang & Sisk, 2005; Figueroa et al., 2004; Itoh et al., 1995; Majors et al., 2009; Mastrangelo et al., 2000; Tey & Al-Rubeai, 2004). (Templeton et al., 2014) ont montré que la surexpression de Bcl-2delta chez des CHO-S réduit l'accumulation de lactate par une redirection du pyruvate vers l'oxydation mitochondriale, menant à des viabilités et densités cellulaires plus élevées. Ces phénomènes ont été associés avec une augmentation des enzymes isocitrate déshydrogénase et NADH oxidase.

La seconde approche consiste en l'inhibition des protéines pro-apoptotiques. L'élimination des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak conduit à une résistance accrue des

cellules face à l'apoptose induite par la famine, le butyrate de sodium et la staurosporine (Cost et al., 2010). Les protéines de choc thermique telles que HSP27 et HSP70 inhibent les récepteurs de mort par apoptose : leurs surexpressions ont permis de rallonger une culture de CHO jusqu'à 72h et d'augmenter la production dans des cultures en cuvée alimentée (Yih Yean Lee et al., 2009). Les caspases ont également pu être inhibées génétiquement : l'expression de XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) a permis d'augmenter la viabilité de cultures de CHO et HEK293 (T.M. Sauerwald et al., 2002; Tina M. Sauerwald et al., 2003).

L'ingénierie du milieu de culture peut également être une possibilité. Le sérum est un agent de protection efficace de par son contenu en protéines et autres facteurs de croissance, mais il ne peut être utilisé en raison de la réglementation en milieu pharmaceutique. La suramine, qui inhibe la liaison de multiples facteurs de croissance avec leur récepteur, protège de l'apoptose en phase exponentielle, augmentant la viabilité et même la production (Zanghi et al., 2000). Il est également possible d'inhiber la cascade des caspases en ajoutant des inhibiteurs, comme Ac-DEVO-cho et z-VAD-fmk, qui ont permis de supprimer ce phénomène dans une culture d'hybridomes privées de glutamine (Tinto' et al., 2002).

Bien sûr, il est intéressant de prolonger la viabilité des cultures mais il est nécessaire que cela ait un impact bénéfique sur la production. La question est de savoir si l'augmentation de la durée de la culture se translate en une augmentation de la production. Aussi, par exemple, le prolongement de la durée de la culture a permis d'augmenter 2,5 fois le titre d'interférons- γ dans une culture de CHO grâce à la surexpression des protéines de choc thermique (Yih Yean Lee et al., 2009). L'expression du gène 30Kc6 chez des cellules CHO a permis une augmentation du titre d'EPO de 5 à 10 fois (Choi et al., 2006).

2.2.3 Diminuer l'accumulation de déchets toxiques

Il est bien connu que le lactate et l'ion ammonium, sous-produits de culture cellulaire, sont néfastes, à haute concentration, aux cellules. Particulièrement pour les cellules CHO en culture *in vitro*, leur métabolisme est généralement rapporté comme étant inefficace et entraînant l'accumulation de ces sous-produits dans le temps, posant alors un problème de toxicité car ils affectent la croissance et la viabilité des cellules, donc la production par extension (Stefanie Dietmair et al., 2011). En effet, une concentration de 5,1 mM d'ion ammonium inhibe la croissance de cellules CHO et une concentration de 58 mM de lactate diminue la viabilité

cellulaire (Xing et al., 2008). De plus, l'ion ammonium cause une baisse de la sialylation, notamment en augmentant le pH de l'appareil de Golgi (Michael Butler, 2005). De ce fait, plusieurs stratégies ont visé la limitation de l'accumulation de ces déchets métaboliques dans le milieu de culture.

La substitution des sources classiques de nutriments dans le milieu de culture par d'autres composés représente une stratégie permettant de réduire l'accumulation des déchets métaboliques. La substitution simultanée du glucose par le galactose et de la glutamine par le glutamate en mode cuvée alimentée a permis de limiter la production de ces sous-produits toxiques (0 mM vs 16 mM) pour le lactate et 2,5 mM vs 9 mM pour l'ion ammonium) (Altamirano et al., 2000; Altamirano et al., 2004). Ces composés ont montré être consommés plus lentement que le couple glucose/glutamine, ce qui favorise la re-consommation de lactate. Toutefois, leur substitution simultanée entraîne également une croissance plus faible. L'alternative de ne substituer que la glutamine par le glutamate permet d'obtenir une densité cellulaire maximale plus élevée que la culture contrôle avec des niveaux de lactate réduits (7 mM vs 16 mM) et très peu d'ion ammonium produit (1 mM vs 9 mM) (Altamirano et al., 2000). En remplaçant le glucose pour du fructose et par transfection avec le transporteur GLUT, les cellules ont produit moins de lactate, atteignant des densités cellulaires 3 fois plus élevées qu'avec du glucose pour le meilleur clone étudié (Wlaschin & Hu, 2007). La substitution de la glutamine par le glutamate se fait principalement via le système GS (glutamine synthétase) qui est décrit dans la section 2.3.4 Sélection des clones, car la machinerie des cellules n'est pas naturellement équipée pour synthétiser de la glutamine à partir du glutamate. Cette substitution a permis d'augmenter la production spécifique de CHO de 1,7 fois et d'augmenter le degré de glycosylation du produit ainsi que d'améliorer les résultats pour la cytotoxicité dépendante du complément, via la réduction de l'ion ammonium (Hong et al., 2010). La substitution du glucose par du mannose a aussi donné de bons résultats, soit : (Berrios et al., 2011) une baisse de 25-35 % du taux de production de lactate comparé aux cultures avec glucose de cellules CHO produisant la t-PA recombinante, accompagnée d'une plus haute densité cellulaire et une production volumique augmentée. (H-S Park et al., 2000) ont réussi à réduire de 25-33 % l'accumulation d'ion ammonium en opérant une conversion de l'ammonium en citrulline, par l'introduction des gènes de la carbamyl-phosphate synthétase I et de la ornithrine transcarbamoylase chez des CHO DHFR. Ce résultat s'accompagnait d'une croissance 15-30% plus rapide.

D'autres stratégies ont ciblé directement les voies métaboliques ayant un lien avec la production de ces sous-produits. Afin de réduire la production de lactate, la lactate déshydrogénase, qui catalyse la conversion du pyruvate en lactate, peut être inhibée, ou la pyruvate carboxylase qui catalyse la carboxylation du pyruvate en oxaloacétate, peut être surexprimée, pour contrer la transformation du pyruvate en lactate. Dans leur étude métabolique, (Ghorbaniaghdam et al., 2014a) ont d'ailleurs montré que les clones hautement productifs ont un métabolisme du lactate plus efficace, produisant moins de lactate avec une activité de la lactate déshydrogénase diminuée. (Chen et al., 2001) ont triplé la production d'anticorps anti-fibronectine en divisant par deux la production spécifique de lactate par inhibition de la lactate déshydrogénase dans une lignée hybridome. (SH Kim & Lee, 2007) ont également réduit substantiellement le taux de production de lactate chez une lignée CHO en inhibant la LDH avec des siARN, menant au double du titre maximal de thrombopoïétine pour certains clones. Finalement, la surexpression de la PYC dans une lignée HEK293 a permis de réduire la production de lactate et d'ion ammonium, de diminuer la consommation de glutamine et de glucose, tout en entraînant des densités cellulaires plus élevées (Henry & Durocher, 2011; Vallée et al., 2014).

Limiter le taux d'utilisation des glucides semble être important pour rendre le métabolisme plus efficace et réduire la production de lactate (Stefanie Dietmair et al., 2011). Les stratégies en cuvée-alimentée sont à ce sujet très utilisées pour maintenir le métabolisme des cellules à un niveau optimal, en apportant la quantité de nutriments minimale nécessaire tout au long de la culture. (Cruz et al., 2000b) ont à ce propos, réussi à augmenter non seulement la croissance, la viabilité, la densité maximale et la longévité de la culture, mais aussi le titre final dans une culture de cellules BHK21 en imposant une consigne de 0,3 mM en glucose et 0,2 mM en glutamine. Les productions de lactate et d'ion ammonium étaient clairement réduites. L'étude de (Y. Y. Lee et al., 2003) a mené à une augmentation 10 fois supérieure de l'infection lors de la culture de cellules HEK293 pour la production d'adénovirus par une stratégie en cuvée-alimentée maintenant des niveaux de glutamine bas. Cependant, dans l'étude de (Wong et al., 2005), des niveaux très limitants de glutamine (0,3 mM) ont permis d'augmenter de 10 fois la production d'interférons chez des cellules CHO, mais les protéines ont perdu en sialylation.

Une autre option, plutôt que de chercher à prévenir la formation des déchets métaboliques présentant une toxicité pour les cellules et le bioprocédé, est de les enlever en cours de culture.

Ceci peut être fait, par exemple, en utilisant une membrane hydrophobe pour séparer l'ammonium du milieu (Schneider et al., 1997). La dialyse, via une boucle de recirculation, permet également de retirer les petites molécules problématiques. Toutefois, cette technique présente le désavantage de retirer les nutriments en même temps, ce qui peut nuire à la productivité et à la viabilité cellulaire.

2.2.4 Modélisation du métabolisme

Le métabolisme cellulaire est un réseau très complexe et interconnecté, coordonné, contenant de l'ordre du millier de réactions. Compte tenu que l'optimisation des bioprocédés est un objectif complexe et dépendant du cas à l'étude, un modèle mathématique capable de décrire le métabolisme cellulaire constituerait un outil de taille en ingénierie métabolique. On pourrait notamment, utiliser une telle plateforme *in silico* à des fins de prédiction du comportement cellulaire et donc de cultures industrielles, ce qui permettrait des gains considérables dans le temps requis pour identifier les conditions de culture et d'amélioration génétique optimisant la productivité d'un produit par une lignée cellulaire. Aussi, l'essor des multi-omiques (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique, fluxomique) permet dorénavant d'obtenir des données caractérisant l'état physiologique des cellules, et leur incorporation dans des modèles mathématiques pourraient mener à une compréhension fondamentale du comportement cellulaire menant à de nouvelles stratégies d'améliorations (Kildegaard et al., 2013).

Les propriétés complexes du métabolisme cellulaire ne peuvent pas être décryptées uniquement en mesurant les concentrations des métabolites mais doivent être intégrées à des modèles mathématiques, car ce sont les flux (i.e. taux réactionnels) qui quantifient le mieux l'état et la dynamique du réseau des interactions entre gène-protéine-métabolite (Sauer, 2006). Voici, en bref, des caractéristiques courantes en modélisation de cultures et de comportement cellulaire. Les modèles structurés considèrent les phénomènes internes de la cellule, à savoir la compartimentation et/ou les réactions biochimiques et intermédiaires métaboliques. Un modèle ségrégué considère, de plus, les cellules selon les différentes phases de croissance en sous-populations. Un système d'équation sera qualifié de sur-déterminé s'il possède plus de mesures de flux que nécessaires; le nombre de mesures requises étant défini en termes de degré de liberté, correspondant au nombre de flux à évaluer moins le nombre de bilans massiques sur les métabolites. Ceci peut être exploité pour obtenir de meilleures estimées des flux non mesurables.

À l'inverse, dans un système sous-déterminé, le nombre de flux mesurés est inférieur au degré de liberté du système et il y a alors une infinité de solutions. Le problème peut être pallié en optimisant une fonction spécifique et en utilisant la programmation linéaire. C'est la mesure des flux qui permet d'appréhender les interactions entre les différents réseaux cellulaires et non les concentrations à un instant « t ». Mais les flux sont dépendant du temps, et ne peuvent donc être mesurés directement; ils doivent être extrapolés à l'aide de modèles et de quantités mesurables (Sauer, 2006). Celles-ci incluent les taux de consommation et de production. Le modèle mathématique doit être capable de prévoir l'introduction de perturbations environnementales ou génétiques, notamment lors de l'ajout de nutriments pour l'augmentation de la production.

Les taux de réaction sont fonctions de la cinétique enzymatique (concentrations en substrats et co-substrats) et des activations ou inhibitions (d'autres molécules). Ceci peut être modélisé par des équations de Michaelis-Menten modifiées comme montré au Tableau 1. La croissance cellulaire est plus complexe à modéliser. Pour modéliser le taux spécifique de croissance, c'est l'équation de Monod qui est la plus utilisée, et s'est d'ailleurs inspirée de l'expression de Michaelis-Menten. D'autres modèles ont aussi été développés comme montré au Tableau 2.

(Selvarasu et al., 2012) ont utilisé la combinaison d'un modèle *in silico* et d'analyse de métabolites pour caractériser une culture de CHO en mode cuvée alimentée et identifier les limitations liées à la croissance cellulaire. (Rath et al., 2014) ont montré que la dynamique des métabolites intracellulaires était menée principalement par la dynamique des taux spécifiques de consommation de glucose et glutamine, en modélisant une culture de cellules AGE1.HN.AAT en mode cuvée. De plus, ils proposent que la surexpression de la GLNase ou du transporteur GLUT permettrait d'améliorer la croissance.

Tableau 1 Équation d'activation et d'inhibition des enzymes (Robitaille, 2015)

Phénomène	Équation
Inhibition compétitive	$V = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m(1 + [I]/K_I)}$
Inhibition non compétitive	$V = \frac{V_{\max} / (1 + [I]/K_I)[S]}{[S] + K_m}$
Inhibition incompétitive	$V = \frac{V_{\max} / (1 + [I]/K_I)[S]}{[S] + K_m / (1 + [I]/K_I)}$
Activation non essentielle	$V = \frac{V_{\max}[S](1 + \beta[A]/\alpha K_A)}{K_S(1 + [A]/K_A) + [S](1 + [A]/\alpha K_A)}$

Tableau 2 Équations du taux spécifique de croissance (Robitaille, 2015)

Modèle	Équation
Équation de Monod	$\frac{\mu_m S}{K_s + S}$
Équation de Tessier	$\mu_m(1 - e^{-KS})$
Équation de Moser	$\frac{\mu_m S^n}{K_+ + S^n}$
Équation de Contois	$\frac{\mu_m S^n}{K_{cv}X + S^n}$
Inhibition par le substrat (non compétitif)	$\frac{\mu_m S}{K_s + S + S^2 / K_I}$
Inhibition par le substrat (compétitif)	$\frac{\mu_m S}{K_s(1 + S / K_I) + S}$

Un modèle dynamique du métabolisme central du carbone de cellules CHO, productrices d'un activateur de plasminogène recombinant, a été réalisé dans notre laboratoire sur MatLab (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA). Le modèle, dont le réseau est présenté à la Figure 2-9, inclut les voies principales du métabolisme, à savoir la glycolyse, la voie des pentoses phosphates, le cycle des acides tricarboxyliques, la glutaminolyse et la respiration cellulaire.

Ce modèle a été utilisé dans plusieurs optiques et sa capacité descriptive a été validée pour:

- décrire le comportement des voies métaboliques de CHO productrices de plasminogène (Ghorbaniaghdam et al., 2013)
- étudier l'effet de l'induction au butyrate de sodium (Ghorbaniaghdam et al., 2013)
- décrire le comportement de cellules CHO productrices d'IgG et possédant un système inductible au cumate (Ghorbaniaghdam et al., 2014a)
- l'analyse de la variation clonale entre les hauts producteurs et faibles producteurs de ces mêmes cellules (Ghorbaniaghdam et al., 2014a)
- étudier la régulation de la glycolyse (Ghorbaniaghdam et al., 2014b)
- étudier son utilisation à décrire une culture opérée en mode cuvée alimentée (Robitaille et al., In press)

Ce modèle (Ghorbaniaghdam et al., 2014a) a enfin été utilisé lors d'un travail préliminaire à ce projet, pour identifier des pistes d'ingénierie cellulaire en vue d'une augmentation de la production (données non publiées) (N Pham, 2013). Les vitesses maximales de plusieurs enzymes décrites par le modèle ont été modifiées et l'impact sur la production a été évalué. La G6PDH/6PGD, qui sont regroupées sous une seule vitesse dans le modèle, ont montré des résultats prometteurs comme présenté à la Figure 2-10. Le modèle prédit, avec l'augmentation des vitesses de ces enzymes, une augmentation de la production d'anticorps jusqu'à un facteur 2.

Les prédictions du modèle étant en accord avec la littérature mentionnée à la section 2.2.6 Le rôle et l'intérêt de la G6PDH, il est donc intéressant de se concentrer sur la G6PDH et ainsi voir si le modèle a une capacité prédictive. Une déviation des résultats expérimentaux avec le modèle conduirait notre groupe de recherche à en améliorer la structure.

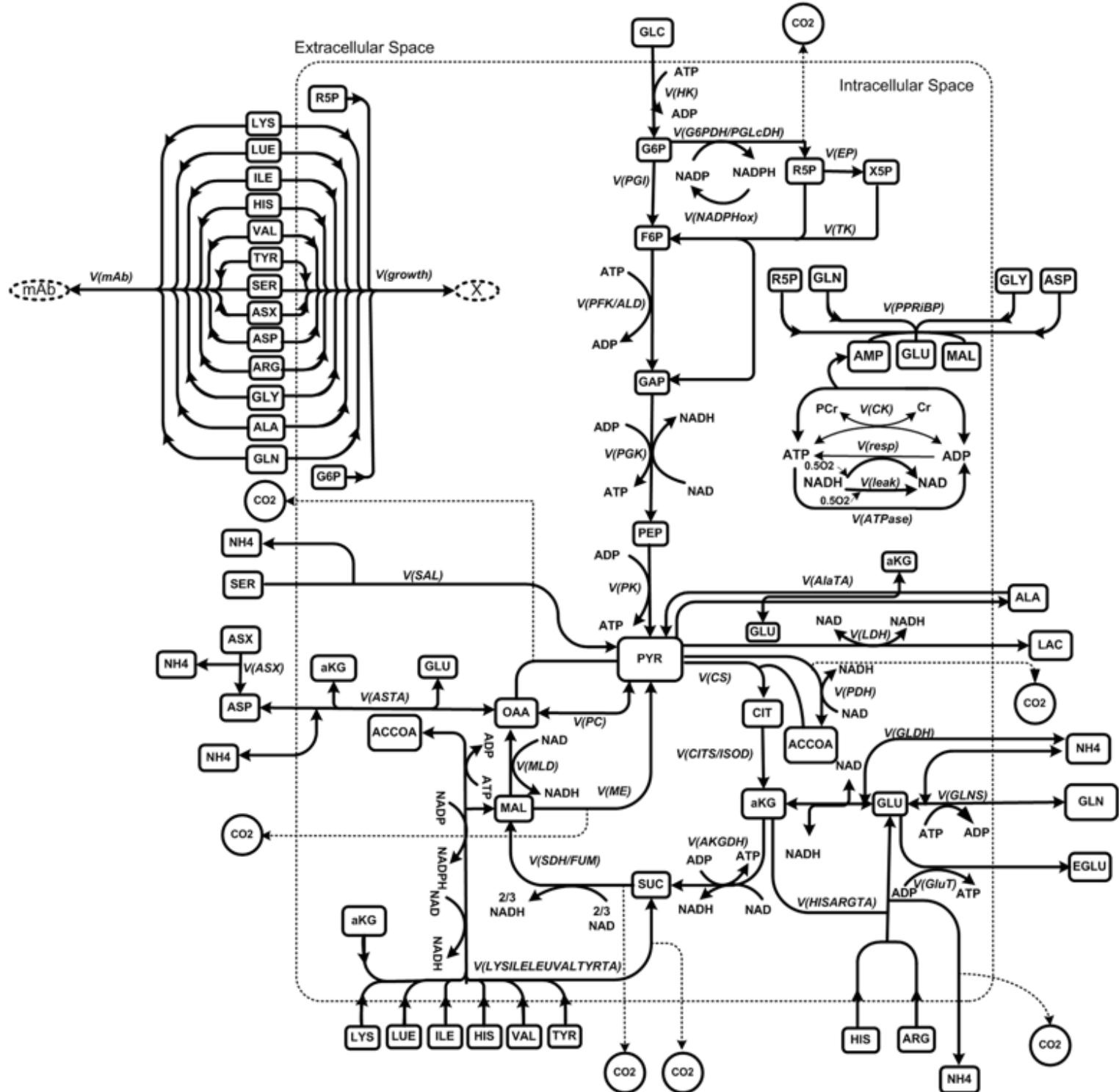


Figure 2-9: Représentation du modèle métabolique (Ghorbaniaghdam et al., 2014a)

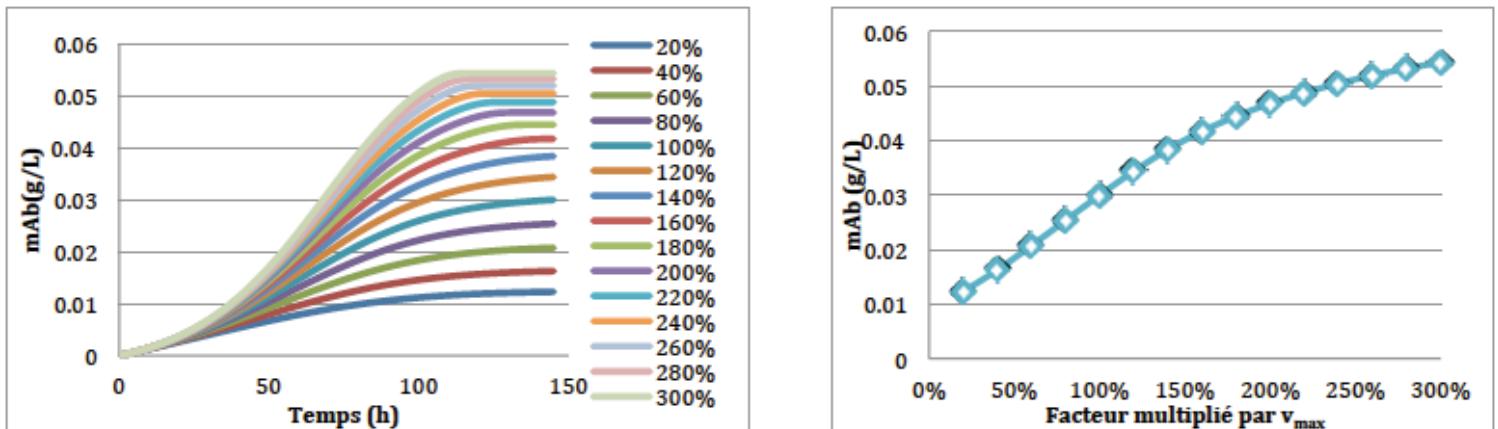


Figure 2-10: Augmentation de la production d’anticorps simulée avec le modèle métabolique pour la G6PDH/6PGD (à gauche : production en fonction du temps pour différents v_{max} , à droite : titre maximal en fonction du v_{max}) (N Pham, 2013)

2.2.5 Analyses des flux métaboliques

L’analyse des flux métaboliques (MFA) a pour but de quantifier les taux des réactions biochimiques intracellulaires. L’identification des voies métaboliques en jeu permet par ricochet d’identifier des gènes à inhiber ou sur-exprimer afin de diriger le métabolisme vers un fonctionnement plus efficace et une production augmentée. Les études métaboliques prennent ainsi tout leur sens lorsque l’on compare la répartition des flux de diverses lignées, diverses conditions de culture et/ou perturbations. Les diverses méthodes et approches de MFA permettent de : quantifier les flux métaboliques, identifier les nœuds rigides dans le réseau qui résistent aux changements de flux, identifier les voies métaboliques alternatives qui sont utilisées sous certaines conditions, calculer les flux extracellulaires non mesurés et calculer les taux théoriques maximum (Stephanopoulos et al., 1998).

La MFA est essentiellement contrainte et basée sur la stoechiométrie décrivant la conversion des substrats, incluant les intermédiaires métaboliques, en produits métaboliques ou biomasse, selon les conditions assurant que l’accumulation aux nœuds internes d’un réseau est mineure comparée aux flux qui traversent le nœud (Quek et al., 2010; Stephanopoulos et al., 1998). Le système est donc considéré dans un état quasi-stationnaire et la concentration X_i des

métabolites est petite (Quek et al., 2010). En considérant X_{met} le vecteur des concentrations en métabolites et r_{met} le vecteur contenant les taux net de formation des métabolites de A réactions intracellulaires sur B voies métaboliques, le bilan massique est:

$$\frac{dX_{\text{met}}}{dt} = r_{\text{met}} - \mu X_{\text{met}} \quad (1)$$

On suppose que les conditions de culture permettent que l'ordre de grandeur des flux soit largement supérieur au phénomène de dilution par division cellulaire, i.e. que les concentrations en métabolites intracellulaires sont rapidement ajustées face aux perturbations. Il est alors permis d'écrire que :

$$r_{\text{met}} = \mu X_{\text{met}} \quad (2)$$

Et de plus, en assumant que le facteur de dilution lié à la croissance est négligeable :

$$r_{\text{met}} = 0 = G^T v \quad (3)$$

où G est une matrice contenant les coefficients stoechiométriques dans les A réactions pour les intermédiaires métaboliques et v est la matrice des vitesses réactionnelles.

Un cas particulier de la MFA, la MFBA (*Metabolic flux balance analysis*) est une solution pour les taux de réaction qui est obtenue en optimisant une fonction particulière du réseau, supposant donc un fonctionnement optimal des cellules. Plus complexe, la MCA (*Metabolic control analysis*) sera utilisée pour questionner le degré de contrôle d'une enzyme sur une voie ou un réseau métabolique.

Pour réaliser ce type d'étude ou même valider les flux déterminés, il est requis de mesurer les concentrations en métabolites, car elles représentent directement l'état physiologique des cellules (Oldiges et al., 2007). Les taux de consommation et de production, à savoir les flux de ce qui entre et sort des cellules, sont normalement facilement quantifiables. Ces taux peuvent être obtenus par des expériences en chémostat en état stationnaire ou même en cuvée (Stephanopoulos et al., 1998). Mais les expériences en chémostat sont longues et celles en cuvée, bien que plus courtes, nécessitent les calculs des dérivées des concentrations en fonction du temps ce qui mène à des erreurs d'estimés plus importantes. Des données intracellulaires sont cependant nécessaires pour obtenir des informations qui ne sont pas basées sur des suppositions, et cela peut se faire par des expériences de traçage. Typiquement, l'utilisation de substrats marqués au ^{13}C (ou du ^{14}C ou même des acides aminés au ^{15}N) et de la distribution du marquage dans les différents

intermédiaires métaboliques permet de reconstituer la distribution des flux (Sauer, 2006), comme montré à la Figure 2-11. L'asymétrie induite par ce marquage pourra être retrouvée dans les intermédiaires métaboliques et les produits finaux. Les informations récupérées dépendent du type de substrat utilisé, de l'atome en particulier qui est marqué, et des métabolites dont on mesure l'enrichissement (Bailey & Ollis, 1986). Le protocole d'échantillonnage pour mesurer les différentes concentrations doit être maîtrisé : il est très important d'arrêter toute activité métabolique par exemple par une baisse drastique de la température, et ensuite d'extraire les métabolites par lyse cellulaire (Oldiges et al., 2007; Sellick et al., 2010). Les extraits intra- et extra-cellulaires pourront être analysés par diverses techniques telles que la RMN, des techniques de chromatographie, des essais enzymatiques et la spectroscopie de masse (Oldiges et al., 2007).

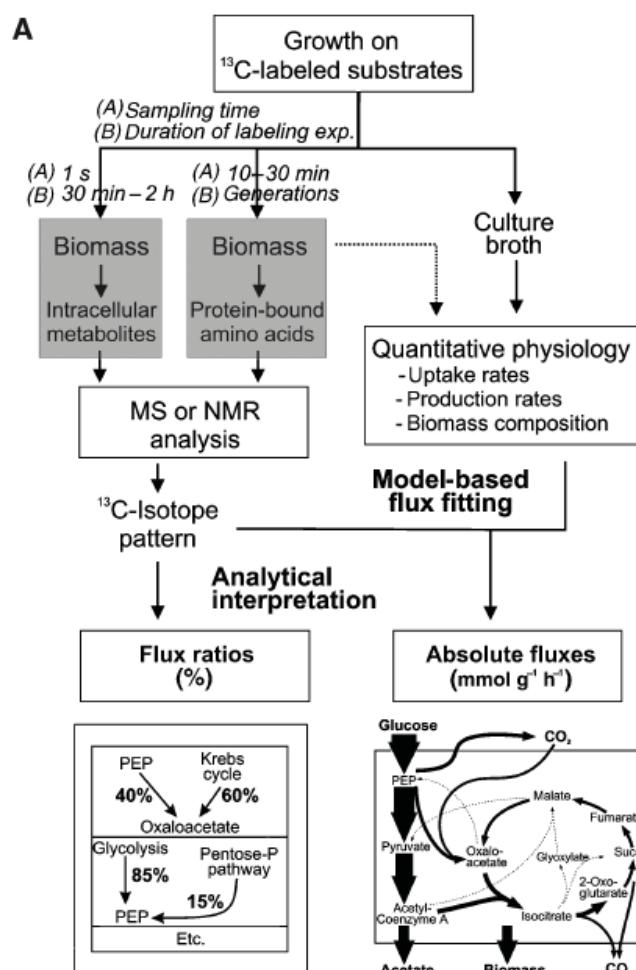


Figure 2-11: Aperçu schématique de l'analyse de flux basée sur le marquage au ^{13}C (Sauer, 2006)

(Goudar et al., 2010) ont analysé l'état physiologique d'une culture de CHO en perfusion en utilisant du ^{13}C -glucose et des analyses par RMN-2D. Ils ont comparé les flux estimés avec la balance des métabolites et ceux avec le traçage. La plupart étaient concordants, sauf pour les acides aminés. Les flux vers la PPP n'ont pu être estimés qu'avec le marquage. En utilisant une approche par MFBA, (HW Lee et al., 2015) ont étudié l'influence de la variabilité inter-lots d'hydrolysat de blé, utilisé pour améliorer la croissance et la production de cellules CHO. Les différences observées au niveau du métabolisme étaient en accord avec la variation des lots, notamment en ce qui concerne le catabolisme des acides aminés contenus dans l'hydrolysat. (Henry et al., 2011) ont réalisé une étude isotopique au $1\text{-}^{13}\text{C}$, $2\text{-}^{13}\text{C}$, $6\text{-}^{13}\text{C}$, $\text{U-}^{13}\text{C}$ glucose et à la $\text{U-}^{13}\text{C}$ glutamine sur des cellules HEK293 et ont observé que la production de lactate provenait dans une proportion de 77% du glucose métabolisé par les cellules et que seulement 22% était converti en acétyl-CoA pour la production d'énergie. La glutamine ne participait pas significativement à la production de lactate. Dans leur étude au $1\text{-}^{13}\text{C}$, $6\text{-}^{13}\text{C}$ et $\text{U-}^{13}\text{C}_6$ glucose et à la $\text{U-}^{13}\text{C}_5$ glutamine sur des CHO possédant un système inductible au cumate, (Sheikholeslami et al., 2013b) ont montré que les cellules induites utilisait le glucose plus efficacement et que le flux du pyruvate vers le TCA était plus grand. (Nicolae et al., 2014) ont montré que la compartimentation du métabolisme est importante en utilisant du $\text{U-}^{13}\text{C}$ glucose dans une culture de CHO en mode cuvée. L'utilisation de deux traceurs isotopiques dans des expériences parallèles, du $1,2\text{-}^{13}\text{C}$ glucose et de la $\text{U-}^{13}\text{C}$ glutamine, lors d'une culture de CHO a permis d'observer un changement métabolique entre les phases de croissance et de production (Ahn & Antoniewicz, 2013). Cette étude a montré que la phase exponentielle se caractérise par des flux forts vers la glycolyse et un PPP inactif alors que pendant la phase stationnaire, les flux vers la glycolyse ont été réduits par un facteur 5 et la PPP était activée. Ce phénomène vient conforter les résultats du modèle métabolique mentionnés à la section précédente et va être décrit plus en détails dans la section suivante.

2.2.6 Le rôle et l'intérêt de la G6PDH

Plusieurs voies métaboliques intéressantes ont déjà été abordées dans les sections précédentes, notamment le cycle des acides tricarboxyliques, en tant que cible d'amélioration métabolique. Aussi, en tenant compte de l'ensemble de ce qui précède, il a été jugé pertinent de concentrer le présent travail, sur la voie des pentoses phosphates. Cette section présente donc une

revue de littérature sur ce qui a déjà été fait et obtenu sur cette voie. Un résumé est présenté au Tableau 3.

La G6PDH est l'enzyme considérée comme limitante de la voie des pentoses phosphates (Gupte et al., 2011; Stanton et al., 1991; W-N Tian et al., 1998; Zhang et al., 2012). Le NADPH, principale molécule réductrice, est produite majoritairement par cette enzyme via la voie des PPP, ainsi que par l'enzyme suivante du cycle, la 6PGDH (Flores et al., 2004; Gupte et al., 2011; J Park et al., 2006; Stanton et al., 1991; W-N Tian et al., 1998; WN Tian et al., 1999; Zhang et al., 2012). Le NADPH peut également être produit via l'enzyme malique et l'isocitrate déshydrogénase, mais en quantité moindre (Henry et al., 2011; Stanton, 2012). Les rôles du NADPH comprennent le maintien du système redox, la synthèse d'acides gras, d'oxyde nitrique, le système cytochrome p450 (Gupte et al., 2011; Henry et al., 2011; Pandolfi et al., 1995; Stanton, 2012; WN Tian et al., 1999; Zhang et al., 2012), et il joue un rôle dans toutes les réactions réductrices (Fang et al., 2013). De manière intéressante, le NADPH est à la fois pro- et antioxydatif, car il est non-seulement requis dans les mécanismes antioxydants contre les ROS mais aussi pour leur production (J Park et al., 2006). La PPP produit le ribose-5-phosphate et l'érythrose-4-phosphate, requis à la biosynthèse des nucléotides, acides aminés et coenzymes (Duan et al., 2010; Fang et al., 2013; W-N Tian et al., 1998; Ursini et al., 1997; Wang & Engel, 2009). (Stanton et al., 1991; W-N Tian et al., 1998) suggèrent que la G6PDH serait préexistante dans un état inactivé; les facteurs de croissance activant la G6PDH. Le ratio NADPH/NADP⁺ régule l'activité de la G6PDH (Stephanopoulos et al., 1998). En termes de flux, entre 3-15% du glucose consommé est dirigé vers la PPP chez les cellules HEK (Henry et al., 2011).

De nombreuses études suggèrent l'importance de la G6PDH dans la régulation de la croissance cellulaire, notamment via le NADPH. (W-N Tian et al., 1998) ont utilisé les cellule Balb/c 3T3 et A31, COS-7, Swiss 3T3 et PC12 pour montrer que l'augmentation de son activité stimule la croissance cellulaire, et serait due à de faibles augmentations de la quantité de l'enzyme mais aussi à la stimulation de l'enzyme déjà sécrétée. À l'inverse, l'inhibition de la G6PDH, en augmentant le stress oxydatif, augmente le détachement cellulaire et diminue l'adhérence (W-N Tian et al., 1998). Comme la mort cellulaire a été mise en parallèle avec les dérivés réactifs de l'oxygène, la balance redox et donc le NADPH semblent importants. Dans l'étude de (WN Tian et al., 1999), l'inhibition de la G6PDH a rendu les cellules plus sensibles à l'H₂O₂ (simulant le stress oxydatif) et a donc augmenté la mort cellulaire, alors qu'au contraire,

une surexpression les a rendues moins sensibles. Chez *E. coli*, la production via des plasmides est couteuse en énergie et altère la croissance, et il se peut que la voie PPP, dont proviennent les précurseurs des nucléotides et des acides aminés, soit dépassée par la demande cellulaire (Flores et al., 2004; Heyland et al., 2011). L'augmentation de l'activité de la G6PDH chez des mutants à croissance réduite, en raison de la charge métabolique augmentée, a provoqué une augmentation de la croissance spécifique des cellules, et une croissance normale a été partiellement retrouvée chez des bactéries supportant des plasmides multicopies par rapport à la lignée parentale (Flores et al., 2004).

Comme cela a déjà été abordé précédemment, l'augmentation des ROS a un effet négatif et donc un rôle dans plusieurs maladies telles que les cancers et les maladies cardiovasculaires (J Park et al., 2006; Ralser et al., 2007; Ursini et al., 1997; Zhang et al., 2012), et il a été démontré que la surexpression de la G6PDH protège du stress oxydatif chez de nombreux types cellulaires (Ursini et al., 1997). La redirection des flux vers la PPP chez les levures permet de contrer le stress oxydatif (Ralser et al., 2007). Le NADPH joue notamment un rôle dans les mécanismes antioxydants, et une augmentation des ARNm de la G6PDH a été observée chez les cellules d'hépatome humaines HepG2, Hep3B et les JURKAT T après exposition à ce stress (Ursini et al., 1997). On a observé une baisse de l'activité de la G6PDH causée par le diabète dans les cellules de Leydig et de reins de rats, ce qui contribue au stress oxydatif (Calvo et al., 1979; Xu et al., 2005). Toutefois, certains résultats se sont avérés contradictoires: la surexpression de la G6PDH dans les tissus adipeux de souris obèses et diabétiques a stimulé le stress oxydatif et les signaux inflammatoires (J Park et al., 2006). Sa surexpression chez des cellules WEHI7.2 (cellules de lymphomes) a non seulement augmenté la quantité de NADPH intracellulaire mais a rendu les cellules plus sensibles au stress oxydatif (la perte du transgène entraîne la perte de la sensibilité), simulant un état privatif en glucose en raison de la compétition entre la glycolyse et la PPP (Tome et al., 2006). Mais cette compétition peut être mise en parallèle avec les résultats de (Zhang et al., 2012): des concentrations de glucose élevées diminuent les quantités de G6PDH et NADPH, altérant ainsi la balance redox de cellules vasculaires endothéliales, ce qui est en accord avec les résultats de (Xu et al., 2005). La surexpression de la G6PDH ou l'inhibition de la PKA (qui inhibe la G6PDH) restaurent la balance redox (Zhang et al., 2012).

Enfin, des chercheurs ont déjà tenté de diriger les flux vers la PPP via la surexpression de la G6PDH à des fins d'augmentation de la production chez les bactéries et les levures. La

surexpression de 3 enzymes (phosphoribosyle pyrophosphate synthétase, glucose-6-phosphate déshydrogénase, 6-phosphogluconate déshydrogénase) a entraîné une augmentation de 128 % de la production de cytidine chez *E. coli* CYT15 (Fang et al., 2013). Il est intéressant ici de noter que la surexpression d'un seul des gènes entraîne une légère augmentation (entre 13 et 26%). (Shi et al., 2013) ont réussi à augmenter la production de L-isoleucine, un acide aminé, chez *Corynebacterium glutamicum* ssp. *lactofermentum* en surexprimant la G6PDH plus la NAD kinase, en augmentant l'approvisionnement en NADPH puisque c'est le cofacteur le plus important pour sa production. Une plus forte activité de la G6PDH a permis d'augmenter la production de xylitol chez *Saccharomyces cerevisiae*, pour laquelle le NADPH est un cofacteur (Kwon et al., 2006).

Les progrès récents dans les études métaboliques de cellules de mammifères ont permis de mieux caractériser le rôle de la PPP lors de la production de protéines. Le flux vers la PPP et l'activité de la G6PDH sont plus faibles chez les cellules recombinantes induites que chez les non-induites au cumate (Sheikholeslami et al., 2013b). Mais cette baisse concorde avec la diminution du taux de croissance, qui réduit les besoins biosynthétiques, et la baisse de formation de NADPH via la PPP semble être compensée par l'enzyme malique (Sheikholeslami et al., 2013b). Cette compensation apparaît également dans l'étude de (Henry & Durocher, 2011), alors que les cellules exprimant la PYC recombinante affichent un flux réduit vers la PPP par rapport à la lignée parentale. Chez les cellules qui ont été induites à haute densité et présentaient des productions spécifiques et taux de croissance moins importants, la branche oxydative de la PPP était moins importante que chez les cellules induites à basse densité (Sheikholeslami et al., 2013a). (Ghorbaniaghdam et al., 2014a) ont montré que le v_{max} G6PDH était sensible dans leur modèle métabolique de cellules CHO productrices d'IgG. Comme mentionné précédemment, ce modèle a été utilisé dans notre laboratoire à des fins de prédictions et l'augmentation de la vitesse maximale de réaction de la G6PDH de 20 à 500% a entraîné des titres d'anticorps plus élevés lors de la modélisation (résultats non publiés, voir section 2.2.4 Modélisation du métabolisme). (Ahn & Antoniewicz, 2011; Sengupta et al., 2011; Neil Templeton et al., 2013) ont montré par analyse des flux métaboliques que le pic de production d'une lignée CHO hautement productrice cultivée en mode cuvée alimentée coïncidait avec les phases tardives de culture. En phase exponentielle, les flux étaient principalement dirigés vers la glycolyse et très peu vers la PPP, alors que dans les phases tardives (exponentielle tardive et stationnaire) le flux vers la PPP était maximal,

probablement en réponse à la baisse du ratio NADPH/NADP⁺. Le pic de production maximale correspondait donc avec la redirection des flux vers la PPP et (Neil Templeton et al., 2013) suggèrent que cette augmentation du flux pourrait être une réponse à l'augmentation de la synthèse du produit. Les auteurs suggèrent tout de même, comme leurs prédecesseurs (Sengupta et al., 2011), qu'une augmentation en NADPH est utilisée pour combattre le stress oxydatif. (Sengupta et al., 2011) avaient déjà observé que 97% du glucose consommé se dirigeait vers la PPP dans les phases tardives de la culture de CHO productrices, produisant de grandes quantités de NADPH, pour contrer le stress oxydatif. (Ahn & Antoniewicz, 2011) ont eux aussi observé chez des CHO adhérentes en cuvée alimentée une forte glycolyse et production de lactate en phase de croissance et un fort flux vers la PPP dans les phases tardives, mais le cycle du TCA restait similaire. (Dean & Reddy, 2013) ont également suggéré que les hauts producteurs étaient ceux capables d'activer ce métabolisme oxydatif. Le faible flux de la PPP en phase de croissance laisse penser qu'une quantité importante de NADPH n'est pas nécessaire pour la croissance, car elle résulterait plutôt de l'apport d'acides aminés extracellulaires, ou bien que l'enzyme malique est préférée pour la production de NADPH.

Ces études indiquent un commutateur métabolique qu'il serait intéressant d'exploiter en vue d'augmenter la production de protéines, et c'est ce qui a été supposé dans ce projet. Les éléments précédents font donc de la G6PDH une bonne candidate pour la modulation du métabolisme central du carbone chez les cellules de mammifères et l'ingénierie des flux vers la PPP.

Tableau 3 Récapitulatif des études liées à la G6PDH

Traitement	Cellules	Effets	Référence
Isolation de mutants G6PDH ⁻	CHO	Mêmes propriétés de croissance que les cellules non déficientes	(Rosenstraus & Chasin, 1975)
Exposition à des facteurs de croissance (EGF et PDGF)	RCC	Augmentation de l'activité de la G6PDH (25% à 27%)	(Stanton et al., 1991)
Inactivation de la G6PDH	AB1 ES	Croissance inhibée à haute densité Augmentation de la sensibilité à l'H ₂ O ₂ (stress oxydatif)	(Pandolfi et al., 1995)
Exposition à l'H ₂ O ₂	Jurkat, HepG2, Hep3B	Augmentation de l'activité de la G6PDH Augmentation des ARNm de la G6PDH	(Ursini et al., 1997)
Surexpression de la G6PDH	Swiss 3T3, Balb/c 3T3, A31, COS-7, PC12	Stimulation de la croissance	(W-N Tian et al., 1998)
Inhibition de la G6PDH	Swiss 3T3, Balb/c 3T3, A31, COS-7, PC12	Inhibition de la croissance Cellules plus sensibles à l'H ₂ O ₂ Diminution de 30-40% du ratio NADPH/NADP Inhibition de l'ancrage cellulaire	(W-N Tian et al., 1998)
Surexpression de la G6PDH	Balb/c 3T3, A31, COS-7, PC12, K-562, RIN5mAF	Augmentation de la résistance à l'H ₂ O ₂	(WN Tian et al., 1999)
Inhibition de la G6PDH	Balb/c 3T3, A31, COS-7, PC12, K-562, RIN5mAF	Augmentation de l'apoptose Perte des thiols des protéines Dégradation de la G6PDH avec la mort cellulaire augmentée	(WN Tian et al., 1999)
Privation de sérum	Balb/c 3T3, A31, COS-7, PC12, K-562, RIN5mAF	Diminution de l'activité de la G6PDH Augmentation de la quantité des ROS	(WN Tian et al., 1999)
Privation de sérum et ajout de substrats pour la G6PDH	Balb/c 3T3, A31, COS-7, PC12, K-562, RIN5mAF	Abrogation de l'accumulation des ROS	(WN Tian et al., 1999)
Surexpression de la G6PDH	<i>Escherichia coli</i>	Récupération partielle du taux de croissance, qui avait diminué suite à la production recombinante introduite par plasmide multicopie	(Flores et al., 2004)
Surexpression de la G6PDH	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Activité spécifique de la G6PDH augmentée (6X) Augmentation de la production (25%)	(Kwon et al., 2006)
Surexpression de la G6PDH	WEHI7.2	Sensibilité au stress oxydatif et aux glucocorticoïdes	(Tome et al., 2006)

		augmentée Augmentation des ROS Diminution de la production d'ATP Simulation d'une privation en glucose	
Surexpression de la G6PDH	3T3-L1	Stimulation du stress oxydatif Stimulation de la réponse inflammatoire	(J Park et al., 2006)
Exposition à l'H ₂ O ₂ ou la diamide	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Redirection des flux de la glycolyse vers la PPP	(Ralser et al., 2007)
Depliement de la G6PDH, puis protocole de repliement	-	70% de l'activité de la G6PDH retrouvée L-Arg, NADP ⁺ sont essentiels le repliement de la G6PDH	(Wang & Engel, 2009)
Surexpression de la G6PDH	<i>Bacillus subtilis</i>	Augmentation de la production (25%) Augmentation du flux vers la PPP Légère augmentation du taux spécifique de consommation de glucose Diminution des concentrations en G6P et pyruvate Augmentation de la concentration en ribulose-5-phosphate	(Duan et al., 2010)
Surexpression de la G6PDH	Cellules vasculaires endothéliales	Restauration de la balance redox Diminution de la quantité des ROS Amélioration de l'activité des enzymes antioxydantes	(Zhang et al., 2012)
Inhibition de la PKA	Cellules vasculaires endothéliales	Diminution de la quantité des ROS Augmentation des enzymes redox Augmentation de la croissance Diminution de la mort cellulaire	(Zhang et al., 2012)
Inhibition de la G6PDH	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Augmentation de la G6P Augmentation de la production Diminution de la croissance	(Jang et al., 2012)
Surexpression de la G6PDH, la phosphoribosylpyrophosphate synthétase et la 6PGD	<i>Escherichia coli</i> CYT15	Augmentation de la production (128%) Légère baisse de croissance (3,2%) Augmentation de la consommation de glucose (72%)	(Fang et al., 2013)
Surexpression de la G6PDH et de la NAD kinase	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ssp. <i>lactofermentum</i>	Augmentation de la production (85,9%)	(Shi et al., 2013)

Étude de cellules cancéreuses	ccRCC	Consommation de glucose augmentée Niveau de G6PDH augmenté Niveaux des métabolites issus de la PPP augmentés	(Lucarelli et al., 2015)
Inhibition de la G6PDH	ccRCC	Baisse de la survie des cellules cancéreuses Baisse du niveau de NADPH Production des ROS augmentée	(Lucarelli et al., 2015)

2.3 Transfection

Afin de surexprimer la G6PDH, pour les raisons mentionnées précédemment, il faut pouvoir insérer du matériel génétique codant pour cette enzyme dans les cellules hôtes. Ce processus s'appelle la transfection et il existe plusieurs méthodes pour y parvenir : de types biologiques, physiques ou chimiques. Ce transfert peut être transitoire ou stable, selon que le matériel est inséré au génome ou non. Lorsqu'une méthode aura été choisie, il est important de connaître les paramètres expérimentaux influant sur le rendement du processus. Enfin, si notre stratégie est payante et que l'on souhaite obtenir une lignée stable, il est crucial de pouvoir sélectionner les clones hautement productifs.

2.3.1 Transfection transitoire vs lignée stable

Le processus de transfection est un transfert de matériel génétique dans les cellules, codant pour une molécule d'intérêt (M. Butler, 2004; Costa et al., 2010; TK Kim & Eberwine, 2010). Cet outil permet la production, de manière recombinante, de protéines d'intérêt thérapeutiques, mais aussi pour des applications en thérapie génique ainsi que pour l'étude de la fonction des gènes ou des protéines via l'inhibition ou la surexpression de gène(s) dans la cellule hôte (TK Kim & Eberwine, 2010). Un transfert sera dit épisomal s'il n'est que transitoire et si le matériel n'est pas intégré au génome de la cellule hôte. On pourra cependant obtenir des lignées stables, c'est-à-dire qui transmettent et conservent le matériel génétique lors de la division cellulaire, par un processus nécessitant plusieurs étapes de sélection. L'établissement de ces lignées stables demande en effet la sélection des clones ayant intégré le matériel génétique dans leur génome (Costa et al., 2010). Ces dernières doivent non seulement posséder des taux de production élevés mais aussi une bonne croissance et un niveau de viabilité élevé sur de longues périodes de temps (Birch & Racher, 2006; Costa et al., 2010).

La production au niveau industriel est à ce jour majoritairement conduite grâce à des lignées stables, car elles permettent une production sur du long terme, de meilleurs taux de production par la sélection de clones hautement producteurs et une optimisation des conditions de culture (Cacciatore et al., 2010; Costa et al., 2010). Mais le processus comprend plusieurs étapes, allant de la création du vecteur de transfection jusqu'à la sélection des clones, en passant par le protocole de transfection en lui-même qui doit être optimisé. L'intérêt de la transfection

transitoire réside, quant à lui, dans le fait de permettre la génération de «mg» jusqu'à des «g» à court terme (quelques semaines), alors que l'établissement d'une lignée stable est long et couteux (Carpentier et al., 2007; Costa et al., 2010; Derouazi et al., 2004; Han et al., 2007; Phuong Lan Pham et al., 2006). Aussi, la demande pour une approche permettant une flexibilité de production plus rapide et économique se fait sentir : la transfection transitoire est déjà utilisée pour les étapes d'évaluation *in vivo* et les analyses de produits, mais la mise à grande échelle est encore en développement pour rencontrer au mieux les critères industriels ainsi que des organismes de régulation (Birch & Racher, 2006; Costa et al., 2010).

Les vecteurs d'expression sont souvent des plasmides bactériens qui peuvent se répliquer indépendamment des chromosomes (eukaryotes ou prokaryotes) car ils possèdent une origine de réPLICATION qui leur est propre (Costa et al., 2010). À elle seule, l'optimisation du vecteur permet d'augmenter la production (Jäger et al., 2013). Comme l'insertion du matériel génétique diffère entre les deux modes de transfection, les facteurs qui affectent la production ne sont pas les mêmes : l'efficacité de transfert du matériel génétique va être critique pour la transfection transitoire, alors que pour les lignées stables la position et la fréquence d'intégration seront importants. Mais les deux systèmes sont affectés par la force du promoteur (Costa et al., 2010).

2.3.2 Différentes méthodes

Afin de transférer du matériel génétique dans les cellules, plusieurs méthodes ont été développées – biologiques, physiques et chimiques - à savoir : le transfert via les virus, l'électroporation, la micro-injection, la précipitation au calcium-phosphate, la lipofection et la polyfection (M. Butler, 2004; Costa et al., 2010; TK Kim & Eberwine, 2010). Certaines méthodes sont cependant plus appropriées selon la lignée cellulaire et selon si l'on veut obtenir une expression transitoire ou stable. Une bonne méthode de transfection doit non seulement engendrer un fort pourcentage de cellules transfectées, mais aussi être la moins毒ique pour les cellules et être reproductible et facile d'utilisation (TK Kim & Eberwine, 2010).

Le transfert de matériel génétique via les virus s'appelle la transduction. Cette méthode est efficace mais les inquiétudes liées à l'immunogénicité et la toxicité des systèmes viraux ont amené la nécessité d'utiliser des vecteurs non-viraux (M. Butler, 2004; TK Kim & Eberwine, 2010).

La méthode d'électroporation consiste en l'établissement de pores réversibles sur les membranes des cellules en appliquant un champ électrique (100-200 V pendant 1-2 ms), qui laisseront pénétrer l'ADN. Cette méthode est facile, rapide, et permet de traiter une quantité importante de cellules, mais conduit à des viabilités cellulaires faibles après la transfection (M. Butler, 2004; Costa et al., 2010; TK Kim & Eberwine, 2010). La micro-injection, quant à elle, ne peut être appliquée qu'à un petit nombre de cellules, car elle consiste en l'injection directe du matériel génétique dans le noyau ou le cytoplasme à travers une micro-aiguille (M. Butler, 2004; TK Kim & Eberwine, 2010). Des méthodes un peu moins connues telles que la phototransfection (création de pores par irradiation au laser) ou la biolistique (transfert direct de gène via des microbilles d'or enrobées d'ADN projetées à grande vitesse) sont précises mais très chères, en raison du matériel et de la précision nécessaire (TK Kim & Eberwine, 2010).

La méthode au phosphate de calcium a été développée par (F.L. Graham & Eb, 1973) et consiste à faire co-précipiter l'ADN avec du phosphate de calcium. Le précipité est incorporé aux cellules après adsorption sur la membrane cellulaire et une brève exposition au DMSO ou au glycérol (M. Butler, 2004). Bien que largement utilisée car bon marché et fonctionnant sur de nombreux types cellulaires, cette méthode est peu efficace et peu reproductible (M. Butler, 2004; Costa et al., 2010; Liu et al., 2008). La lipofection utilise des lipides cationiques pour former un complexe avec l'ADN négativement chargé, et peu être utilisée en présence ou absence de sérum avec très peu de toxicité (M. Butler, 2004; Costa et al., 2010). Mais ces réactifs de transfection restent relativement chers (Liu et al., 2008). La polyfection est un processus similaire mais utilise des polymères cationiques, le plus connu étant le polyéthylène imine (PEI). Le PEI a été testé et approuvé pour délivrer du matériel génétique pour la première fois par (Boussif et al., 1995): le polymère est approprié car il condense efficacement l'ADN (Phuong Lan Pham et al., 2006) et le protège de la dégradation (Costa et al., 2010; W. T. Godbey et al., 1999b). Les différentes étapes d'intégration du matériel génétique sont les suivantes, comme représentées à la Figure 2-12 : formation des polyplexes, endocytose des polyplexes et relâche dans le cytoplasme, mouvement des particules vers le noyau où l'ADN est relargué et peut être transcrit en étant ou pas intégré au génome cellulaire (Bertschinger et al., 2008; W.T. Godbey et al., 1999). Le mécanisme du transfert vers le noyau est très peu connu (Carpentier et al., 2007) et la transfection au PEI est majoritairement transitoire car il y a un manque d'intégration du matériel génétique au génome (W.T. Godbey et al., 1999).

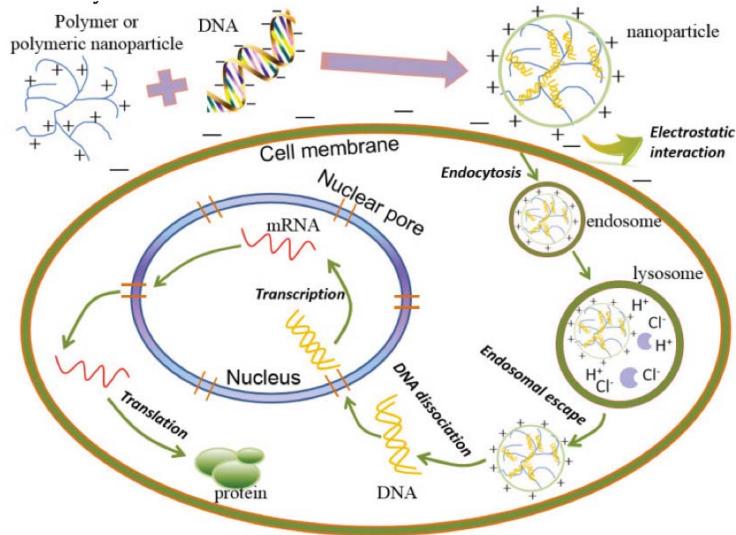


Figure 2-12: Mécanisme de polyfection (Jin et al., 2014)

Les méthodes au PEI et au phosphate de calcium fonctionnent à la fois avec les cellules CHO et les cellules HEK : elles sont peu chères, faciles d'utilisation, ont une bonne efficacité et présentent peu de toxicité pour les cellules (Han et al., 2007; TK Kim & Eberwine, 2010). Il est cependant plus difficile d'avoir de bons résultats de transfection avec les CHO qu'avec les HEK293 (Derouazi et al., 2004). Ces raisons ont mené au choix du PEI comme agent de transfection pour ce projet.

2.3.3 Facteurs influençant la transfection au PEI

L'efficacité de la transfection influence directement la production et la viabilité cellulaire, il est donc important d'optimiser le protocole pour obtenir le meilleur compromis entre des titres élevés et une bonne viabilité. À ce jour, plusieurs facteurs sont connus pour influer directement sur le taux de production après transfection et ils doivent être optimisés à chaque culture. Ceux-ci incluent non seulement la densité cellulaire au moment de la transfection, le ratio PEI:ADN, la quantité d'ADN, le type de PEI utilisé, le temps d'incubation des polyplexes, la température, le pH et la force ionique (Bertschinger et al., 2008; Derouazi et al., 2004; Li, 2014; Sang et al., 2013). Une étude préalable de ces paramètres pour optimisation est nécessaire afin de trouver la meilleure efficacité de transfection moyennant le moins de toxicité possible.

Le PEI linéaire d'un poids moléculaire de 25 kDa est connu comme le plus efficace et est le plus utilisé actuellement (Derouazi et al., 2004; W. T. Godbey et al., 1999a), comparé aux PEI

branchés et de poids moléculaires différents. Les temps d'incubation rapportés pour la formation des polyplexes se situent entre 10 et 30 min (Bertschinger et al., 2008; Carpentier et al., 2007; Derouazi et al., 2004; Han et al., 2007; Li, 2014; Rajendra et al., 2011; Tom et al., 2007; Ye et al., 2009), bien qu'un temps de 10 min soit souvent cité comme optimal (Bertschinger et al., 2008; Sang et al., 2013). À ce propos, il se peut que des complexes thermodynamiquement stables ne favorisent pas les procédées de transfert ou de dissociation des complexes (Han et al., 2007), d'où une baisse de l'efficacité avec l'augmentation des temps d'incubation. Les polyplexes sont généralement formés dans une solution de NaCl ou directement dans le milieu de culture; des concentrations de 150 ou 300 mM en NaCl étant tenues pour optimales (Derouazi et al., 2004; Han et al., 2007; Li, 2014; Rajendra et al., 2011; Sang et al., 2013).

Les ratios PEI:ADN, quant à eux, sont généralement testés entre 1:1 et 8:1 mais le plus courant reste un ratio de 2:1 (Bertschinger et al., 2008; Derouazi et al., 2004; Han et al., 2007; Li, 2014; Ye et al., 2009). Cependant, si on augmente la densité cellulaire lors de la transfection, on peut encore optimiser le taux de production en augmentant le ratio PEI:ADN; augmenter le ratio sans augmenter la densité a plutôt un effet négatif en raison d'une accumulation d'un excès de PEI par les cellules (Bertschinger et al., 2008). Les cellules tolèrent des concentrations de PEI inférieures à quelques µg/mL (Han et al., 2007; Li, 2014). Le PEI libre a en effet un impact négatif sur les cellules contrairement à quand il est lié à l'ADN, car il se peut qu'il perméabilise les membranes, en perturbant leur intégrité et leurs fonctions (W.T. Godbey et al., 1999).

Le choix du milieu de culture est également important et limitant (Backliwal et al., 2008; Liu et al., 2008) car beaucoup d'entre eux contiennent des inhibiteurs de transfection tels que le sulfate de dextrane, l'héparine et des surfactants (Phuong Lan Pham et al., 2006), qui sont souvent des molécules empêchant l'agrégation cellulaire dans les milieux de production. Ces polyanions neutralisent les polyplexes qui sont chargés positivement. Dans le cas d'un milieu non adapté au transfert de matériel génétique, soit les cellules devront être adaptées à un nouveau milieu de culture dans lequel la transfection sera favorisée, soit le milieu de culture devra être changé au moment de la transfection. Plusieurs auteurs ont d'ailleurs utilisé ce changement de milieu: les cellules sont resuspendues dans un milieu favorisant la transfection, incubées avec les polyplexes de 3 à 5 h à 37°C, puis diluées 1:1 avec le milieu de croissance (Bertschinger et al., 2008; Derouazi et al., 2004; Han et al., 2007; Rajendra et al., 2011). Ces temps d'incubation sont suffisants car la majorité de l'assimilation des polyplexes a lieu très rapidement (Bertschinger et

al., 2008). Le plasmide est retrouvé associé aux cellules déjà 15 min après la transfection et 2 h après la transfection la plupart des cellules ont assimilé les polyplexes (Carpentier et al., 2007). La même étude (Carpentier et al., 2007) montre que de 1 à 2% des plasmides se retrouvent dans le noyau après 48h et que des plasmides sont également retrouvés dans le noyau de cellules qui sont négatives à la production. Ceci sous-entend que l'efficacité de la transfection dépend non seulement de la livraison du plasmide dans le noyau (translocation), mais aussi de la possibilité de son expression : pour les cellules négatives qui avec présence de plasmide dans le noyau la transcription et/ou la traduction ne se font pas. Le mécanisme d'entrée dans le noyau reste à ce jour mal compris.

Pour les cellules CHO, les taux de production les plus élevés sont obtenus par transfection puis dilution et production à 30-33°C (Li, 2014; Rajendra et al., 2011). Pour les cellules HEK293, de bons résultats (i.e. augmentation des taux de production) ont été obtenus par transfection à haute densité (20.10^6 cellules/mL) sans incubation préalable des polyplexes : l'ADN et le PEI sont rajoutés directement à la suspension cellulaire (Backliwal et al., 2008). S'en suit une dilution par le milieu de croissance/production 4 h après transfection jusqu'à une densité de 1.10^6 cellules/mL. De cette façon, la formation préalable des polyplexes n'est plus nécessaire. Aussi, pour obtenir de bons taux de production, la composition du milieu de production doit être précise. Avec un protocole classique de changement de milieu, il reste 50% du milieu de transfection et 50% du milieu de production ce qui en change la composition. Avec cette transfection à haute densité, il ne reste que 5% du milieu de transfection car la dilution après transfection est beaucoup plus importante, et cela a donc moins d'impact sur la composition du milieu de production (Backliwal et al., 2008).

2.3.4 Sélection des clones

Dans le cas où l'on souhaite obtenir une lignée stable, il est crucial de pouvoir sélectionner les cellules présentant le bon phénotype. Les clones hautement productifs sont normalement très rares, il est donc important d'avoir de bonnes méthodes de sélection (Birch & Racher, 2006). Les clones sont essentiellement analysés en termes de croissance et de production (Cacciatore et al., 2010) et afin d'obtenir les bonnes caractéristiques, il faut analyser une quantité importante de transfectants, ce qui est laborieux et limite donc le nombre de clones que l'on peut analyser et identifier (Birch & Racher, 2006). Pour pouvoir sélectionner les clones présentant les

caractéristiques désirées, on priorisera l'utilisation d'une pression de sélection via un marqueur génétique se trouvant le plus souvent directement sur le matériel transfecté, ou sur un autre plasmide dans le cas d'une co-transfection (i.e. lorsque deux plasmides différents sont transfectés en même temps). Les cellules sont sélectionnées en appliquant des conditions de culture spécifiques où la survie nécessite la transfection de certains gènes pour assurer les fonctions primaires (des exemples suivent). Les clones survivants sont ensuite amplifiés un par un et évalués (Costa et al., 2010).

Les méthodes de sélection des cellules incluent la sélection par antibiotiques (néomycine, hygromycine, puromycine), le système DHFR, le système GS (Wurm, 2004). Le système DHFR est le suivant : les cellules sont exposées à un milieu sans hypoxantine et thymidine, et à des concentrations graduelles de méthotrexate (MTX) qui bloque l'action de la DHFR, enzyme qui est impliquée dans la conversion de l'acide folique en tétrahydrofolate et donc la synthèse de glycine, purines et acide thymidique: seules les cellules qui surexpriment la DHFR (et qui ont reçu ce gène) survivent et amplifient le gène de production (Wurm, 2004). D'habitude, on ajoute un marqueur de sélection de type antibiotique, le rôle de la DHFR étant plus d'amplifier les copies du plasmide. Les clones peuvent soit être isolés à la concentration la plus basse de MTX et ensuite être soumis à des concentrations plus élevées ou bien être sélectionnées après que la plus haute concentration ait été imposée. L'utilisation d'un promoteur faible pour la DHFR permet une plus grande amplification du gène de la protéine d'intérêt, qui est généralement précédé d'un promoteur fort (Birch & Racher, 2006; Cacciatore et al., 2010; Chusainow et al., 2009; Costa et al., 2010; Grillari et al., 2001). Dans leur travail, (Chusainow et al., 2009) ont réussi à obtenir 14 clones avec des productivités spécifiques entre 0.1 et 1.1 pg/cellule.jour avant amplification via le système DHFR, et entre 3 et 75 pg/cellule.jour après amplification. Le système GS (glutamine synthétase) est assez similaire et joue sur des conditions de culture spécifiques: les cellules sont transfectées avec un gène codant pour la GS, qui catalyse la production de glutamine à partir de glutamate et d'ion ammonium. Un inhibiteur de la GS (MTS ou méthionine sulfoximine) est introduit et la glutamine est substituée dans le milieu de culture par du glutamate; comme précédemment seule les cellules qui surexpriment le gène survivent (Birch & Racher, 2006; Costa et al., 2010; Wurm, 2004).

La question de la définition d'un clone hautement productif et des caractéristiques d'une bonne lignée stable est donc critique. Dans leur étude métabolique, (Ghorbaniaghdam et al.,

2014a) ont montré que les clones hautement productifs ont un métabolisme du lactate plus efficace, produisant moins de lactate avec une activité de la lactate déshydrogénase diminuée, ainsi qu'une activité du cycle TCA plus importante, avec des flux de pyruvate déshydrogénase et pyruvate carboxylase plus élevés. Les hauts producteurs possèdent des niveaux intracellulaires de NADH plus élevés. Ceci est rejoint par (Dean & Reddy, 2013) qui, en comparant des hauts producteurs et faibles producteurs, ont observés que les hauts producteurs atteignaient des densités cellulaires plus élevées, produisant moins de lactate et même le consommant en fin de culture, et consommant moins de glucose. (Luo et al., 2012) avaient déjà noté ce phénotype de consommation de lactate après un certain temps dans certaines lignées de CHO, menant à une meilleure productivité. Une étude multi-omics comparant des cellules HEK293 productrices et non-productrices rapporte également ce phénotype : les productrices consomment moins de glucose et produisent moins de lactate, et les gènes liés à la phosphorylation oxydative sont régulés à la baisse (S. Dietmair et al., 2012). Les hauts producteurs ont généralement plus de copies des transgènes pour les chaînes lourdes et légères (HC et LC) et la DHFR que les faibles producteurs, ainsi que plus de copies d'ARNm et un contenu en lipides plus important (Chusainow et al., 2009; Niklas et al., 2013). Bien que le nombre de copies soit relié à la productivité, d'autres facteurs comme l'efficacité de la transcription et de la traduction interviennent pour obtenir le meilleur producteur (Chusainow et al., 2009). Mais l'expression des gènes étant très complexe et régulée, avoir beaucoup de copies du gène n'entraîne pas toujours une forte productivité (Chusainow et al., 2009). Généralement, les hauts producteurs ont des taux de croissance plus faibles, certainement en raison de la charge métabolique entraînée par la production de la protéine étrangère, même si dans leur étude, (Chusainow et al., 2009) ont obtenu certains haut producteurs qui présentaient des taux spécifiques de croissance supérieurs à ceux du clone non-amplifié.

L'utilisation d'un faible promoteur pour le gène de sélection permet d'augmenter la production, même si l'efficacité de la transfection est réduite (Wurm, 2004). Un promoteur faible est caractérisé par le fait qu'il entraîne un faible taux d'initiation de la transcription, car il a moins d'affinité pour l'ARN polymérase, à l'inverse du promoteur fort. L'association d'un promoteur faible pour le gène DHFR et d'un promoteur fort pour le gène d'intérêt permet d'éviter les interférences entre les deux systèmes (la lecture du premier inhibant celle du deuxième) (Birch & Racher, 2006). Le site d'intégration du matériel génétique dans le chromosome influe

énormément sur le taux de production, c'est l'effet de position : selon que l'intégration a lieu dans une chromatine active ou non (Chusainow et al., 2009; Wurm, 2004). Les cellules sélectionnées doivent être analysées avec rigueur avant de pouvoir déclarer qu'elles sont stables, notamment en raison de l'hétérogénéité des populations (Wurm, 2004). En effet, des phénomènes de recombinaisons homologues ou translocations sont fréquent lors de l'amplification des gènes, donc même si des cellules sont issues du même clone elles n'ont pas nécessairement les mêmes propriétés (Chusainow et al., 2009). Toutefois, en général, l'expression transgène est malheureusement rapidement silencée (Chusainow et al., 2009; Wurm, 2004). Le taux de production des lignées tend à diminuer avec les passages par une diminution du nombre de copie du gène ou par une baisse de l'efficacité de transcription, en absence de pression de sélection (Chusainow et al., 2009).

Comparé aux systèmes de sélection classiques (GS et MTX) qui sont longs à mettre en place, les techniques utilisant le FACS (cytométrie en flux, voir Figure 2-13) sont avantageuses car plus rapides. La méthode par dilution limite, largement utilisée pour les microorganismes, requiert en effet l'amplification et le test de centaines de populations. Le FACS permet, en théorie, de récolter sélectivement, en utilisant un marqueur fluorescent, les cellules productrices, et en triant en clones uniques (Birch & Racher, 2006; Cacciatore et al., 2010). La GFP a été largement utilisée pour faciliter la sélection, soit en fusion, soit co-exprimée (Mancia et al., 2004; Mosser et al., 1997). La GFP peut en effet être observée dans des cellules uniques et de manière non invasive par fluorescence, sans cytotoxicité (en deçà d'une concentration élevée). Le couplage direct de la molécule d'intérêt avec la molécule rapporteur est cependant déconseillé pour les études structurales et pose des problèmes pour la purification. Pour palier ce problème, les sites IRES permettent d'obtenir deux molécules différentes mais d'avoir un lien entre les deux niveaux d'expression (Mancia et al., 2004). Dans leur travail, (DeMaria et al., 2007) ont d'ailleurs couplé la protéine recombinante d'intérêt avec une protéine rapporteur de surface (CD20), en liant les deux gènes par un IRES, ceci permettant de les transcrire sur le même ARNm mais de les traduire de manière indépendante. Ainsi, le niveau d'expression du rapporteur indique théoriquement celui de la protéine d'intérêt, et les cellules hautement productrices peuvent alors être sélectionnées via le FACS en utilisant un anti-CD20 fluorescent. Cette méthode a donné lieu à de meilleures prédictions en termes de performance des clones et permet de détecter les clones instables par une simple diminution de fluorescence, ainsi que les

populations non-clonales qui comprendraient plusieurs phénotypes. Mais introduire un rapporteur signifie également qu'il sera présent dans la biomasse et le milieu de culture (Caron et al., 2009). Marquer directement la protéine d'intérêt peut être une autre approche, mais il faut maintenir la protéine sécrétée dans la cellule et éviter qu'elle soit sécrétée dans le milieu. Ceci peut se faire sur support semi-solide (Caron et al., 2009).

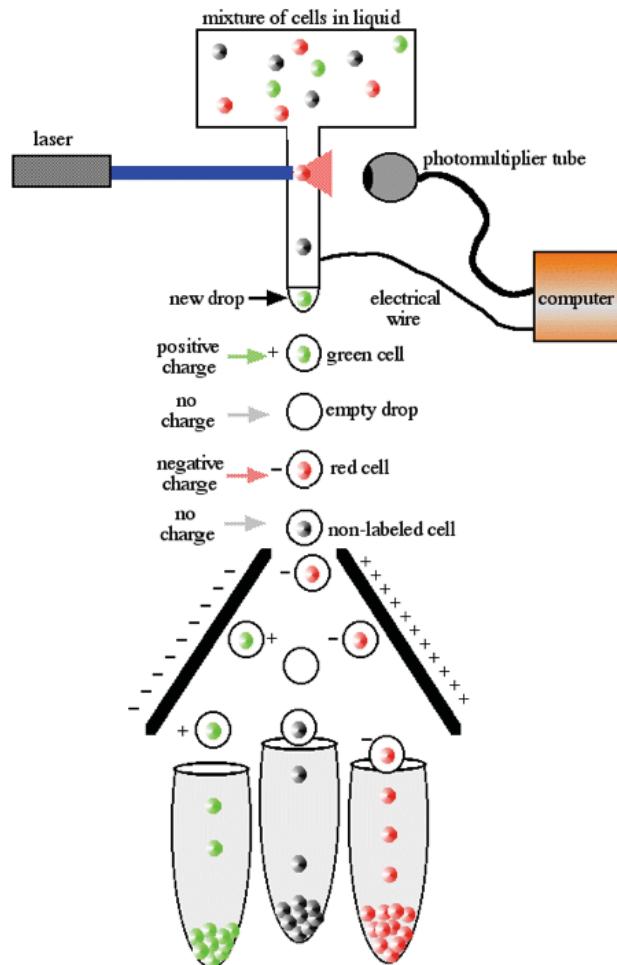


Figure 2-13: Principe de la cytométrie en flux (Department of Biology Davidson College)

CHAPITRE 3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce chapitre rapporte toutes les méthodes et lignées cellulaires utilisées lors de ce projet. Dans un premier temps, les lignées cellulaires et leurs conditions de culture sont décrites. Ensuite, la méthode de transfection de matériel génétique et son suivi sont rapportés. Finalement, ce sont les méthodes d'analyses tant du compte cellulaire que de la quantification de la production et des nutriments ou métabolites clés qui sont abordées.

3.1 Lignées cellulaires et conditions de culture

Plusieurs lignées cellulaires et conditions de culture ont été utilisées au cours de ce projet.

3.1.1 CHO-HP

La lignée de CHO produisant de manière stable un anticorps monoclonal anti-CD20 a été obtenue de Viropro International Inc. (Montréal, Canada). Elle est dérivée de la lignée CHO-CUM2 et possède un système inducible au cumate décrit par (Mullick et al., 2006). Les cellules sont initialement cultivées dans le milieu sans sérum, sans protéines et chimiquement défini HyClone SFM4CHO (GE Healthcare, USA) supplémenté à 4 mM de glutamine (Sigma-Aldrich, USA). Un clone hautement productif (HP) a été sélectionné. Ces cellules ont été adaptées au milieu HyCell TransFx-C (GE Healthcare, USA) supplémenté à 4 mM de glutamine (Sigma-Aldrich). Elles ont été cultivées essentiellement en suspension mais une culture adhérente a été tentée.

3.1.2 CHO-EG2

La lignée stable CHO-EG2 produisant une chaîne lourde chimérique d'anticorps monoclonal (EG2-hfc) a été fournie par le réseau Mabnet du CRSNG et initialement cultivée dans le milieu BIOGRO. Elles ont été adaptées au milieu HyCell TransFx-C.

3.1.3 HEK293

Les cellules HEK293 ont été mises à disposition par le Dr. Yves Durocher de l'Institut de Recherche en Biotechnologie (IRB, Montréal, Canada). Le clone parental HEK293-D9 produisant de manière stable l'interféron- α 2 β (Loignon et al., 2008) ainsi que le clone dérivé

HEK293-F5 exprimant la pyruvate carboxylase (Elias et al., 2003; Henry & Durocher, 2011) ont été cultivés en suspension dans le milieu Freestyle F17 (Invitrogen Life Technologies, USA) supplémenté à 4 mM de glutamine (Sigma-Aldrich) et 0,1% de Kolliphor P188 (Sigma-Aldrich).

3.1.4 Conditions de culture

Les cultures ont été passées 3 fois par semaine pour maintenir les cellules en phase exponentielle et de nouvelles cellules ont été décongelées tous les 4 mois.

Les cultures en suspension ont été réalisées dans des flacons agités de 125 mL (VWR, Canada) ou dans des plaques 6 trous (Corning, USA) et inoculées à $0,2 \cdot 10^6$ cellules/mL sauf mention du contraire pour un volume initial de 20 mL (flacons agités) ou de 2,5 mL (trous). Les cellules sont placées à l'incubateur à 37°C, 5% CO₂ sur un agitateur à 120 RPM.

Les cultures adhérentes ont été menées dans des T-flasks de 25 cm² (Corning) et inoculées à 10 000 cellules/cm². Pour les comptes cellulaires, les flacons ont été sacrifiés. Après deux rinçages au PBS (Sigma-Aldrich), les cellules ont été incubées avec de la trypsine jusqu'à détachement. La trypsine est alors bloquée par ajout de deux volumes de milieu contenant 10% de FBS.

Les cellules CHO-HP sont cultivées soit en présence soit en absence de cumate (Sigma-Aldrich), la dernière option consistant en un contrôle. Dans le cas de la présence de cumate, les cellules sont induites avec 1 µg/mL à 48h comme mentionné précédemment (Sheikholeslami et al., 2013a). Il est important de noter qu'aucune toxicité n'a été observée à cette concentration (Mullick et al., 2006).

Les expériences ont été au minimum conduites en duplique. Les cultures ont été échantillonnées chaque jour : la suspension a été centrifugée à 300 g et le surnageant conservé à -20°C pour analyses ultérieures.

3.1.5 Adaptation des cellules à un nouveau milieu de culture

Dans certains cas, par exemple lors d'une étape de transfection ou dans le cas où un milieu plus performant devient disponible, il est requis de changer de milieu de culture. L'adaptation des cellules à un nouveau milieu de culture peut se faire de deux manières : soit directement soit progressivement.

De la façon la plus directe, les cellules sont simplement passées dans le nouveau milieu de culture. De manière plus douce, les cellules sont sous-cultivées dans un milieu contenant des pourcentages de plus en plus élevés du nouveau milieu de culture, pour finir par 100% de ce dernier. Les cellules doivent être inoculées à une concentration deux fois plus élevée qu'à l'habitude, pour leur permettre de mieux se remettre du choc physiologique généré. Lorsque la croissance reprend normalement dans un mélange de milieu, le pourcentage du nouveau milieu peut être augmenté graduellement (Costa et al., 2010).

Il a également été tenté de décongeler les cellules directement dans un nouveau milieu, ce qui peut, selon les cas, donner des résultats similaires.

3.1.6 Congélation et décongélation des cellules

Les cellules ont été congelées à 1.10^7 cellules/mL dans leurs milieux de culture respectifs supplémentés de 10% de DMSO stérile (Sigma-Aldrich). Les cellules sont rapidement resuspendues dans le milieu de congélation, placées dans des cryovials (Corning, USA) puis dans un contenant de congélation (Nalgene, USA) placé à -80 °C, permettant une baisse de température progressive. Le lendemain les vials sont placés dans l'azote liquide.

Les cellules sont décongelées rapidement dans un bain à 37°C et le DMSO est enlevé par centrifugation.

3.2 Transfection

3.2.1 Plasmides

Le plasmide vide pDsRed-N1-Monomer a été obtenu de Clontech Laboratories (USA). Il code pour le monomère fluorescent DsRed, avec une excitation et une émission de 557 nm et 592 nm respectivement. Le plasmide pDsRedN1 modifié pour coder la G6PDH a été généreusement fourni par (Gupte et al., 2011). Le cDNA codant pour la G6PDH humaine a été isolé par PCR du vecteur pCMV6-XL5 (Origene Technologies, Inc) et cloné dans le vecteur pDsRedN1 entre les sites NheI et XhoI. Ce plasmide code pour la protéine fluorescente DsRed (excitation et émission de 558 nm et 583 nm respectivement), fusionnée avec la G6PDH. Le vecteur contrôle (vide) est différent du vecteur originel car ce dernier n'était plus disponible commercialement.

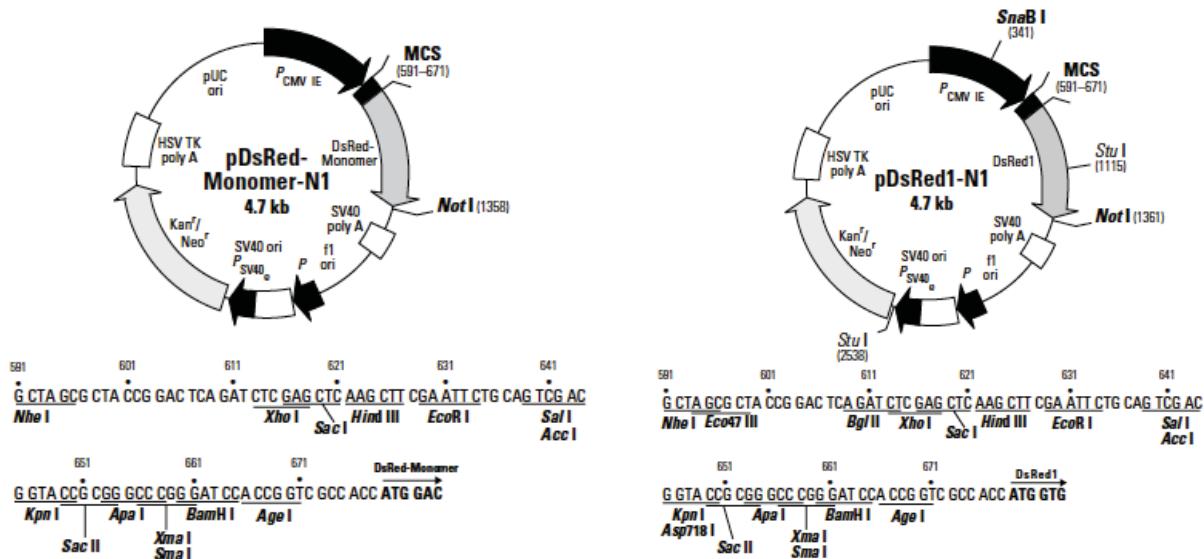


Figure 3-1: Cartes de restriction et sites de clonage multiple des plasmides (pDsRed-Monomer-N1 à gauche, pDsRed1-N1 à droite) (Clontech Laboratories, Inc., USA)

3.2.2 Transfection au PEI

La solution de PEI linéaire 25 kDa (Sigma-Aldrich) a été réalisée comme décrit par (Tom et al., 2007). La concentration de la solution a été évaluée à l'orange II qui interagit avec les groupes ammonium, comme mentionné dans (Drogoz et al., 2007).

La concentration finale en ADN a été fixée à un 1 µg/mL comme dans (Liu et al., 2008). Des tests de ratio PEI:ADN ont été réalisés préalablement sur chaque lignée cellulaire en plaque 6 puits (résultats non montrés). Sauf mention du contraire, le ratio PEI:ADN utilisé a été de 2:1. Les volumes nécessaires d'ADN puis de PEI sont ajoutés au milieu de culture frais, sans surfactant, représentant 10% du volume final, puis incubés 10-15 minutes à température ambiante. Les polyplexes sont ensuite ajoutés directement à la culture.

3.2.3 Suivi de la transfection

Le suivi de la transfection a été effectué par microscopie en fluorescence (ZEISS Observer.Z1) de par la présence d'un marqueur fluorescent, la protéine DsRed, dont le gène est sur le plasmide. Les cellules ont été observées à la fois en lumière blanche et en fluorescence de type rhodamine (excitation : 540 nm, émission : 580 nm).

3.2.4 FACS

Les cellules CHO transfectées et induites ont été triées par cytométrie en flux (tri par fluorescence). Elles sont resuspendues à 10.10^6 cellules/mL dans du milieu frais supplémenté d'antibiotiques (Pen/Strep, Sigma-Aldrich). Après le tri, les cellules sont resuspendues à $0.15.10^6$ cellules/mL. Des dysfonctionnements opérationnels du système utilisé (module de tri) ont conduit à une perte importante de cellules.

3.3 Analyses

3.3.1 Comptes cellulaires et viabilité

Les cellules ont été comptées sur un hémacytometre (Neubauer) grâce à la méthode d'exclusion au bleu trypan. $25 \mu\text{L}$ de bleu trypan (Sigma-Aldrich) sont rajoutés à $100 \mu\text{L}$ d'une dilution de la suspension cellulaire dans du PBS (Sigma-Aldrich) et observé sous microscope standard (objectif 10 X). La concentration cellulaire a été obtenue par la formule suivante:

$$\text{compte (cellules/mL)} = \sum \text{comptes des 4 carrés} \times 3125 \times \text{facteur de dilution}$$

Et la viabilité est donnée par :

$$\text{viabilité (\%)} = \frac{\text{cellules vivantes}}{\text{cellules vivantes} + \text{cellules mortes}} \times 100$$

3.3.2 Détermination des concentrations en glucose, glutamine, lactate, glutamate

Les concentrations dans les surnageants en glucose, glutamine, lactate et glutamate ont été mesurées via des bioanalyseurs (2700 SELECT, YSI Inc. Life Sciences, Yellow Springs, OH, USA) conformément aux instructions du fabricant.

3.3.3 Test ELISA pour la quantification des protéines produites

Les concentrations en protéines recombinantes produits ont été mesurées par dosage d'immunoadsorption par enzyme liée (ELISA).

Ce premier protocole concerne la quantification des IgG des CHO-HP. Dans un premier temps, un anticorps de chèvre anti-IgG humain (H+L, min X Bov, Hrs, Ms Sr Prot, #109-005-088, Jackson ImmunoResearch, USA), dilué à 2,5 µg/mL dans du PBS, est incubé sur une plaque 96 puits (COSTAR, USA, #3369) toute la nuit à température pièce. Après chaque étape, les puits sont lavés trois fois au PBS-Tween20 (0.05%). Les sites non-spécifiques sont alors bloqués avec une solution de 1% de BSA (R&D Systems, USA, Reagent Diluent Concentrate 2) pendant 1 h à température pièce. Après trois nouveaux lavages, les standards (Chromopure Human IgG whole molecule, #009-000-003, Jackson ImmunoResearch) et les échantillons préalablement dilués dans la solution de blocage sont incubés en triplicatas 1 h à température pièce. Après lavage, on incube alors une solution diluée au 1/10 000 d'anticorps de chèvre anti-IgG humain conjugué à la peroxidase (H+L, min X Bov, Hrs, Ms Sr Prot, #109-035-088, Jackson ImmunoResearch) pendant 1 h à température pièce. La réaction est finalement révélée dans le noir au 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich) et stoppée après 10-15 minutes avec une solution 1 N d'acide sulfurique. Les résultats sont lus sur un lecteur de plaque (Perkin-Elmer Victor³V) à une absorbance de 450 nm.

L'ELISA pour la protéine Eg2 des CHO-EG2 diffère du protocole précédent en termes d'anticorps et de standards : l'anticorps de capture est anti-IgG humain spécifique pour la partie Fc produit chez la chèvre (Sigma-Aldrich, #I2136) dilué au 1/3 000, le standard est directement la molécule EG2 (Mabnet), et le second anticorps est une peroxidase-conjuguée de chèvre anti-IgG humain spécifique du fragment Fc (Sigma-Aldrich, #A0170) dilué au 1/60 000.

La quantification des interférons- α 2 β est réalisée à l'aide d'un kit commercial (Human IFN- α Platinum ELISA, #BMS216, eBioscience, USA) conformément aux instructions du fabricant.

3.3.4 Western Blot

4.10⁵ cellules ont été lavées au PBS froid supplémenté de 1 mM d'orthovanadate de sodium puis lysées dans 100 µL de tampon de lyse (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Thesit, 0.5% sodium deoxycholate) (Boucher et al., 2008). Le matériel insoluble a été enlevé par centrifugation pendant 5 minutes à 10 000 g.

20 µL de lysat cellulaire ont été mélangés avec 10 µL de buffer (contenant du SDS, du β-mercaptopéthanol, du glycérol et du bleu de bromophénol) et placé 5 minutes dans de l'eau bouillante, puis refroidit sur glace pendant quelques minutes. L'électrophorèse a été réalisée sur des gels à 5-10% à 200 V dans du tampon SDS. Les protéines ont été transférées sur une membrane de polyfluorure de polyvinylidène (BioRad, USA, Immun-Blot PVDF membrane) préincubée dans du méthanol, grâce un tampon de transfert pendant 1 h à 200 mA. La membrane a été bloquée dans du lait écrémé puis incubée toute la nuit avec les anticorps primaires de lapin anti-G6PDH (Cell Signaling, USA, #12263) dilués au 1/1 000. Le lendemain, les anticorps primaires sont détectés à l'aide d'anticorps anti-IgG de lapin liés à la HRP (Cell Signaling, #7074). La détection a été réalisée par chimiluminescence. L'échelle utilisée sur les western blot a été réalisée grâce au kit «Precision Plus Protein WesternC Standards» de chez BioRad.

3.3.5 Activité de la G6PDH

L'activité de la G6PDH a été mesurée sur les lysats de cellules grâce à un kit commercial (Bertin Pharma, France, #D05010.96 wells) conformément aux instructions du fabricant.

3.3.6 Analyse métabolomique

3.3.6.1 Extraction des métabolites

3.10^6 cellules sont extraites dans 400 µL de méthanol à 80% en présence de 0.2 g de sable (Sigma-Aldrich). Après 30 minutes sur glace sèche, le mélange est vortexé puis soniqué en présence de glace pendant 5 minutes. Les échantillons sont alors centrifugés pendant 7 minutes à 21 000 g et 4°C. Une deuxième et une troisième extraction sont opérées sur les culots comme décrit précédemment mais avec respectivement 200 µL de méthanol à 50% et 200 µL d'eau glacée. Tous les surnageants sont récoltés dans le même tube, filtrés sur un filtre PTFE (VWR) et stockés à -80°C pour analyses ultérieures.

3.3.6.2 Concentrations en nucléotides et en molécules redox intracellulaires

L'analyse a été réalisée sur un système UPLC 1290 couplé à un triple quadrupole spectromètre de masse 6460 (Agilent Technologies, Québec, Canada). Les nucléotides ont été séparés par la méthode de pairage d'ions sur une colonne Symmetry C18 (Waters, USA, 150*2.1 mm, 3.5 µm)

équipée avec une colonne de garde Security C18 (Waters, 10*2.1 mm, 3.5 µm), avec le DMHA (N,N-diméthylhexylanine, Sigma-Aldrich) comme réactif. La phase mobile consistait en :

- Tampon A : acétate d'ammonium 10 mM, DMHA 15 mM pH 7.0
- Tampon B : 50/50 % (v/v) acétonitrile/20 mM NH₄OAc de pH 7.0.

Le débit de la phase mobile a été fixé à 0.3 mL/min avec le gradient suivant :

- 0-10 min à 10 % de tampon B
- 10-20 min avec un gradient linéaire de 10 à 30 % de tampon B
- 20-21 min à un gradient linéaire de 30 à 60 % de tampon B
- 21-26 min à 60 % de tampon B
- 26-27 min à un gradient linéaire de 60 à 10 % de tampon B
- 27-23 min à 10 % de tampon B.

3.3.6.3 Concentrations en acides organiques et glucides phosphatés intracellulaires

Les acides organiques et glucides phosphatés ont été analysés en utilisant le système UPLC-MS/MS ci-dessus avec une colonne HyperCarb (100*2.1 mm, 5 µm) et une pré-colonne Hypercarb (2.1*10.5 mm) (Thermo Fisher, Ontario, Canada). La phase mobile consistait en :

- Tampon A : acétate d'ammonium 20 mM pH 7.5
- Tampon B : méthanol à 10% (v/v) dans de l'eau.

Le débit a été fixé à 0.3 mL/min avec le gradient suivant :

- 0-5 min : 10% de tampon A
- 5-10 min : gradient linéaire de 10 à 20 % de tampon A
- 10-20 min : gradient linéaire de 20 à 100 % de tampon A
- 30-32 min : gradient linéaire de 100 à 10 % de tampon A
- 32-40 min : 10 % de tampon A.

3.3.6.4 Concentrations en acides aminés extracellulaires

Les surnageants ont préalablement été dilués au 1/400 dans de l'acétonitrile à 70 %. L'analyse a été effectuée sur le même système que précédemment. Les acides aminés ont été séparés sur une colonne ZICTM-Hilic (PEEK, Merck SeQuant, Canada, 2.1*150 mm, 5 µm) et une colonne de garde ZICTM-Hilic (5 µm, 200A, PEEK, Merck SeQuant) avec une température de 35°C et pour un volume d'injection de 5 µL. Le tampon de la phase mobile était une solution de HCOONH₄ 20 mM de pH 4. La phase mobile A consistait en 10 % du tampon dans de l'eau et la phase mobile B en 10 % du tampon dans de l'acétonitrile.

Le débit a été fixé à 0.1 mL/min avec le gradient suivant :

- 0-19 min : gradient linéaire de 90 à 35 % de phase mobile B
- 19-20 min : augmentation jusqu'à 90 % de phase mobile B
- 20-35 min : 90 % de phase mobile B.

3.3.6.5 Concentration en ions extracellulaires

Les surnageants de culture ont été filtrés à travers des filtres 0.2 µm en nitrocellulose. Les anions (Cl⁻, NO³⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻) et les cations (K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, NH₄⁺) ont été analysés sur un système HPLC Dionex (Dionex Canada Ltd., Oakville, Canada) équipé d'un détecteur électromécanique CD20 en mode conductivité. Les anions sont séparés sur une colonne IONPAC AS-14 (4x250 mm, Dionex Cat. #046124) et un suppresseur ASRS-ultra anion (Dionex Cat. #061561). La phase mobile consistait en une solution de bicarbonate (2 mM Na₂CO₃ et 1 mM NaHCO₃) pour un débit fixé à 1.0 mL/min. Les cations ont été séparés sur une colonne IONPAC CS-12A (4x250 mm, Dionex Cat. #046073) et un suppresseur CSRS-ultra cation (Dionex Cat. #053948). La phase mobile consistait en une solution 20 mM d'acide méthylsulfonique pour un débit de 0.9 mL/min.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : OVEREXPRESSION OF G6PDH DOES NOT ENHANCE THE BEHAVIOR OF HEK-293 CLONES STABLY EXPRESSING INTERFERON-A2B

4.1 Présentation de l'article

Le présent article intitulé « Overexpression of G6PDH does not enhance the behavior of HEK-293 clones stably expressing interferon- $\alpha 2\beta$ » a été soumis à la revue Biotechnology and Bioengineering. Cet article vise à présenter les principaux résultats obtenus sur les lignées cellulaires HEK-D9 et F5 dans le cadre de ce projet. Les deux lignées cellulaires ont été transfectées de manière transitoire avec un plasmide codant pour la G6PDH, première enzyme de la voie des pentoses phosphates. Une analyse métabolomique a été réalisée par HPLC. Les résultats montrent que les cellules sont extrêmement robustes face au changement étudié dans ce travail, et que la voie des pentoses phosphates est hautement régulée. En effet, la surexpression de la G6PDH n'a pas eu d'effet significatif ni sur la production, ni sur la croissance cellulaire, ni sur la viabilité, ni sur les concentrations intra- et extra-cellulaires des métabolites analysés. Ceci pousse à revoir la régulation de la voie des pentoses phosphates dans le modèle métabolique disponible dans notre groupe. Aussi, la régulation de la voie des pentoses phosphates demande une étude approfondie afin d'identifier les mécanismes de régulation majeurs. En revanche, l'étude a démontré que l'analyse métabolomique est un très bon outil pour discriminer les signatures et phénotypes des différentes lignées.

4.2 Auteurs

Overexpression of G6PDH does not enhance the behavior of HEK-293 clones stably expressing interferon- $\alpha 2\beta$

Edwige Arnold¹, Iness Hammami¹, Jingkui Chen¹, Sachin Gupte², Yves Durocher³, Mario Jolicoeur^{1*}

¹Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, Québec, Canada

²Department of Pharmacology, New York Medical College, Valhalla, NY 10595

³National Research Council, Montréal, Québec, Canada

* Corresponding author:

Mario Jolicoeur

PO 6079 Station Centre-Ville

Montreal, Qc, Canada H3C 3A7

Tel : +1 514 340 4711 ext. 4525

Fax: +1 514 340 4159

e-mail: mario.jolicoeur@polymtl.ca

4.3 Abstract

HEK293 cells are gaining in interest for the production of recombinant proteins. However, further understanding and engineering of cell metabolism are still needed to improve protein titers. In this work, HEK293 cells stably expressing interferon- $\alpha 2\beta$, a parental clone and a further engineered clone expressing the cytosolic yeast pyruvate-carboxylase, were transiently transfected to overexpress glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and increase fluxes through the pentose phosphate pathway (PPP). Results indicate that the cell metabolism is highly robust, showing a highly regulated PPP damping the potential effects of overexpressing G6PDH. A metabolomic study clearly demonstrates, by metabolites profiling, that the PYC clone has a highly robust and more efficient metabolic efficiency, compared to its parental clone.

Keywords: HEK293 cells; G6PDH; pyruvate carboxylase; PPP; metabolic engineering; metabolomics

4.4 Introduction

The mammalian cell platform is now seen as the workhorse of the recombinant protein industry because of their ability to perform proper folding, assembly and post-translational modifications. Even if CHO cells appear to be the preferred hosts, HEK293 cells are gaining in interest for the production of recombinant proteins. First used for the production of various viral vectors (Durocher et al., 2007; Kamen & Henry, 2004), their attractiveness lies in their human origin, high transfectability and capacity to grow in serum-free media in suspension (Baldi et al., 2005; Durocher et al., 2007). (Elias et al., 2003; Henry & Durocher, 2011; Loignon et al., 2008) have recently described the establishment of an IFN- α 2 β stably-expressing HEK293 clone (D9) and its further improved pyruvate carboxylase (PYC) expressing clone (F5), allowing an increase of the maximum cell density, and a decrease of lactate and ammonia production in batch culture (Henry & Durocher, 2011); decreasing toxic metabolic by-products and thus cell growth and production inhibition (Costa et al., 2010; Stefanie Dietmair et al., 2011; Klein et al., 2015). This phenotype was successfully exploited by (Vallée et al., 2014) through a fed-batch strategy leading to an increase of the maximum cell density up to 10.10^6 cells/mL and 4- fold of the yield in interferon compared to a batch culture of the parental clone. From these achievements, which clearly showed the benefit of “pulling” on the metabolism bypassing a well-controlled entry point to the Krebs’ cycle (TCA), the development of an efficient and cost-effective bioprocess still requires efforts on the understanding of cell metabolism applying further metabolic engineering works optimizing carbon flow. Moreover, it is well known that the production of recombinant proteins results in a metabolic burden and is energetically costly with three molecules of ATP required for the synthesis of one peptide bond (Seth et al., 2006; N. Templeton et al., 2013). This high demand concerns not only the building blocks for protein synthesis and translation and transcription such as amino acids and nucleotides, but also energy in form of ATP or NADPH for all stages including protein folding (Klein et al., 2015).

The use of metabolic flux analysis (MFA) and ^{13}C labeling showed that the peak antibody production occurs at late exponential and stationary phases and is associated with elevated oxidative pentose phosphate pathway (PPP) activity and high NADPH production (Ahn & Antoniewicz, 2011; Sengupta et al., 2011; N. Templeton et al., 2013). In the contrary, the peak cell growth rate is observed at mid exponential phase and is characterized by a high glycolytic

rate. (Dean & Reddy, 2013) have hypothesized that high producer clones may be characterized by a highly active oxidative metabolism. Some strategies aiming at redirecting the flux through PPP have already proven being successful in bacteria and yeasts through G6PDH overexpression or combined with other enzymes (Fang et al., 2013; Flores et al., 2004; Kwon et al., 2006; Shi et al., 2013), since NADPH is mostly synthesized via PPP by the G6PDH enzyme and to a lesser extent by 6PGD, malic enzyme and isocitrate dehydrogenase (Duan et al., 2010; Stanton, 2012; W-N Tian et al., 1998; Wang & Engel, 2009). In addition and of interest, G6PDH is thought being necessary to counter the damages caused by reactive oxygen species (ROS) and restore the redox balance (Pandolfi et al., 1995; W-N Tian et al., 1998; WN Tian et al., 1999; Ursini et al., 1997; Zhang et al., 2012), such as stressful conditions imposing a metabolic load from recombinant protein processing.

In this work, we have investigated the effect of enhancing the rate of entry of G6P into PPP, thus bypassing the highly regulated glycolysis upstream (Ghorbaniaghdam et al., 2014b), on the production yield and maximum cell density in HEK-293 cells. We have overexpressed the G6PDH gene level by transient transfection of HEK293 D9 and F5 clones in batch cultures. The analysis of the G6PDH activity and of the cell metabolome revealed a high cell metabolic robustness and a high regulation level of the PPP.

4.5 Materials and Methods

Cell lines

The parental cell line HEK293-D9 is derived from the HEK-6E cell line constitutively expressing the EBNA1 protein from the Epstein-Barr virus (Loignon et al., 2008). The HEK293-F5 clone was generated from the parental cell line by transfection of the cytoplasmic yeast pyruvate carboxylase 2 gene (PYC) (Elias et al., 2003) (Gene ID: 852519) as described in (Henry & Durocher, 2011).

Cell culture

Before culturing the cells, fresh Freestyle F17 expression medium (Invitrogen Life Technology, USA) was supplemented with 4 mM glutamine (Sigma-Aldrich, USA) and 0.1% (w/v) Kolliphor P188 (Sigma-Aldrich). Cells were inoculated at 0.2×10^6 cells/mL in 125 mL shake-flasks

(VWR, Canada) and grown in suspension at 37°C under 5% CO₂ on an orbital shaker at 120 RPM. Batch experiments were carried out in duplicate at a 20 mL initial working volume. Cells (except negative control) were transfected at a 2.10⁶ cells/mL density. Cultures were harvested each day and supernatants were collected by centrifugation at 300 g for 5 min. Samples were stored at -20°C for subsequent analyses.

Plasmids and cell transfection

Empty plasmid pDsRed-Monomer-N1 was obtained from Clontech Laboratories (USA) and was used as a control to assess the impact of transfection. The modified pDsRed1-N1 vector used to overexpress G6PDH was provided by Dr. Gupte (Gupte et al., 2011). Because of commercial unavailability, the two plasmids differ in that they have not the same fluorescent dye. The pDsRed-Monomer-N1 plasmid codes for the monomeric DsRed protein (max. excitation/emission at 557/592 nm) and the pDsRed1-N1 vector codes for the original DsRed protein (558/583 nm). DsRed is fusionned with G6PDH, thus allowing the direct screening of the secreted molecule. It has been reported that the DsRed from pDsRed-N1 is only fluorescent as oligomers (Sacchetti et al., 2002). 25 kDa linear polyethylenimine (PEI) was obtained from Sigma-Aldrich. The PEI solution was prepared as reported by (Tom et al., 2007). DNA and PEI were incubated in 10% of the final volume in culture medium without Kolliphor for 10 min at room temperature and then added to cultures. Final DNA concentration in the media was set at 1 µg/mL. Early tests were performed to assess PEI/DNA ratios (data not shown) and a 2:1 PEI:DNA ratio was found to be optimal. Transfection efficiency was screened using a fluorescence microscope (ZEISS Observer.Z1).

Metabolites extraction

3.10⁶ cells were washed with cold PBS and extracted with 400 µL of 80% cold methanol in the presence of 0.2 g of Sand (Sigma-Aldrich). After 30 min on dry ice, the mixture was vortexed and sonicated in iced water bath for 5 min. The mixture was then centrifuged for 7 min at 21,000 g and 4°C to collect supernatants. Pellets were extracted a second time with 200 µL of 50% cold methanol and a third time with 200 µL of cold water as described above. Supernatants were mixed, filtered through 0.2 µm PTFE filters (VWR) and store at -80°C for subsequent analyses.

Analytical methods

Cell density and viability were assessed with a hemocytometer and a standard light microscope using the trypan blue exclusion method. High cell density samples were diluted in phosphate-buffer saline (Sigma-Aldrich) before mixing with the exclusion dye. Glucose, lactate, glutamine and glutamate concentrations were measured using a dual-channeled immobilized oxidase enzyme biochemistry analyzer (2700 SELECT, YSI Inc. Life Sciences, Yellow Springs, OH, USA) using calibration buffers provided by the manufacturer. Interferon- α titers were measured using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the Human IFN- α Platinium ELISA kit (eBioscience, USA) according to the manufacturer's instructions. G6PDH activity assay was performed using Bertin Pharma's kit (France, Cat. #D05010) according to manufacturer's instructions. Nucleotides, organic acids and sugar phosphates concentrations were assessed using an Agilent 1290 HPLC system (Agilent technologies, Quebec, Canada) as previously described in (Ghorbaniaghdam et al., 2014a). Amino acids analysis was conducted on the same Agilent system according to (Ghorbaniaghdam et al., 2014a). Ammonia extracellular concentrations were analyzed using an ammonia assay kit (K-AMIAR, Megazyme International Ireland Ltd).

Western Blot analysis

4.10^5 cells were first washed with cold PBS containing 1 mM sodium orthovanadate and then lysed in 100 μ L of lysis buffer (50 mM HEPES of pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Thesit, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM sodium orthovanadate) for 20 min on ice (Boucher et al., 2008). Insoluble materials were removed by centrifugation at 10,000 g for 5 min. Samples were mixed 3:1 (v/v) in a buffer containing 25 % glycerol, 0.011 % bromophenol blue, 2 % SDS, 5 % beta-mercaptoethanol and 62.5 mM Tris HCl, pH 6.8, and boiled for 5 min. Proteins were separated at 200 V for ~35 min using 10% acrylamide gels. Proteins were transferred to a PVDF membrane (Bio-Rad, USA) using Tris-glycine buffer for 1 h at 200 mA. The membrane was blocked with 5% skimmed milk in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20. Probing was done with a 1:1,000 diluted G6PD rabbit primary antibody (Cell Signaling, USA, Cat. #12263) incubated at 4°C overnight and specific binding was detected after rinse using a 1:1,000 diluted HRP-linked anti-rabbit IgG (Cell Signaling, Cat. #7074) incubated 1 h at room temperature. The

visualization was performed using a chemiluminescence HRP detection kit (Immun-Star, Bio-Rad, USA).

4.6 Results and discussion

Active G6PDH can be overexpressed in both HEH293 cell lines

First transfection condition was tested at 24 h but it showed to be highly detrimental to cell growth and viability (data not shown). Both cell lines were thus transiently transfected at late exponential phase, maximizing the importance of interfering on the cell oxidative state overexpressing G6PDH. Transfections were thus performed at 67 h, at cell viabilities above 95%. Both cell lines show fluorescence 48 h and 72 h post-transfection (Fig. 4-1 A), in either cells transfected with empty plasmid or G6PDH. Plasmid integration was even confirmed 24 h post-transfection, with a light fluorescence partly due to the slow maturation of the DsRed protein (Baird et al., 2000; Cotlet et al., 2001), and was maintained until the end of the culture (166 h). G6PDH expression was specifically assessed by western blot (Fig. 4-1 B), with a clear confirmation of the fused G6PDH-DsRed protein at 75 kDa in all the transfected batches, for both cell lines. Natural monomeric and dimeric G6PDH appear at 50 and 100 kDa respectively. Since G6PDH may be expressed without being active, its activity was quantified (Fig. 4-2). Firstly, 48 h post-transfection, both F5 and D9 cells transfected with G6PDH exhibited an enhanced activity level of the enzyme compared to the non-transfected cells (735 and 252 % for the F5 and D9 clones, respectively). The differences between the clones may be explained by the fact that they have not the same growth behavior and so are not in the same phase and state at that time of transfection. Indeed, the D9 cells were already reaching stationary phase one day post-transfection while the F5 cells were still in late exponential phase, hence facilitating plasmid uptake and traduction. 6PGDH activity was also assessed at the same time and G6PDH overexpression did not appear to affect the activity of the second enzyme of the PPP in neither cell lines. Activities of the cells transfected with the empty plasmid was not significantly different to that of the control. Interestingly, G6PDH activity level remained higher than the control later in the culture, as measured 72 h post-transfection (280 and 248 % for the F5 and D9 clones, respectively). The decrease of G6PDH activity for the F5 clone between 48 and 72 h post-transfection could be attributed to a clonal effect from the PYC-modified metabolism. The overall activities showed to decrease 72 h post-transfection, which is probably due to a slowing

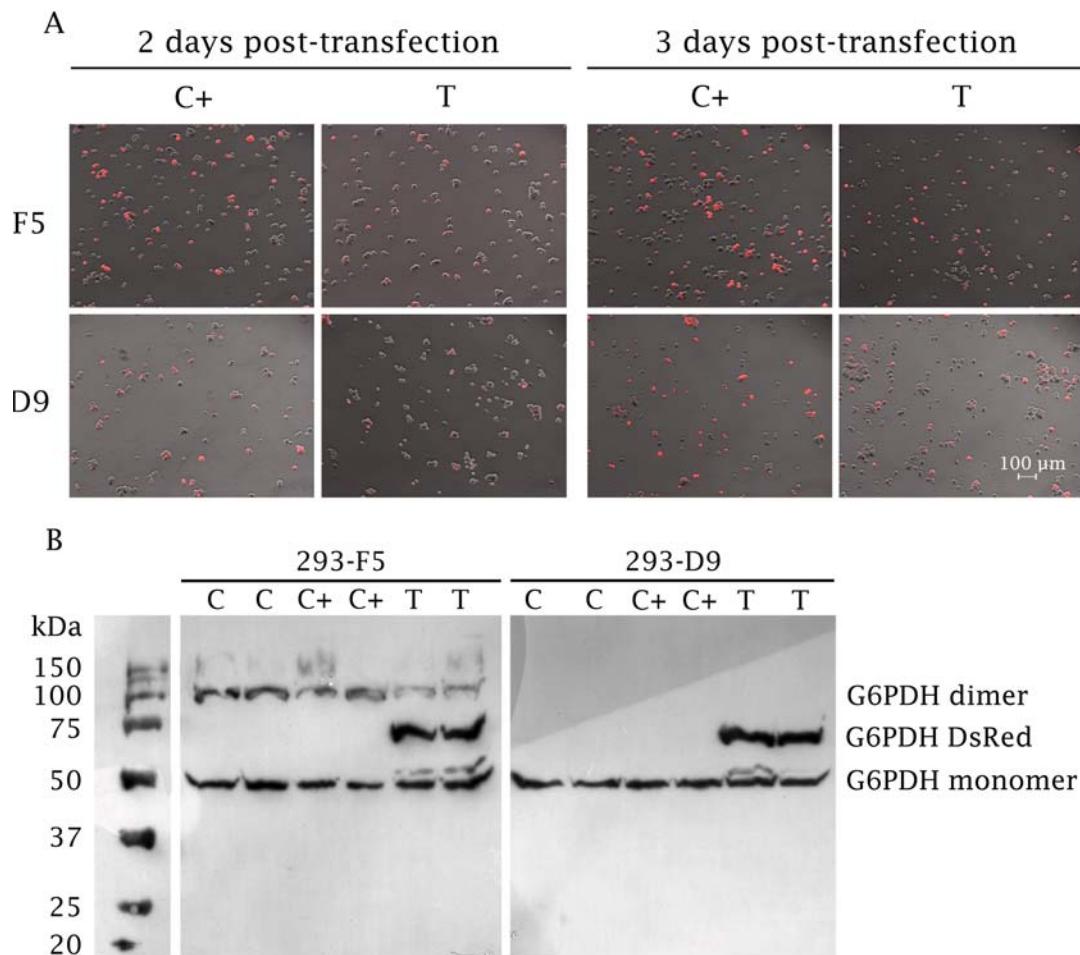


Figure 4-1: Fluorescence microscopy of transfected cells 48 h and 72 h post-transfection. C+ stands for cells transfected with empty plasmid (max. excitation/emission at 557/592 nm) and T for cells transfected with fusionned DsRed-G6PDH (558/583 nm) (A) and western blot analysis of G6PDH expression. C stands for the control (non-transfected), C+ for cells transfected with empty plasmid, and T for cells transfected with G6PDH (B).

metabolism of the cells at the plateau phase. Interestingly, enzymes activities, even for the controls, are lower in the parental cells than in the PYC cells, while it has been reported that the flux through PPP was reduced in the PYC cells, but in a study conducted using a different media formulation and semi-continuous cultures (Henry & Durocher, 2011). Indeed in our study, activities are not measured at the same density nor in a condition where fresh media is added. However, enzyme activities may not be representative of the fluxes, as it has already been reported that a 15-fold increase in G6PDH resulted in no significant flux improvement via PPP in

E. coli (Nicolas et al., 2007). These results indicate that G6PDH was overexpressed and its activity significantly enhanced in the transfected cultures, with a large fraction of the cells transfected as confirmed by the DsRed fluorescence, as already demonstrated by (Gupte et al., 2011) in HEK 293T17 cells for the same plasmidic system.

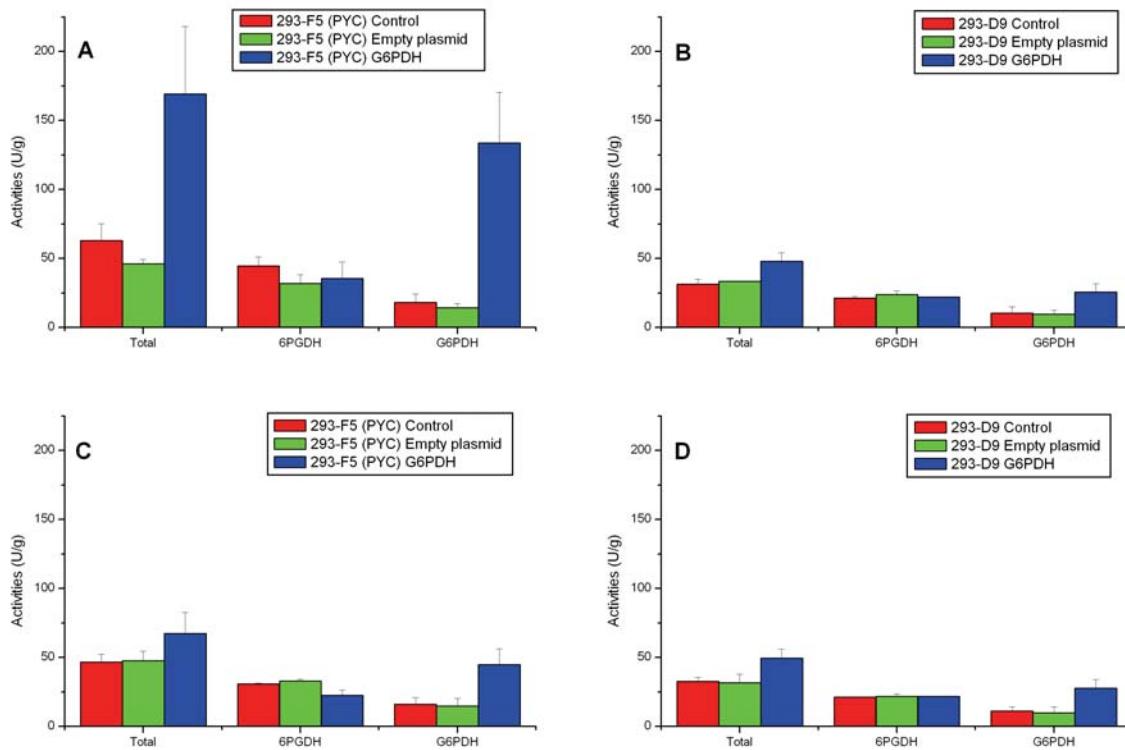


Figure 4-2 : G6PDH, 6PGDH and total (G6PDH + 6PGDH) activities in PYC expressing (293-F5) at 48 h post-transfection (A) and 72 h post-transfection (C) and parental cells (293-D9) cells at 48 h post-transfection (B) and 72 h post-transfection (D). Error bars are standard error of the mean. U is defined as the amount of enzyme that will catalyse the conversion of 1 umol of substrate per minute.

G6PDH overexpression has no impact on both growth and nutrient consumption...

The parental and PYC clones were cultured in batch and transfected either with the empty plasmid or the plasmid coding for G6PDH at the end of exponential growth (F5 clone) and early plateau phase (D9 clone). Non-transfected cells of each clone served as a true control

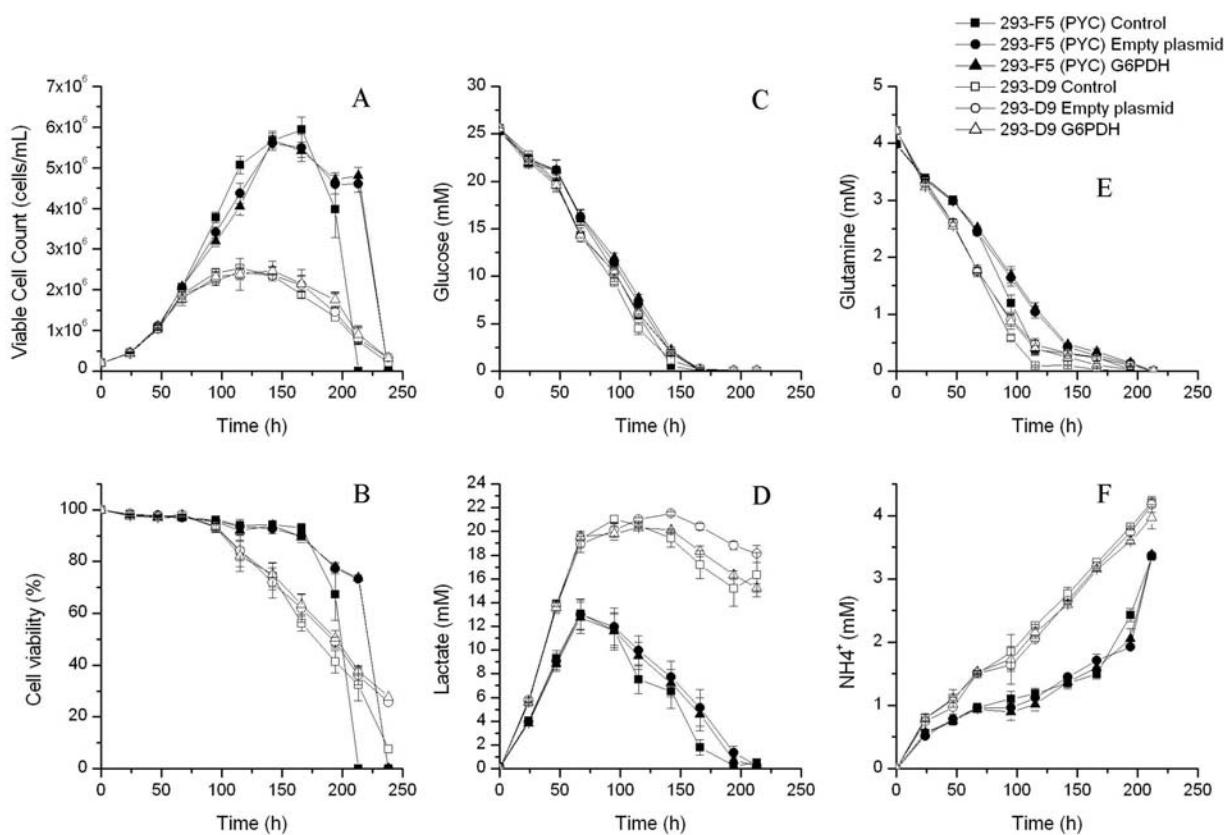


Figure 4-3 : Viable cell (A), viability (B), glucose (C), lactate (D), glutamine (E) and ammonia (F) concentration profiles during batch cultivation in shake flasks of parental (293-D9) and PYC expressing (293-F5) cells. Error bars are standard error of the mean.

and cells transfected with the empty plasmid served as a control in regards of the transfection effect. No significant difference attributable to G6PDH overexpression or transfection was observed regarding maximal cell density or growth rate for the two clones (Fig. 4-3 A-B). However, a slight transfection effect with lower viable cell densities during the growth phase (67 – 145 h) and an extended cell viability (0% at 213 vs. 238 h for the PYC cells) for both the cells transfected with the empty plasmid and the cells transfected with G6PDH can be observed, compared to the control. Glucose and glutamine were also uptaked at slower rates, as well as for lactate to a lesser extent, following transfection (Fig. 4-3 C-D-E). There was, therefore, no significant specific effect of G6PDH overexpression. The 293-F5 clone reached a maximum cell concentration of ~6.10⁶ cells/mL compared to ~2.5. 10⁶ cells/mL for the parental. These

maximum cell densities are similar to those reported by (Vallée et al., 2014) for the same clones. As reported previously (Henry & Durocher, 2011), the cell density increase for the PYC clone compared to the parental one is due to a prolonged exponential phase regarding that the growth rates are quite similar (0.036 and 0.035 h^{-1} for the PYC and the D9 clones, respectively). Thereafter, cultures of transfected cells lasted one day more than the control, but it is most likely due to nutrients depletion and not to G6PDH overexpression, since this phenomenon was also observed for cells transfected with empty plasmid. Apart from the slight differences mentioned above and attributed to a transfection effect, the two clones behaved similarly than as described previously with a more efficient metabolism of the PYC cell line in batch mode, as shown by a lower specific lactate production (13 vs 19 mM in 67 h for the F5 and D9 clones, respectively) and a shift for lactate consumption in the mid-late exponential phase. (Henry & Durocher, 2011; Vallée et al., 2014), and with different media formulation. Only differences between clones can be noted because transfection occurred in late exponential phase (Table I). Concomittant with reduction in lactate production and reduction in glutamine consumption for the F5 clone, less ammonia was produced (Fig. 4-F) and those phenomena favor cell growth (Cruz et al., 2000).

Tableau 4 : Cell specific consumption/production rates during exponential phase.

	293-D9			293-F5		
	Control	Empty plasmid	G6PDH	Control	Empty plasmid	G6PDH
$\mu\text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.035 ± 0.001	0.035 ± 0.002	0.036 ± 0.002	0.036 ± 0.01	0.036 ± 0.001	0.035 ± 0.01
$q_{\text{glucose}}\text{ (pmol.cell}^{-1}.\text{d}^{-1}\text{)}$	7.22 ± 0.46	7.77 ± 0.29	8.13 ± 0.03	5.49 ± 0.16	5.50 ± 0.09	5.80 ± 0.20
$q_{\text{lactate}}\text{ (pmol.cell}^{-1}.\text{d}^{-1}\text{)}$	14.58 ± 0.87	15.53 ± 0.35	14.95 ± 0.06	8.28 ± 0.12	8.02 ± 0.06	8.09 ± 0.14
Lactate/glucose ratio	2.01 ± 0.01	2.00 ± 0.03	1.83 ± 0.001	1.51 ± 0.03	1.46 ± 0.02	1.39 ± 0.03
$q_{\text{mAb}}\text{ (pg.cell}^{-1}.\text{d}^{-1}\text{)}$	12.58 ± 1.75	12.89 ± 0.61	12.12 ± 0.41	4.34 ± 0.20	4.53 ± 0.68	4.35 ± 0.28

... nor on interferon production

Similarly to cell growth behavior, the maximal interferon titer was not significantly affected by transfection, although both clones transfected with empty plasmid or G6PDH exhibit a slower production rate (4.4 vs 3.7 and 8.2 vs 7.6 $\mu\text{g}/10^6\text{ cells/d}$, for the F5 and the D9, respectively) (Fig. 4-4). This result suggests that the synthesis of the fluorescent dye alone or of the fused G6PDH-

DsRed might, together with the transfection conditions, be at the expense of growth and protein production. A slight decrease is observed at 115 h and 166 h for parental cells and PYC expressing cells respectively, culture times corresponding to the decrease of cell viability for both cell lines. Parental cells yielded a maximum interferon concentration of 140 mg/mL whereas the PYC clone reached 110 mg/mL. It is often reported in literature that high producing clones present a more efficient lactate metabolism (Dean & Reddy, 2013; S. Dietmair et al., 2012; Ghorbaniaghdam et al., 2014a). Even if the PYC clone seems to be metabolically more efficient, this has not been translated into an improved production compared to the D9 clone, suggesting that the ameliorations gained in terms of growth are detrimental to interferon production in batch mode.

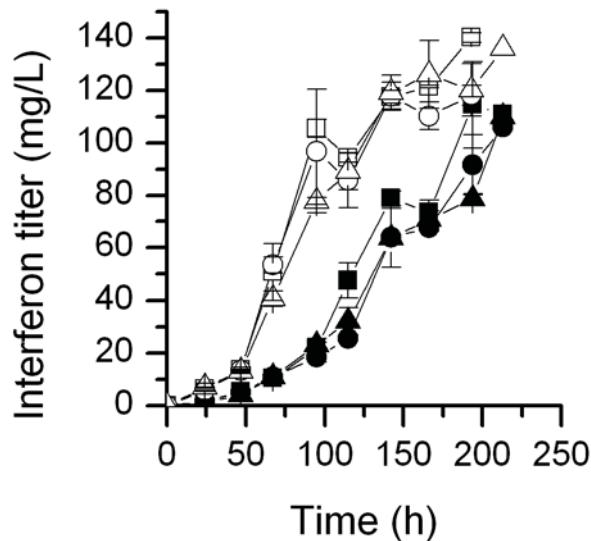


Figure 4-4 : Recombinant interferon titers. Same legend as in Figure 4 applies.

PPP is highly regulated: G6PDH overexpression has no effective long-term effect on the cells metabolic behavior

Concomitant with the results on cell growth and interferon production, apart for some epiphenomena, no significant effect due to G6PDH overexpression was observed at the metabolic level. It was expected that G6PDH overexpression would enhance NADPH production rate, and thus modifies the PPP dynamic such as the NADPH-to-NADP⁺ trends. Comparing average

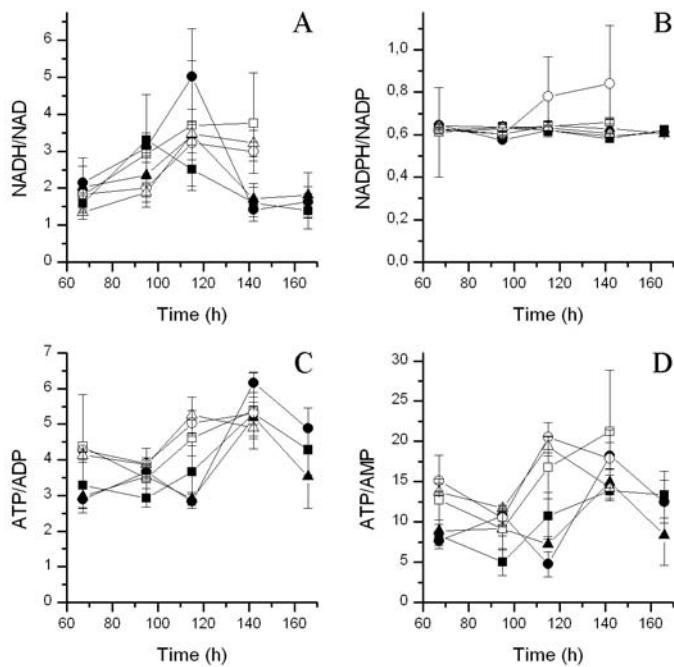


Figure 4-5 : Major energetic and redox intracellular components ratios post-transfection.
 NADH/NAD⁺ (A), NADPH/NADP⁺ (B), ATP/ADP (C) and ATP/AMP (D). Same legend as in
 Figure 4 applies.

values, one day post-transfection, transfected cells exhibit lower levels of NADPH and NADP⁺ (Fig. 4-6 C-D) but the G6PDH transfected cells seem to compensate for the transfection effect, as shown from results for the empty plasmid. More interestingly, there is no significant effect of transfection on the NADPH-to-NADP⁺ ratio (Fig. 4-5 B), with empty plasmid or G6PDH, and it is constant for both cell lines and at a similar value, except for the transfected D9 cells with empty plasmid while this difference is not significant when considering the error bars. (Neil Templeton et al., 2013) observed a drop of the NADPH-to-NADP⁺ ratio at peak flux through PPP in fed-batch culture of CHO cells, while no such drop was observed in this work, even in the control cultures. The stability of the ratio indicates a strong robustness of the cells metabolism. The fact that 6PGDH activity is not affected by G6PDH overexpression (Fig. 4-2), together with stable intracellular metabolites and nucleotides pools (Fig. 4-6 and 4-7) are supporting this hypothesis. At first sight, it can be hypothesized that the overall production of NADPH, including

from other sources than G6PDH, is regulated and compensated. (Henry & Durocher, 2011) reported that malic enzyme compensated a loss in NADPH production due to lesser fluxes to PPP in PYC cells. Indeed, (Pollack et al., 2007) showed that NAD kinase, producing NADP⁺ from NAD⁺, is an efficient enzyme candidate to enhance NADPH pool, but it also provides only a moderate protection increased against oxidative stress. Re-reducing NADP⁺ into NADPH by the various dehydrogenases may be a favored mechanism to maintain NADPH level in HEK293 cells. Interestingly, in their study, overexpression of NADK did not affect mRNA levels of G6PDH, 6PGL or 6PGDH, so no increase in the activities of the overall reducers of NADP⁺ was observed, thus accounting that their activities are sufficient to reduce the excess of NADP⁺. Of interest, that cells lacking NADK only show a slight increase of those mRNA levels, accounting for cell robustness. The hypothesis of refueling NADPH by re-reducing NADP⁺ is thus consistent with the constant ratio obtained in this study. Regarding G6P, the entry point of PPP, its level for the cells transfected with G6PDH seem slightly higher in both cell lines until 142 h (Fig. 4-7 E). Contrary to what could have been expected, G6PDH overexpression did not lead to a decreased pool of G6P. This suggests that the reaction is repressed even in the presence of large quantities of the active enzyme, similarly to what have been reported by (Nicolas et al., 2007). D9 cells exhibit higher levels of G6P, glycerol-3-phosphate and GA3P & DHAP than the F5 cells, a result that can mostly be attributed to the pull effect toward the TCA cycle in the PYC cells. The level of GA3P & DHAP and glycerol-3-phosphate in the G6PDH transfected D9 cells are clearly higher (Fig. 4-7 C-F), indicating an accumulation phenomenon, probably via PPP. Indeed GA3P & DHAP are the point of return of PPP in the glycolysis.

The PYC gene expression has a strong effect on the cells energetic and redox state, but not the G6PDH

As shown earlier, G6PDH overexpression has no impact on the overall NADPH-to-NADP⁺ ratio, and the same observation can be noted for the other energetic and redox compounds, apart from some epiphenomena related to transfection. One day post-transfection, ATP-to-ADP and ATP-to-AMP ratios increased for the transfected F5 cells, and NADH-to-NAD⁺ ratio decreased in both cell line, according to the lower level of ADP and AMP in the F5 cells and accompanied with lower NADH, NAD⁺ levels in the two cell lines (Fig. 4-5 A-C-D and 4-6 J-K). Contrary to

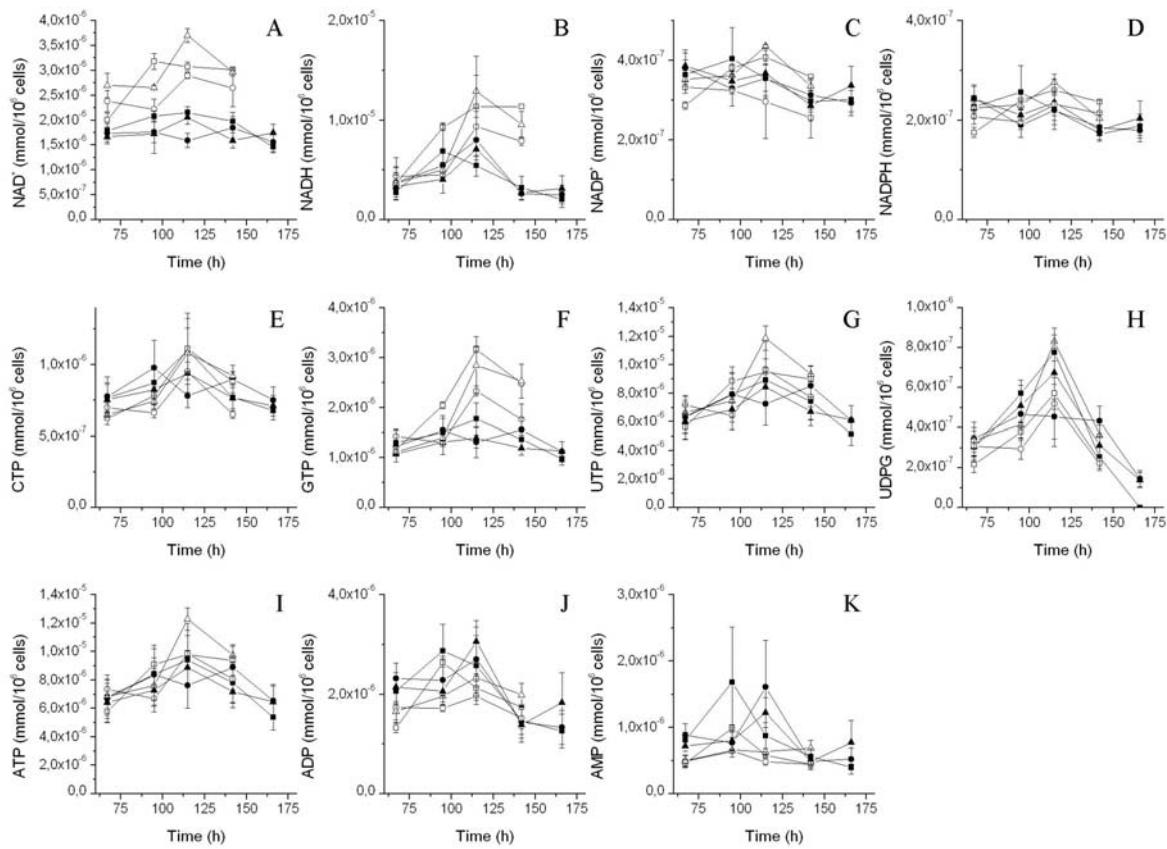


Figure 4-6 : Intracellular nucleotides concentrations post-transfection. NAD⁺ (A), NADH (B), NADP⁺ (C), NADPH (D), CTP (E), GTP (F), UTP (G), UDPG (H), ATP (I), ADP (J) and AMP (K). Same legend as in Figure 4 applies.

expected, the ATP-to-ADP, ATP-to-AMP and NADH-to-NAD⁺ ratios are lower for the PYC clone than for the parental (Fig. 4-5 A-C-D). The ATP-to-AMP ratio is more sensitive to changes in energetic state of the cell (Hardie, 2004), and is there showing an unfavorable energetic state in the PYC cells. Moreover, the cell concentrations in NAD⁺ and NADH are also lower for the PYC clone compared to the parental (Fig. 4-6 A-B-C-D). However, no elevation in the ATP pool was observed for the PYC cells (Fig. 4-6 I), a behavior which has been reported for PYC expressing BHK cells; since high intracellular ATP level is normally interpreted as a better energetic efficiency (Irani et al., 1999). But higher ADP levels in the F5 cells may account for a higher ATP utilization (Fig. 4-6 J). Lower energetic and redox ratios may indicate increased fluxes and

consumption, or at least a higher and sustained energetic demand. A lower NADH-to-NAD⁺ ratio favors the reactions in the TCA cycle and the conversion of lactate to pyruvate, and lower NAD⁺ in the PYC cells is consistent with its use in those reactions. Indeed, lower concentration in electron carriers such as NADH can partly explain the lower interferon production level of the PYC cells, since it has been reported by (Chong et al., 2012) for CHO cells that high producer cell lines exhibit higher levels of those molecules. Normally, the conversion of lactate to pyruvate and the high flux rates through TCA cycle (Henry & Durocher, 2011) should result in increased NADH levels in PYC cells, and even in increased NADPH via increased H⁺ gradients through mitochondrial membranes (Ying, 2008). An increased NADH-to-NAD⁺ ratio in PYC CHO cells was observed by (Wilkens & Gerdzen, 2015), contrary to us, showing that increased NADH-to-NAD⁺ levels are consistent with low lactate synthesis. However, our results are consistent with increased pyruvate recycling via malic enzyme observed in (Henry & Durocher, 2011), hence consuming NADH. Interestingly, our ratio drops as the intermediates concentration in the TCA drop (Fig. 4-7 B-D-G-H). In contrary to what is usually reported (Wilkens et al., 2011; Ying, 2008), NADH-to-NAD⁺ ratios are higher than NADPH-to-NADP⁺ ratios in our study, maybe indicating that the overall NADPH production is insufficient in both cell lines. The PYC cells also exhibit lower levels of glycerol-3-phosphate (Gly3P) and DHAP (Fig. 4-7 C-F). Or, the glycerol phosphate shuttle (Gly3P, DHAP) main function is to reoxidize the cytosolic NADH and reduce FAD in the mitochondria, hence sustaining ATP production and NAD⁺ recycling. The low level of Gly3P and DHAP in the F5 cell line indicates that this shuttle is probably not efficient enough, thus explaining the lower levels of NAD⁺ and ATP. It could be hypothesized that the prolonged exponential phase of the PYC cells will require a higher de novo synthesis of nucleotides, with higher ATP and ATP-to-ADP ratio levels and requires 0.1 pmol of NADPH per cell per division to support cell growth (Lane & Fan, 2015). Moreover, studies have tackled the importance of G6PDH in cell growth (W-N Tian et al., 1998), for providing R5P for nucleic acids synthesis (Stanton, 2012). But no long term significant change was observed due to G6PDH in the nucleotides pools. F5 cells exhibit similar levels of CTP and UTP than the parental cells, but lower levels of GTP and higher levels of UDPG (Fig. 4-6 E-F-G-H). It should be noted that G6PDH transfected D9 cells seem to compensate for the transfection effect in CTP and GTP at 115 h and even enhance UTP and UDPG at this timepoint (Fig. 4-6 E-F-G-H), maybe due to the increases synthesis of precursors via PPP. Accumulation of GTP in D9 cells can be attributed to

early cell growth arrest. (Chong et al., 2012) reported that high producers have more nucleotide-activated sugar precursors, such as UDPG, a precursor of N-glycans or glycolipids for plasmic membrane synthesis . Its high level in the PYC cells can thus be attributed to the needs related to cell growth and glycosylation.

TCA cycle activity is neither affected by G6PDH overexpression

None of the TCA metabolites assessed in this study was significantly affected by G6PDH overexpression, nor transfection (Fig. 4-7). F5 (PYC) cells exhibit lower levels of pyruvate, glycerol-3-phosphate and GA3P & DHAP than the parental cells (Fig. 4-7 A-C-F), accounting for the pull effect of the PYC toward TCA cycle. This is consistant with (Luo et al., 2012) where metabolites measured in the TCA and glycerol-3-phosphate are lower for CHO cells exhibiting a switch to lactate consumption. Pyruvate levels are decreasing in both cell lines, but harshly in the D9 clone. It is because lactate consumption is fueling pyruvate levels in the PYC clone and lactate production has already been linked with pyruvate accumulation in the cells (Wilkens et al., 2011). In the opposite, D9 cells show lower levels of malic acid, succinic acid, fumaric acid and alpha-ketoglutaric acid (Fig. 4-7 B-D-G-H). Interestingly levels of these metabolites drop in the F5 cells after 95 h, when they are entering late exponential phase accordingly with the beginning of lactate consumption, indicating a metabolic switch through TCA cycle. But it appears that the PYC cells are lacking those molecules, as well as pyruvate at the end of the culture. Extracellular amino acids concentrations are backing those observations. Concentrations of threonine, isoleucine, leucine, methionine, valine, tyrosine, serine, arginine, lysine and phenylalanine exhibit very similar trends (Fig. 4-8 A-B-C-D-E-F-J-N-O-Q): the levels are decreasing, with a plateau beginning at 115 h or 145 h. The two cell lines show similar behavior except that PYC cells consume less amino acids per 10^6 cells except for asparagine, lysine and histidine (Fig. 4-9) and reach levels lower than those observed for the parental cells. They also produce less proline and more alanine, glycine and glutamate. However, (Henry & Durocher, 2011) reported increased utilization of threonine, arginine, valine, isoleucine, leucine, lysine, phenylalanine, lower glutamate production and asparagine production by the PYC cells, but they reached a lower cell density in an other media formulation. The PYC cells depleted serine and arginine earlier than the D9 cells, just before entry in the stationary phase, thus avoiding further

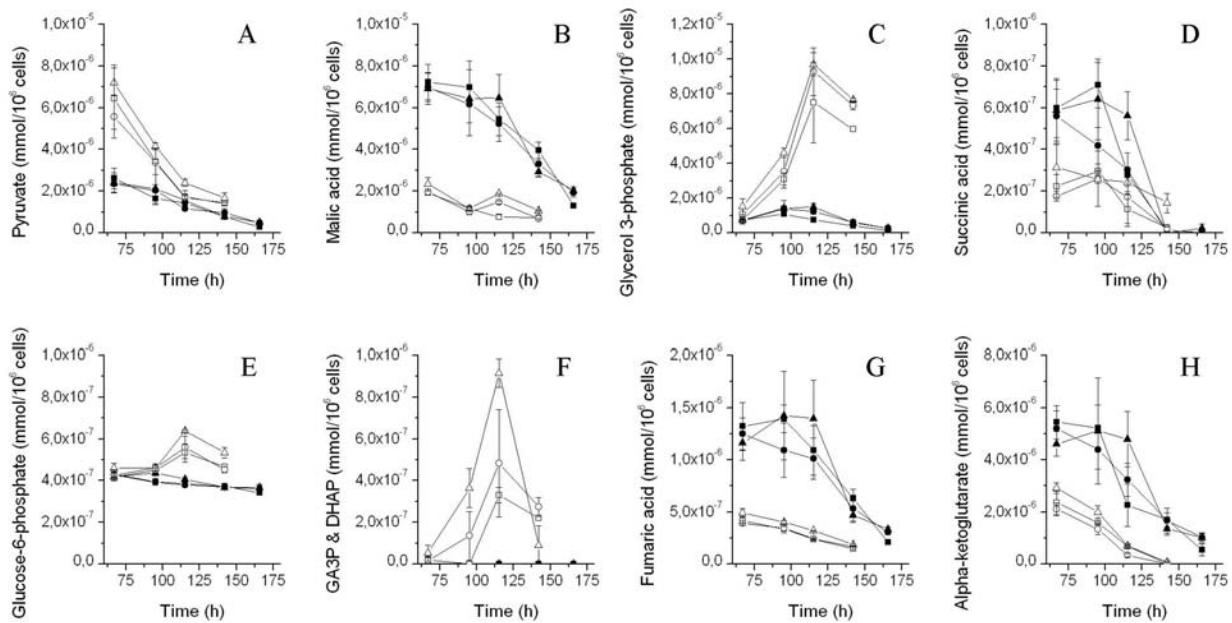


Figure 4-7 : Major intracellular metabolites concentrations post-transfection. Pyruvate (A), Malic acid (B), Glycerol 3-phosphate (C), Succinic acid (D), Glucose-6-phosphate (E), Glyceraldehyde-3-phosphate (GA3P) & Dihydroxyacetone phosphate (DHAP) (F), Fumaric acid (G) and Alpha-ketoglutarate (H). Same legend as in Figure 4 applies.

utilization and suggesting that they are growth-limiting nutrients. Asparagine is consumed in both cell lines (Fig. 4-8 L and Fig. 4-9), but is more utilized by the PYC cell line. High asparagine consumption has been likely linked to replenishment of the TCA cycle intermediates (Carinhas et al., 2013; Sellick et al., 2011). Indeed, most of these amino acids are precursors or products of the TCA cycle. It is also expected that with an extended exponential phase, the PYC cells consume nutrients for a longer time to support cell growth. Proline is clearly produced during the culture of both cell lines, but it is more accumulated in the extracellular media of D9 cells (Fig. 4-8 G and Fig. 4-9). It can be synthesized from glutamate, and the higher level of proline for the D9 cells are concomitant with the lower level of glutamate. Alanine levels are more fluctuating (Fig. 4-8 H) but globally, alanine levels of the PYC culture are higher at the end of the culture. Alanine

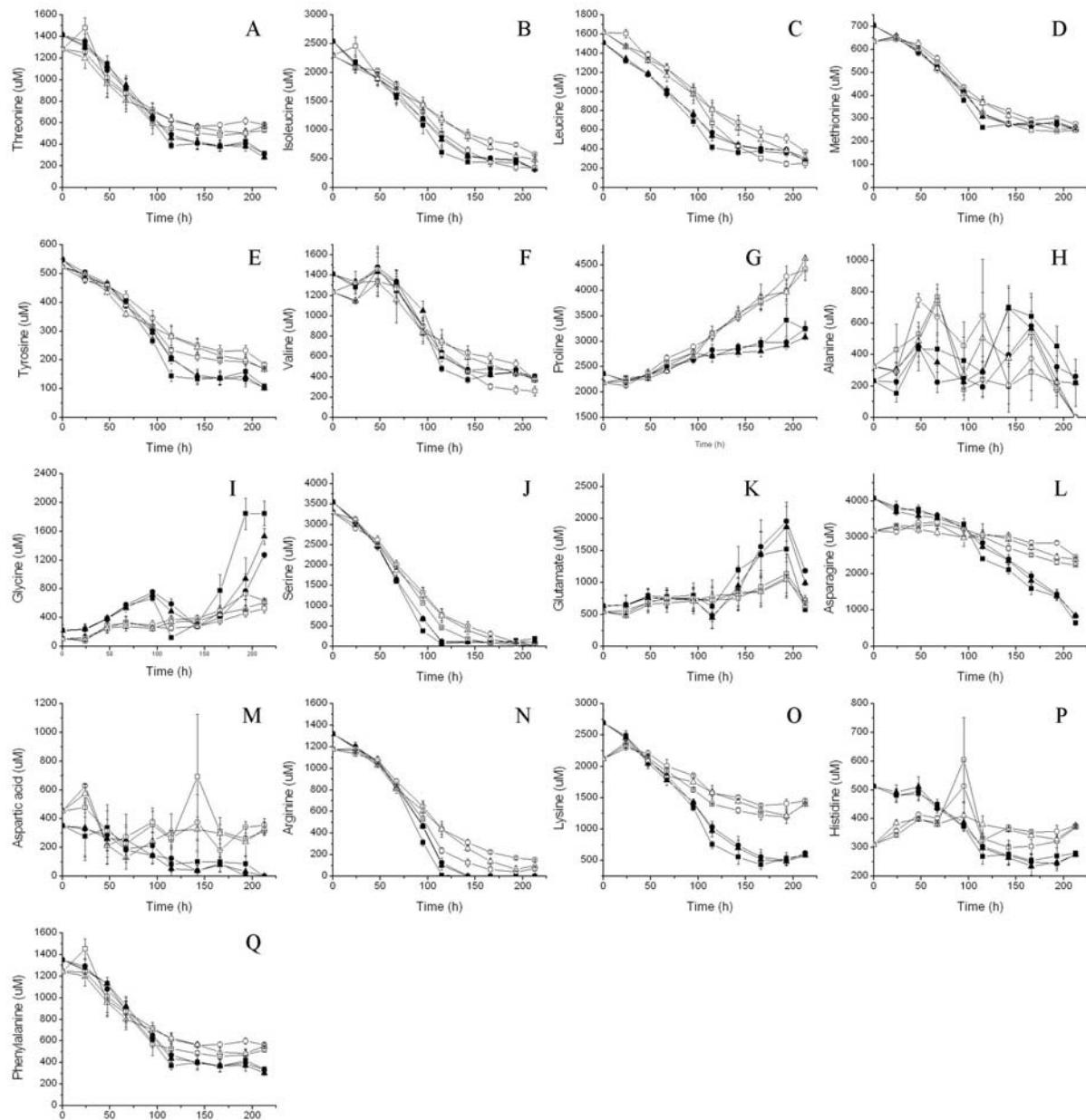


Figure 4-8 : Extracellular amino acids concentrations during batch culture. Threonine (A), Isoleucine (B), Leucine (C), Methionine (D), Tyrosine (E), Valine (F), Proline (G), Alanine (H), Glycine (I), Serine (J), Glutamate (K), Asparagine (L), Aspartic acid (M), Arginine (N), Lysine (O), Histidine (P) and Phénylalanine (Q). Same legend as in Figure 4 applies.

can be synthetized from pyruvate or other amino acids such as isoleucine, leucine and valine, therefore its fluctuation can be related to an equilibrium with pyruvate. Aspartic acid, precursor

of pyrimidins used in nucleotides synthesis, is utilized equally by the two cell lines, to meet the needs of nucleotides synthesis and cell growth (Fig. 4-8 M and Fig. 4-9). Histidine level is quite constant over the whole culture of D9 cells, while it decreases for the PYC cells, reaching a lower level at the end of the culture, maybe to supply alpha-ketoglutarate for the TCA. As seen previously with glucose and glutamine, a slight transfection effect can be observed on amino acids uptake but not attributable to G6PDH. G6PDH did not impact metabolites concentration in none of the cell lines, but given the modified metabolism of the PYC cell line, the two cell lines have very different profiles regarding metabolites.

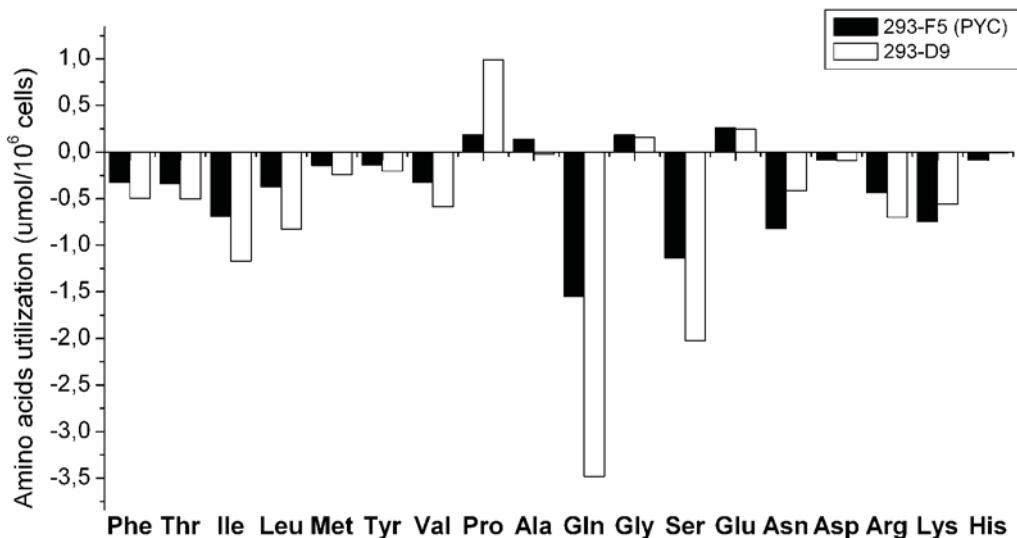


Figure 4-9 : Comparison of amino acids utilization (from 0 and 166 h). Positive values indicate production.

4.7 Conclusions

In this work, we have transiently transfected two filiated HEK 293 clones with G6PDH in an attempt to bypass the highly regulated glycolysis and increase NADPH and precursors production for both protein production and cell growth. The PYC cell line was expected to amplify the effect of G6PDH overexpression, because of the “pull” effect of PYC from glycolysis downstream toward the TCA cycle. Some epiphenomena can be observed, mostly one day post-transfection, where levels of metabolites for the transfected cells do not follow the same trend as for the control. The results show that both cell lines, parental and the F5 clone, are highly robust towards

G6PDH overexpression, showing little change in terms of protein production, cell growth and metabolites concentrations. Similar experiments have been performed on IgG producing CHO cells in 6-well plates and shake-flasks and no effect was observed on antibody titer nor cell growth even with overexpressed and overactivated G6PDH. This also indicates that pentose phosphate pathway regulation should be reviewed in the initial model in our group. However, signatures of the two cell lines are relevant in terms of energetic, redox states and metabolites concentrations, which can be used to engineer proper media feeding.

4.8 Acknowledgements

The authors would like to thank Nicole Pham and Jean-Sébastien Lord for their technical help.

4.9 References

- Ahn, WS, & Antoniewicz, MR. (2011). Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metabolic Engineering*, 12, 598-609.
- Baird, GS, Zacharias, DA, & Tsien, RY. (2000). Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), 11984–11989.
- Baldi, L, Muller, N, Picasso, S, Jacquet, R, Girard, P, Thanh, HP, . . . Wurm, FM. (2005). Transient Gene Expression in Suspension HEK-293 Cells: Application to Large-Scale Protein Production. *Biotechnology Progress*, 21(1), 148-153.
- Boucher, C, St-Laurent, G, Loignon, M, Jolicoeur, M, Crescenzo, GD, & Durocher, Y. (2008). The bioactivity and receptor affinity of recombinant tagged EGF designed for tissue engineering applications is defined by the nature and position of the tags. *Tissue Engineering Part A*, 14(12), 2069-2077.
- Carinhas, N, Duarte, TM, Barreiro, LC, Carondo, MJT, Alves, PM, & Teixeira, AP. (2013). Metabolic Signatures of GS-CHO Cell Clones Associated With Butyrate Treatment and Culture Phase Transition. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(12), 3244-3257.
- Chong, WPK, Thng, SH, Hiu, AP, Lee, D-Y, Chan, ECY, & Ho, YS. (2012). LC-MS-Based Metabolic Characterization of High Monoclonal Antibody-Producing Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(12), 3103-3111.
- Costa, AR, Rodrigues, ME, Henriques, M, Azereedo, J, & Oliveira, R. (2010). Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74(2), 127-138.
- Cotlet, M, Hofkens, J, Habuchi, S, Dirix, G, Guyse, MV, Michiels, J, . . . Schryver, FCD. (2001). Identification of different emitting species in the red fluorescent protein DsRed by means

- of ensemble and single-molecule spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), 14398–14403.
- Cruz, HJ, Freitas, CM, Alves, PM, Moreira, JL, & Carrondo, MJT. (2000). Effect of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 3-52.
- Dean, J, & Reddy, P. (2013). Metabolic Analysis of Antibody Producing CHO Cells in Fed-Batch Production. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(6).
- Dietmair, S, Hodson, MP, Quek, L-E, Timmins, NE, Gray, P, & Nielsen, LK. (2012). A Multi-Omics Analysis of Recombinant Protein Production in Hek293 Cells. *PLoS ONE*, 7(8).
- Dietmair, S, Nielsen, LK, & Timmins, NE. (2011). Engineering a mammalian super producer. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86(7), 905-914.
- Duan, YX, Chen, T, Chen, X, & Zhao, XM. (2010). Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase enhances riboflavin production in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1907-1914.
- Durocher, Y, Pham, PL, St-Laurent, G, Jacob, D, Cass, B, Chahal, P, . . . Kamen, A. (2007). Scalable serum-free production of recombinant adeno-associated virus type 2 by transfection of 293 suspension cells. *Journal of Virological Methods*, 144(1-2), 32-40.
- Elias, CB, Carpentier, E, Durocher, Y, Bisson, L, Wagner, R, & Kamen, A. (2003). Improving glucose and glutamine metabolism of human HEK 293 and *Trichoplusia ni* insect cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme. *Biotechnology Progress*, 19(1), 90-97.
- Fang, H, Xie, X, Xu, Q, Zhang, C, & Chen, N. (2013). Enhancement of cytidine production by coexpression of gnd, zwf, and prs genes in recombinant *Escherichia coli* CYT15. *Biotechnology Letters*, 35, 245-251.
- Flores, S, Anda-Herrera, Rd, Gosset, G, & Bolívar, FG. (2004). Growth-rate recovery of *Escherichia coli* cultures carrying a multicopy plasmid, by engineering of the pentose-phosphate pathway. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(4), 485-494.
- Ghorbaniaghdam, A, Chen, J, Henry, O, & Jolicoeur, M. (2014a). Analyzing Clonal Variation of Monoclonal Antibody-Producing CHO Cell Lines Using an In Silico Metabolomic Platform. *PLoS ONE*, 9(3).
- Ghorbaniaghdam, A, Henry, O, & Jolicoeur, M. (2014b). An in-silico study of the regulation of CHO cells glycolysis. *Journal of Theoretical Biology*, 357, 112-122.
- Gupte, RS, Ata, H, Rawat, D, Abe, M, Taylor, MS, Ochi, R, & Gupte, SA. (2011). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Is a Regulator of Vascular Smooth Muscle Contraction. *Antioxydants & Redox Signaling*, 14(4), 543-558.
- Hardie, DG. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream. *Journal of Cell Science*, 117(23), 5479-5487.
- Henry, O, & Durocher, Y. (2011). Enhanced glycoprotein production in HEK-293 cells expressing pyruvate carboxylase. *Metabolic Engineering*, 13, 499-507.

- Irani, N, Wirth, M, Heuvel, Jvd, & Wagner, R. (1999). Improvement of the Primary Metabolism of Cell Cultures by Introducing a New Cytoplasmic Pyruvate Carboxylase Reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 66(4), 238-246.
- Kamen, A, & Henry, O. (2004). Development and optimization of an adenovirus production process. *The Journal of Gene Medicine*, 6(S1), S184-S192.
- Klein, T, Niklas, J, & Heinze, E. (2015). Engineering the supply chain for protein production/secretion in yeasts and mammalian cells. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(3), 453-464.
- Kwon, D-H, Kim, M-D, Lee, T-H, Oh, Y-J, Ryu, Y-W, & Seo, J-H. (2006). Elevation of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity increases xylitol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43(1-4), 86-89.
- Lane, AN, & Fan, TW-M. (2015). Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Research*, 43(4), 2466-2485.
- Loignon, M, Perret, S, Kelly, J, Boulais, D, Cass, B, Bisson, L, . . . Durocher, Y. (2008). Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFNalpha2b in HEK293 cells. *BMC Biotechnology*, 8(65).
- Luo, J, Vijayasankaran, N, Autsen, J, Santuray, R, Hudson, T, Amanullah, A, & Li, F. (2012). Comparative metabolite analysis to understand lactate metabolism shift in Chinese hamster ovary cell culture process. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(1), 146-156.
- Nicolas, C, Kiefer, P, Letisse, F, Krömer, J, Massou, S, Soucaille, P, . . . Portais, J-C. (2007). Response of the central metabolism of *Escherichia coli* to modified expression of the gene encoding the glucose-6-phosphate dehydrogenase. *FEBS Letters*, 581(20), 3771–3776.
- Pandolfi, PP, Sonati, F, Rivi, R, Mason, P, Grosveld, F, & Luzzatto, L. (1995). Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *The EMBO Journal*, 14(21), 5209-5215.
- Pollack, N, Niere, M, & Ziegler, M. (2007). NAD Kinase Levels Control the NADPH Concentration in Human Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 33562-33571.
- Sacchetti, A, Subramaniam, V, Jovin, TM, & Alberti, S. (2002). Oligomerization of DsRed is required for the generation of a functional red fluorescent chromophore. *FEBS Letters*, 525(1-3), 13-19.
- Sellick, CA, Croxford, AS, Maqsood, AR, Stephens, G, Westerhoff, HV, Goodacre, R, & Dickson, AJ. (2011). Metabolite profiling of Recombinant CHO Cells: Designing Tailored Feeding Regimes That Enhance Recombinant Antibody Production. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(12), 3025-3031.
- Sengupta, N, Rose, ST, & Morgan, JA. (2011). Metabolic Flux Analysis of CHO Cell Metabolism in the Late Non-Growth Phase. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(1).
- Seth, G, Hossler, P, Yee, JC, & Hu, WS. (2006). Engineering cells for cell culture bioprocessing -physiological fundamentals. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 101, 119-164.
- Shi, F, Li, K, Huan, X, & Wang, X. (2013). Expression of NAD(H) Kinase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Improve NADPH Supply and L-isoleucine Biosynthesis in

- Corynebacterium glutamicum ssp. lactofermentum. Applied Microbiology and Biotechnology, 171, 504-521.
- Stanton, RC. (2012). Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. IUBMB Life, 64(5), 363-369.
- Templeton, N, Dean, J, Reddy, P, & Young, JD. (2013). Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture. Biotechnol Bioeng, 110(7), 2013-2024. doi: 10.1002/bit.24858 [doi]
- Templeton, N, Dean, J, Reddy, P, & Young, JD. (2013). Peak Antibody Production is Associated With Increased Oxidative Metabolism in an Industrially Relevant Fed-Batch CHO Cell Culture. Biotechnology and Bioengineering, 110(7).
- Tian, W-N, Braunstein, LD, Pang, J, Stuhlmeier, KM, Xi, Q-C, Tian, X, & Stanton, RC. (1998). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. The Journal of Biological Chemistry, 273(17), 10609-10617.
- Tian, WN, Braunstein, LD, Apse, K, Pang, J, Rose, M, Tian, X, & Stanton, RC. (1999). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. American Journal of Physiology, 276(5 Pt 1), C1121-1131.
- Tom, R, Bisson, L, & Durocher, Y. (2007). Transient expression in HEK293-EBNA1 cells *Expression Systems: Methods Express*: Scion Publishing Ltd.
- Ursini, MV, Parrella, A, Rosa, G, Salzano, S, & Martini, G. (1997). Enhanced expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. Biochemical Journal, 323, 801-806.
- Vallée, C, Durocher, Y, & Henry, O. (2014). Exploiting the metabolism of PYC expressing HEK293 cells in fed-bach cultures. Journal of Biotechnology, 169, 63-70.
- Wang, XT, & Engel, PC. (2009). An optimised system for refolding of human glucose 6-phosphate dehydrogenase. BMC Biotechnology, 9-19.
- Wilkens, CA, Altamirano, C, & Gerdtzen, ZP. (2011). Comparative metabolic analysis of lactate for CHO cells in glucose and galactose. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 16(4), 714-724.
- Wilkens, CA, & Gerdtzen, ZP. (2015). Comparative Metabolic Analysis of CHO Cell Clones Obtained through Cell Engineering, for IgG Productivity, Growth and Cell Longevity. PLoS ONE, 10(3).
- Ying, W. (2008). NAD+/NADH and NADP+/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. Antioxydants & Redox Signaling, 10(2), 179-206.
- Zhang, Z, Yang, Z, Zhu, B, Ji Hu, Liew, CW, Zhang, Y, . . . Stanton, RC. (2012). Increasing Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Activity Restores Redox Balance in Vascular Endothelial Cells Exposed to High Glucose. PLoS ONE, 7(11).

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

Le présent travail se proposait d'améliorer le métabolisme primaire de cellules de mammifères, en termes de croissance, de production, et d'efficacité métabolique. Pour ce faire, la G6PDH a été surexprimée pour tenter de rediriger les flux vers la voie PPP en mode cuvée. Ce chapitre présente une discussion sur tous les résultats obtenus dans ce mémoire.

Les stratégies de transfection utilisées ont été efficaces pour toutes les lignées cellulaires. Les transfactions ont été effectuées à plus de 95 % de viabilité et n'ont, au vu des contrôles, pas eu d'impact sur la viabilité cellulaire. Il a pu être observé par microscopie en fluorescence, que les HEK293 présentaient un pourcentage de transfection plus élevé que les CHO. Cependant, bien que les mêmes paramètres de transfection en termes de ratios et de concentration finale en ADN aient été appliqués, ces paramètres peuvent ne pas être constants en changeant de lignée cellulaire et de milieu de culture. Le suivi de fluorescence au microscope, bien qu'affecté par plusieurs facteurs (maturation des fluorophores, différences entre les fluorophores), a permis rapidement d'évaluer le pourcentage de transfection. Les limitations de l'utilisation du microscope sont reliées aux molécules auto-fluorescentes elles-mêmes. La molécule DsRed possède une maturation lente, de plus, dans le cadre du plasmide pDsRed-N1 comportant la G6PDH, il a été montré que seules les structures à partir du dimère étaient fluorescentes, et non le monomère (Baird et al., 2000; Cotlet et al., 2001; Sacchetti et al., 2002). Or, il est tout à fait envisageable qu'une molécule active de G6PDH soit fusionnée à un monomère de DsRed. Ceci aurait pu être vérifié en effectuant un western blot en conditions non-dénaturantes avec un anticorps anti-RFP. Le FACS (voir Annexe 5) est plus sensible pour détecter la fluorescence et avec les conditions spécifiées dans notre expérience, 30 % des cellules CHO ont été détectées positives. Il aurait pu être envisagé d'utiliser un FACS sur les cellules HEK293 pour potentiellement amplifier les épiphénomènes reliés à la transfection de la G6PDH, mais cette option a été écartée pour des raisons logistiques. Une des lacunes de ce projet est que le plasmide vide ne correspond pas au plasmide avec la G6PDH sans l'insertion du gène codant pour la G6PDH, ce n'est donc pas un contrôle parfait. Mais les deux plasmides possèdent initialement la même taille (4.7 kb), les mêmes origines de réPLICATION, la même cassette de résistance Kanamycine/Néomycine, le même site de clonage multiple. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ne sont pas exactement les mêmes et le plasmide vide avec le monomère DsRed est

bien sur une version améliorée de l'ancien fluorophore DsRed, notamment en termes de maturation et de solubilité. Ces différences se remarquent simplement dans les culots de cellules ou les images de fluorescence, avec le monomère DsRed qui possède une fluorescence rouge plus intense et l'ancienne molécule plutôt rosée. Comme noté dans les résultats, les cellules transfectées avec le plasmide vide ou le plasmide pDsRed-N1 ont des comportements similaires montrant un léger effet de transfection. Les données en termes de viabilité, de croissance, de métabolites et de production indiquent que les deux plasmides ont entraîné les mêmes comportements. Excepté pour le suivi de fluorescence, le plasmide vide retenu est donc un bon contrôle.

Plusieurs temps de transfection ont été utilisés selon les lignées. D'une part, la transfection des cellules CHO était affectée par l'induction au cumate de ces dernières car nous ne voulions pas faire intervenir les deux phénomènes au même moment. Cette condition aurait toutefois pu être testée. D'autre part, une transfection à 24 h de culture des HEK a montré mener à mauvais impact sur la viabilité cellulaire (voir Annexe 1). L'optimisation de la transfection de ces cellules n'était pas un objectif de ce mémoire, mais plutôt un outil. D'autres paramètres que le ratio PEI/ADN auraient pu être regardés comme la concentration finale en ADN, le temps d'incubation des polyplexes et le temps au moment de la transfection, afin d'obtenir un meilleur pourcentage de transfection. Ces paramètres ont cependant été choisis, pour raison de temps, sur la base d'une revue de littérature et si nous avions voulu les optimiser, ce travail aurait pu faire l'objet d'un article à part entière. Pour contrer les problèmes liés au changement de milieu sur les cellules CHO (voir annexes), il a été envisagé de laisser les cellules CHO-HP dans leur ancien milieu et de faire une substitution de milieu juste quelques heures le temps de la transfection, puis de diluer. Ceci a mené à une importante mortalité cellulaire dans tous les milieux de transfection testés et disponibles au laboratoire. Il se pose également le problème de la comparaison des deux lignées cellulaires HEK293 en termes de transfection. Il a été choisi de les transfecter au même temps dans la culture. Or ces cellules ne présentent absolument pas les mêmes profils de croissance, la lignée F5 ayant une phase exponentielle plus longue. Ainsi, il aurait pu être envisagé de transfecter les cellules D9 un jour plus tôt pour mieux faire coincider les phases de croissance dans lesquelles se trouvent les deux lignées au moment de la transfection.

De nombreuses études ont montré l'importance de la G6PDH, notamment dans des pathologies telles que l'anémie hémolytique, ainsi que son rôle crucial dans la protection contre

le stress oxydatif (Kuo & Tang, 1998; Pandolfi et al., 1995; Préville et al., 1999; Salvemini et al., 1999; W-N Tian et al., 1998; WN Tian et al., 1999; Ursini et al., 1997; Zhang et al., 2012). Les études métaboliques récentes indiquent également un lien entre le pic de production dans les phases tardives de culture et les voies oxydatives. Mais les cultures en mode cuvée réalisées sur différentes lignées cellulaires lors de ce travail (voir Annexes pour les CHO) n'ont pas montré d'effet majeur sur la croissance ni sur la production d'anticorps, bien que la G6PDH ait été surexprimée avec succès. De plus, la combinaison de la déviation des voies régulées de la glycolyse avec l'entrée favorisée dans le TCA dans les cellules HEK293-F5 (PYC) n'a pas montré plus d'efficience. Ceci suppose une robustesse de la voie PPP face aux perturbations environnementales, tel que confirmé par la constance du niveau d'activité de la deuxième enzyme de la voie, la 6PGDH. Bien sûr, aucune étude de flux n'a été réalisée dans le présent travail et il est donc difficile d'affirmer que le flux vers la PPP a effectivement été augmenté. Le résultat le plus significatif obtenu avec la surexpression de la G6PDH est peut-être l'augmentation des concentrations en GA3P & DHAP, points de retour de la PPP dans la glycolyse, observé chez les cellules D9. Ce changement indique clairement une accumulation qui pourrait être due à une activité augmentée de la voie. Ce phénomène n'a, en revanche, pas pu être observé chez les F5 car les niveaux étaient non-détectables, très certainement en raison de la consommation des intermédiaires de la glycolyse vers le TCA, effet stimulé de la PYC. Une étude sur *E. coli* (Nicolas et al., 2007), indique que même avec une activité de la G6PDH grandement augmentée (15 X), aucune augmentation significative du flux de la réaction catalysée par cette enzyme n'a été observée, suggérant une régulation biochimique ou par les réactions après la G6PDH. Ceci serait concordant avec nos résultats. De plus, la G6PDH est active sous forme de dimères ou tétramères, mais la structure n'a pas été considérée dans ce travail. Elle aurait pu être vérifiée par western blot non-dénaturant. Bien que le test d'activité *in vitro* a démontré une activité augmentée de la G6PDH, il se peut que la fusion de la protéine fluorescente avec l'enzyme, ainsi que l'oligomérisation de la protéine fluorescente elle-même, crée un encombrement rendant l'oligomérisation ou l'accès au site actif des enzymes difficiles. Aussi, le western blot (Figure 4-1 B) 48 h après transfection montre des bandes équivalentes de G6PDH-DsRed dans les deux lignées, alors que l'activité mesurée est plus basse chez les D9. Une étude de la structure de la G6PDH aurait peut-être pu conduire à des différences d'oligomérisation dans les deux lignées, ou ce résultat peut s'expliquer par la phase de croissance plus tardive dans laquelle se trouvent les

D9, qui auraient pu désactiver l'enzyme, notamment par des phénomènes de phosphorylation. La mesure d'activité de la G6PDH 24 h après la transfection aurait peut-être permis de conclure, en montrant une décroissante de l'activité chez les D9.

De manière très intéressante, la concentration en NADPH n'a pas semblé être affectée dans notre étude, ni le ratio NADPH/NADP⁺. La G6PDH est une des principales enzymes régénératrices de NADPH et il était donc supposé que l'augmentation de son activité augmenterait la disponibilité du NADPH. Il est possible que le NADPH ait été consommé directement après production mais cette hypothèse est peu probable car aucun effet n'a été noté sur la croissance, la longévité de la culture et sur la production de protéines. D'ailleurs, d'autres études de surexpression de la G6PDH ont rapporté des résultats variés à ce sujet, soit la concentration de NADPH intracellulaire était augmentée (Kuo & Tang, 1998), soit aucun changement significatif n'était observé (Kwon et al., 2006). Il est donc plus probable dans notre étude que la concentration globale n'ait pas été affectée, indiquant que s'il y a eu surproduction via la G6PDH, des mécanismes de régulation et de compensation sont intervenus au niveau des autres enzymes productrices. Le NADP⁺ peut être généré à partir du NAD⁺ par les NAD kinases, et il a été montré par (Pollack et al., 2007) que ceci augmentait la concentration du NADPH dans les cellules HEK293. Le NADPH peut être formé via différentes enzymes - dont la G6PDH, la 6PGDH, l'isocitrate déshydrogénase et l'enzyme malique - à partir de NADP⁺ ou à partir de NADH et de NADP⁺ via la transhydrogénase mitochondriale. Mais si la NAD kinase avait été impliquée dans la régulation du NADPH total, cela ce serait certainement répercuté sur les concentrations de NAD⁺. Ce fait est approuvé par la compensation de la production de NADPH par l'enzyme malique dans l'étude de (Henry & Durocher, 2011). De plus, la contribution de toutes les voies de formation du NADPH peut être variable dans différentes lignées ou différentes conditions (Ying, 2008). Il est aussi possible que l'activité initiale de la G6PDH soit suffisante et que la voie fonctionne déjà à capacité maximale. Pour vérifier ces hypothèses, il aurait été intéressant de mesurer l'activité des enzymes impliquées dans la formation du NADPH, et/ou plus encore, de quantifier les ARNm. Dans leur étude, (Pollack et al., 2007) ont montré que les déshydrogénases étaient peut-être préférées pour lutter contre le stress oxydatif que la NAD kinase. Une surexpression de la NAD kinase n'a pas affecté les niveaux d'ARNm de ces déshydrogénases, indiquant que leur activité de base est suffisante pour réduire un surplus de NADP⁺ provenant de la surexpression de la NAD kinase. De plus, le silençage de la NAD kinase

n'a pas entraîné d'augmentation majeure de ses niveaux d'ARNm, ce qui est tout à fait consistant avec la robustesse des résultats de notre étude. Dans leur étude, (Pandolfi et al., 1995) ont montré que les deux autres déshydrogénases ne comblaient pas suffisamment la manque de production de NADPH par la G6PDH. Enfin, il existe deux compartiments principaux contenant du NAD ou du NADP : le cytosol et la mitochondrie (Ying, 2008). Il est donc très difficile, car notre étude ne tient pas compte de cette compartmentalisation, d'analyser les différentes contributions dans les concentrations obtenues.

En revanche, l'étude métabolique comparative s'est avérée très intéressante dans la discrimination des deux lignées cellulaires HEK293. Comme publié précédemment sur plusieurs lignées cellulaires et dans divers milieux de culture, les cellules exprimant la pyruvate carboxylase présentent certains avantages : production réduite de métabolites néfastes comme l'ion ammonium et le lactate, consommation réduite de glucose et de glutamine, densité cellulaire maximale ou production spécifique augmentée (Elias et al., 2003; Fogolin et al., 2004; Henry & Durocher, 2011; Irani et al., 1999; Kim & Lee, 2007; Vallée et al., 2014). Les effets observés dus à la PYC sont souvent dépendants de la lignée cellulaire et des conditions de culture. Dans notre étude, la lignée F5 présentait des profils caractéristiques pour tous les intermédiaires du TCA, de la glycolyse, et les concentrations extracellulaires en acides aminés et en ions ammonium. Ces résultats sont constants avec la direction des métabolites vers le TCA. En l'absence d'analyse de flux, il est cependant impossible de déduire quels flux ont été augmentés et si certains métabolites sont plus consommés ou moins produits. (Henry & Durocher, 2011) avaient cependant déjà montré dans une étude précédente un flux augmenté du pyruvate vers l'oxaloacétate. Cette augmentation de flux est consistante avec le niveau plus faible de pyruvate dans les cellules PYC et la consommation du lactate en pyruvate. De manière intéressante, les niveaux énergétiques et redox des cellules PYC étaient plus bas que ceux de la lignée parentale. Or, l'activité augmentée du TCA aurait dû augmenter les niveaux d'ATP intracellulaires dû à une meilleure efficacité de la mitochondrie. Mais ce résultat coïncide avec les résultats de consommation d'oxygène similaires pour les deux lignées HEK293 dans l'étude de (Vallée et al., 2014). Il avait été alors supposé que le TCA est sollicité de la même manière dans les deux lignées. Il est clair, au vu des profils métaboliques, que ce n'est cependant pas le cas. Une mesure de la conversion du glucose en CO₂ viendrait compléter ces études car dans (Irani et al., 1999) une plus grande conversion vers le CO₂ et des quantités d'ATP augmentées indiquaient le

métabolisme modifié de la PYC. Il est fort probable que les quantités supplémentaires d'ATP produites par les cellules F5 soient directement consommées pour les phénomènes liés à la croissance cellulaire, et donc ne se répercutent pas dans les concentrations mesurées. Il serait intéressant, comme le phénotype particulier des cellules F5 a pu être exploité en mode cuvée alimentée, d'analyser ces mêmes niveaux intracellulaires.

Le métabolisme particulier des cellules F5 ne s'est traduit qu'en une augmentation de la densité maximale, et en une diminution de la production spécifique. Ceci est en accord avec la diminution de la production d'ions ammonium, dont l'accumulation inhibe la croissance (Cruz et al., 2000a). Or, la plupart des études sur le lactate indiquent que les hauts producteurs produisent moins de lactate (Dean & Reddy, 2013; S. Dietmair et al., 2012; Ghorbaniaghdam et al., 2014a). Cette diminution dans la productivité spécifique peut s'expliquer par des états énergétiques et redox plus bas. Il a en effet été montré que les hauts producteurs possédaient des niveaux intracellulaires plus élevés de ces molécules (Chong et al., 2012). L'augmentation de la croissance cellulaire semble donc s'être faite au détriment de la productivité. Il serait intéressant de réussir à découpler la phase de croissance de la phase de production, notamment en opérant un changement vers l'hypothermie (Fogolin et al., 2004). De plus, si le phénotype des cellules PYC a pu être exploité pour améliorer la production via une stratégie de cuvée alimentée, il serait intéressant de reconduire cette comparaison dans ces conditions.

Enfin, revenons sur les prévisions du modèle concernant la production. La vitesse de synthèse est calculée comme suit dans le modèle cinétique:

$$\begin{aligned}
 v(mAb) &= v_{maxmAb} * \frac{R5P}{K_{mR5P} + R5P} * \frac{G6P}{K_{mG6P} + G6P} * \frac{GLN}{K_{mGLNmab} + GLN} * \frac{ALA}{K_{mALA} + ALA} * \frac{ARG}{K_{mARG} + ARG} \\
 &\quad * \frac{ASX}{K_{mASX} + ASX} * \frac{ASP}{K_{mASP} + ASP} * \frac{HIS}{K_{mHIS} + HIS} * \frac{ILE}{K_{mILE} + ILE} * \frac{LEU}{K_{mLEU} + LEU} * \frac{LYS}{K_{mLYS} + LYS} \\
 &\quad * \frac{SER}{K_{mSER} + SER} * \frac{TYR}{K_{mTYR} + TYR} * \frac{VAL}{K_{mVAL} + VAL} * \frac{GLY}{K_{mGLY} + GLY} * \frac{ATP}{ADP} \\
 &\quad * \frac{ATP}{K_{mATP} + ATP} * \frac{ADP}{K_{mADP} + ADP}
 \end{aligned} \tag{4}$$

Chacun des termes est croissant en fonction de la concentration du métabolite, c'est-à-dire que la production est corrélée avec l'abondance des précurseurs (R5P, G6P, acides aminés, ratio ATP/ADP). Or, la surexpression de la G6PDH dans le modèle entraîne une élévation du niveau de R5P et une diminution du niveau de G6P, mais en moindre mesure pour la G6P. Il est donc logique que le modèle ait prévu une augmentation de la production compte-tenu de la formulation

ci-dessus. Notons que nous n'avons pas pu détecter dans nos analyses les niveaux de R5P qui auraient pu nous permettre de conclure sur l'augmentation ou non des précurseurs de la voie PPP. Nous n'avons également pas observé de diminution des niveaux de G6P suite à la transfection avec la G6PDH, mais cette diminution est vraiment mineure dans les simulations du modèle. Pour conclure sur le modèle, il est important de noter que la vitesse de la G6PDH est couplée à celle de la 6PGDH dans ce dernier, et que notre travail n'a visé que la surexpression de la G6PDH. Il serait donc intéressant de surexprimer en même temps les deux enzymes.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Faisant suite aux récentes études métaboliques et aux simulations réalisées avec un modèle métabolique disponible dans notre laboratoire, le présent travail avait pour objectif d'étudier l'effet de la surexpression de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), première enzyme de la voie des pentoses phosphates (PPP), sur la production, la croissance et la viabilité, ainsi que le métabolisme de cellules de mammifères HEK293 et CHO. Il avait été supposé que le métabolisme particulier de la lignée HEK293-F5, exprimant de manière stable la pyruvate carboxylase, pouvait amplifier l'effet de la G6PDH de par ses flux augmentés vers le cycle de Krebs. Les expériences en mode cuvée et les analyses métaboliques par HPLC ont permis de surexprimer la G6PDH dans les différentes lignées étudiées. Cependant, mise à part quelques épiphénomènes, cette surexpression n'a pas permis d'observer des changements notables à long terme lors de la culture des cellules, ni en termes de production, ou de croissance cellulaire, ni en termes de métabolisme. L'étude a donc montré que la voie PPP est extrêmement régulée et robuste face aux changements environnementaux, et notamment le ratio NADPH/NADP⁺ qui est demeuré constant tout au long des cultures, dans cette étude. Les concentrations extra et intra-cellulaires en métabolites, qu'ils interviennent dans la glycolyse, la voie des PPP ou le cycle de Krebs, ont supporté cette conclusion. En outre, les résultats observés sur les deux lignées HEK293 étaient la conséquence directe du métabolisme modifié de la lignée F5. L'étude métabolique s'est avéré être un excellent moyen de discriminer les différents phénotypes et comportements métaboliques des deux lignées. La lignée F5, de par la surexpression de la pyruvate carboxylase, présente une consommation en acides aminés différente et des profils dans tous les intermédiaires du cycle de Krebs et de la glycolyse caractéristiques. De plus, les niveaux énergétiques et redox ont été plus faibles, tout au long des cultures.

En revanche, les concentrations en métabolites ne sont pas représentatives des flux dans les diverses voies métaboliques. Il aurait donc été intéressant de pousser cette étude plus loin par une étude de flux métaboliques. Le marquage du glucose et des mesures de CO₂ aurait déjà pu permettre d'appréhender la répartition du glucose vers la voie PPP et la glycolyse.

De plus, si l'efficacité du métabolisme des HEK293-F5 ne permet pas d'augmenter la production en mode cuvée, il a été montré qu'une stratégie d'alimentation adaptée permettait

d'exploiter ce métabolisme. L'étude métabolique sur un mode cuvée alimentée permettrait de mieux caractériser les cellules productrices. Notamment, certains acides aminés se sont montrés limitants dans le milieu extracellulaire et il est intéressant de prendre en compte ces informations pour le design de la stratégie d'alimentation elle-même. Aussi, étant donné l'utilisation du pyruvate par la lignée PYC dans le TCA, il serait intéressant de tester une alimentation en pyruvate. Il a déjà été démontré dans l'étude de (Genzel et al., 2005) que la substitution de la glutamine par du pyruvate réduisait l'accumulation en ions ammonium, ce qui pourrait encore prolonger la phase de croissance de nos cellules PYC. Enfin, les études qui ont montré le parallèle entre une augmentation des flux vers les voies oxydatives ont été effectuées en mode cuvée-alimentée avec une claire séparation entre les phases de croissance et de production. Une autre possibilité pour séparer distinctement ces deux phases et tirer parti du métabolisme particulier des PYC pourrait résider en un changement de température vers 33°C (Fogolin et al., 2004). La culture en hypothermie ayant déjà montré un impact favorable sur la production de protéines. Mais le gel du métabolisme par l'hypothermie pourrait également minimiser le métabolisme vers le TCA des cellules PYC.

Dans ce travail, nous avons adopté une stratégie de transfection, mais d'autres auraient pu être envisagées. Dans un premier temps, nous avons choisi de transfacter les cellules HEK293 tardivement dans la phase exponentielle (2 millions de cellules/mL). Nous aurions pu les transfacter un jour plus tôt (à 1 millions de cellules/mL). L'optimisation du protocole de transfection de ces cellules avec le PEI n'était pas un objectif final de ce travail, mais certains paramètres de transfection tels que la concentration d'ADN auraient certainement pu être mieux optimisés. Nous avons également choisi dans ce travail de transfacter les deux lignées cellulaires au même temps d'avancement dans la culture. Or, elles n'ont pas les mêmes comportements de croissance, les D9 ayant une phase exponentielle bien plus courte. Il aurait pu être envisagé de transfacter les D9 plus tôt, pour faire coïncider les phases de croissance des deux lignées au moment de la transfection, et ainsi potentiellement augmenter la surexpression de la G6PDH chez les D9. Également, une étude plus longue dans le but d'obtenir des lignées stables surexprimant la G6PDH pourrait être conduite. En effet, les résultats obtenus en transfection transitoire ne peuvent être utilisés pour prévoir les résultats de transfection stable. Il se peut que des clones avec de meilleures caractéristiques soient obtenus, comme lors de la modification PYC où la transfection transitoire avait été moins fructueuse que l'établissement de la lignée stable. Pour

l'établissement d'une lignée stable, l'utilisation de notre plasmide pDsRed-N1 n'est pas recommandée car la G6PDH produite est fusionnée avec la molécule fluorescente, ce qui pose des problèmes d'oligomérisation et de solubilité comme mentionnés dans la discussion.

Il a été démontré dans ce travail que la voie PPP est très régulée et que la surexpression de la G6PDH seule n'a pas eu d'impact sur la culture ni la production. Si nous voulions poursuivre dans le but d'amplifier les flux de la PPP, il pourrait être intéressant d'amplifier non pas une, mais deux ou plusieurs enzymes en chaîne dans cette voie. Nous avons également montré que l'activité de la 6PGDH, deuxième enzyme de la voie, n'avait pas été affectée par la surexpression de la G6PDH. Pourquoi ne pas alors surexprimer les deux enzymes? (Fang et al., 2013) ont déjà noté sur *E. coli* que la surexpression de la G6PDH seule n'avait que très peu d'effet comparé à la surexpression de trois enzymes clés de la PPP. De plus, la G6PDH et la 6PGDH sont regroupées sous la même vitesse dans le modèle utilisé pour les simulations préalables. Une autre possibilité pourrait être le silençage de la phosphohexoisomérase, qui catalyse la transformation du glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate, et ainsi bloquer le chemin direct vers la glycolyse. Le retour d'une partie des flux de la voie PPP vers la glycolyse assurerait un fonctionnement normal des cellules. Cependant, il est possible que l'effet PYC observé soit amoindri par cette modification. Une des limites de ce travail est que la compartmentalisation et les différentes voies de production du NADPH n'ont pas été prises en compte : il aurait été intéressant de mesurer l'activité de l'enzyme malique par exemple et de mieux pouvoir appréhender les régulations et les compensations. Des mesures compartimentées des métabolites sont possibles à l'aide de kits commerciaux, mais nécessitent beaucoup d'optimisation car elles sont très couteuses en cellules, et la contamination de la fraction cytosolique dans la fraction mitochondriale est importante. Augmenter la production de NADPH à partir de NAD⁺ grâce aux NAD kinases peut être une piste pour augmenter la quantité globale de NADPH, qui apparaît être insuffisante et régulée dans les deux lignées HEK. Dans cette étude, nous n'avons pas regardé l'impact de la surexpression de la G6PDH sur la glycosylation mais toute stratégie visant à augmenter la production des précurseurs du PPP pourrait avoir un impact sur le processus de glycosylation même si le titre maximal n'est pas augmenté. Cependant, notre étude n'a pas montré de différences dans les concentrations de ces précurseurs, donc il est peu probable qu'il y ait eu un impact.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahn, WS, & Antoniewicz, MR. (2011). Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metabolic Engineering*, 12, 598-609.
- Ahn, WS, & Antoniewicz, MR. (2012). Towards dynamic metabolic flux analysis in CHO cell cultures. *Biotechnology Journal*, 7(1), 61-74.
- Ahn, WS, & Antoniewicz, MR. (2013). Parallel labeling experiments with [1,2-13C]glucose and [^1U -13C]glutamine provide new insights into CHO cell metabolism. *Metabolic Engineering*, 15, 34-47.
- Alberts, B, Bray, D, Hopkin, K, Johnson, A, Lewis, J, Raff, M, & al. (2004). *Essential Cell Biology*: Garland Science.
- Altamirano, C, Paredes, C, Cairó, JJ, & Godia, F. (2000). Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnology Progress*, 16(1), 69-75.
- Altamirano, C, Paredes, C, Illanes, A, Cairó, JJ, & Godia, F. (2004). Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. *Journal of Biotechnology*, 110(2), 171-179.
- Andersen, DC, & Krummen, L. (2002). Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(2), 117-123.
- Aoyama, T, & Chua, N-H. (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *The Plant Journal*, 11(3), 605-612.
- Arden, N, & Betenbaugh, MJ. (2004). Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. *TRENDS in Biotechnology*, 22(4), 174-180.
- Backliwal, G, Hildinger, M, Hasija, V, & Wurm, FM. (2008). High-density transfection with HEK-293 cells allows doubling of transient titers and removes need for a priori DNA complex formation with PEI. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(3), 721-727.
- Bailey, JE, & Ollis, DF. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*.
- Baird, GS, Zacharias, DA, & Tsien, RY. (2000). Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), 11984–11989.
- Baldi, L, Muller, N, Picasso, S, Jacquet, R, Girard, P, Thanh, HP, . . . Wurm, FM. (2005). Transient Gene Expression in Suspension HEK-293 Cells: Application to Large-Scale Protein Production. *Biotechnology Progress*, 21(1), 148-153.
- Beck, A, Wagner-Rousset, E, Bussat, M-C, Lokteff, M, Klinguer-Hamour, C, Haeuw, J-F, . . . Corvaia, N. (2008). Trends in Glycosylation, Glycoanalysis and Glycoengineering of Therapeutic Antibodies and Fc-Fusion Proteins. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9, 482-501.

- Berenson, A. (2006). A cancer drug shows promise, at a price that many can't pay. N Y Times Web.
- Berrios, J, Altamirano, C, Osses, N, & Gonzalez, R. (2011). Continuous CHO cell cultures with improved recombinant protein productivity by using mannose as carbon source: Metabolic analysis and scale-up simulation. *Chemical Engineering Science*, 66(11), 2431-2439.
- Bertschinger, M, Schertenleib, A, Cevey, J, Hacker, DL, & Wurm, FM. (2008). The kinetics of polyethylenimine-mediated transfection in suspension cultures of Chinese hamster ovary cells. *Molecular Biotechnology*, 40(2), 136-143.
- Birch, JR, & Racher, AJ. (2006). Antibody production. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(5-6), 671-685.
- Boucher, C, St-Laurent, G, Loignon, M, Jolicoeur, M, Crescenzo, GD, & Durocher, Y. (2008). The bioactivity and receptor affinity of recombinant tagged EGF designed for tissue engineering applications is defined by the nature and position of the tags. *Tissue Engineering Part A*, 14(12), 2069-2077.
- Boussif, O, Lezoualc'h, F, Zanta, MA, Mergny, MD, Scherman, D, Demeneix, B, & Behr, JP. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), 7297-7301.
- Brown, IR, & Rush, SJ. (1990). Expression of heat shock genes (hsp70) in the mammalian brain: Distinguishing constitutively expressed and hyperthermia-inducible mRNA species. *Journal of Neuroscience Research*, 25(1), 14-19.
- Butler, M. (2004). *Animal Cell Culture & Technology*.
- Butler, M. (2005). Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(3), 283-291.
- Butler, M, & Meneses-Acosta, A. (2012). Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(4), 885-894.
- Cacciatore, JJ, Chasin, LA, & Leonard, EF. (2010). Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system. *Biotechnology Advances*, 28(6), 673-681.
- Calvo, JC, Valle, LBdS, Barañao, JL, Tesone, M, & Charreau, EH. (1979). NADPH generating enzymes in Leydig cells from diabetic rats. *Hormone and Metabolic Research*, 11(2), 161-164.
- Carinhas, N, Duarte, TM, Barreiro, LC, Carrondo, MJT, Alves, PM, & Teixeira, AP. (2013). Metabolic Signatures of GS-CHO Cell Clones Associated With Butyrate Treatment and Culture Phase Transition. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(12), 3244-3257.
- Caron, AW, Nicolas, C, Gaillet, B, Ba, I, Pinard, M, Garnier, A, . . . Gilbert, R. (2009). Fluorescent labeling in semi-solid medium for selection of mammalian cells secreting high-levels of recombinant proteins. *BMC Biotechnology*, 9(42).

- Carpentier, E, Paris, S, Kamen, A, & Durocher, Y. (2007). Limiting factors governing protein expression following polyethylenimine-mediated gene transfer in HEK293-EBNA1 cells. *Journal of Biotechnology*, 128(2), 268-280.
- Chen, K, Liu, Q, Xie, L, Sharp, PA, & Wang, DIC. (2001). Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(1), 55-61.
- Chiang, GG, & Sisk, WP. (2005). Bcl-xL mediates increased production of humanized monoclonal antibodies in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 91(7), 779-792.
- Choi, SS, Rhee, WJ, Kim, EJ, & Park, TH. (2006). Enhancement of recombinant protein production in Chinese hamster ovary cells through anti-apoptosis engineering using 30Kc6 gene. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(3), 459-467.
- Chong, WPK, Thng, SH, Hiu, AP, Lee, D-Y, Chan, ECY, & Ho, YS. (2012). LC-MS-Based Metabolic Characterization of High Monoclonal Antibody-Producing Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(12), 3103-3111.
- Chotigeat, W, Watanapokasin, Y, Mahler, S, & Gray, RE. (1994). Role of environmental conditions on the expression levels, glycoform pattern and levels of sialyltransferase for hFSH produced by recombinant CHO cells. *Cytotechnology*, 15, 217-221.
- Chun, B-H, Park, S-Y, Chung, N, & Bang, W-G. (2003). Enhanced production of recombinant B-domain deleted factor VIII from Chinese hamster ovary cells by propionic and butyric acids. *Biotechnology Letters*, 25(4), 315-319.
- Chusainow, J, Yang, YS, Yeo, JHM, Toh, PC, Asvadi, P, Wong, NSC, & Yap, MGS. (2009). A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: What makes a stable high producer? *Biotechnology and Bioengineering*, 102(4), 1182-1196.
- Clincke, M-F, Mölleryd, C, Samani, PK, Lindskog, E, Fäldt, E, Walsh, K, & Chotteau, V. (2013). Very high density of Chinese hamster ovary cells in perfusion by alternating tangential flow or tangential flow filtration in WAVE bioreactor™—part II: Applications for antibody production and cryopreservation. *Biotechnology Progress*, 29(3), 768-777.
- Cost, GJ, Freyvert, Y, Vafiadis, A, Santiago, Y, Miller, JC, Rebar, E, . . . Gregory, PD. (2010). BAK and BAX deletion using zinc-finger nucleases yields apoptosis-resistant CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 105(2), 330-340.
- Costa, AR, Rodrigues, ME, Henriques, M, Azeredo, J, & Oliveira, R. (2010). Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74(2), 127-138.
- Cotlet, M, Hofkens, J, Habuchi, S, Dirix, G, Guyse, MV, Michiels, J, . . . Schryver, FCD. (2001). Identification of different emitting species in the red fluorescent protein DsRed by means of ensemble and single-molecule spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), 14398–14403.
- Cruz, HJ, Freitas, CM, Alves, PM, Moreira, JL, & Carrondo, MJT. (2000a). Effect of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 3-52.

- Cruz, HJ, Moreira, JL, & Carrondo, MJT. (2000b). Metabolically optimised BHK cell fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology*, 80(2), 109-118.
- Dean, J, & Reddy, P. (2013). Metabolic Analysis of Antibody Producing CHO Cells in Fed-Batch Production. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(6).
- DeMaria, CT, Cairns, V, Schwarz, C, Zhang, J, Guerin, M, Zuena, E, . . . Karey, KP. (2007). Accelerated clone selection for recombinant CHO CELLS using a FACS-based high-throughput screen. *Biotechnology Progress*, 23(2), 465-472.
- Department of Biology Davidson College, D, NC 28036. Retrieved 28/05/2015, from <http://www.bio.davidson.edu/genomics/method/FACS.html>
- Derouazi, M, Girard, P, Tilborgh, FV, Iglesias, K, Muller, N, Bertschinger, M, & Wurm, FM. (2004). Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(4), 537-545.
- Dietmair, S, Hodson, MP, Quek, L-E, Timmins, NE, Gray, P, & Nielsen, LK. (2012). A Multi-Omics Analysis of Recombinant Protein Production in Hek293 Cells. *PLoS ONE*, 7(8).
- Dietmair, S, Nielsen, LK, & Timmins, NE. (2011). Engineering a mammalian super producer. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86(7), 905-914.
- Dinnis, DM, & James, DC. (2005). Engineering mammalian cell factories for improved recombinant monoclonal antibody production: lessons from nature? *Biotechnology and Bioengineering*, 91(2), 180-189.
- Drogoz, A, David, L, Rochas, C, Domard, A, & Delair, T. (2007). Polyelectrolyte complexes from polysaccharides: formation and stoichiometry monitoring. *Langmuir*, 23, 10950-10958.
- Duan, YX, Chen, T, Chen, X, & Zhao, XM. (2010). Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase enhances riboflavin production in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1907-1914.
- Durocher, Y, Pham, PL, St-Laurent, G, Jacob, D, Cass, B, Chahal, P, . . . Kamen, A. (2007). Scalable serum-free production of recombinant adeno-associated virus type 2 by transfection of 293 suspension cells. *Journal of Virological Methods*, 144(1-2), 32-40.
- Elias, CB, Carpentier, E, Durocher, Y, Bisson, L, Wagner, R, & Kamen, A. (2003). Improving glucose and glutamine metabolism of human HEK 293 and *Trichoplusia ni* insect cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme. *Biotechnology Progress*, 19(1), 90-97.
- Fang, H, Xie, X, Xu, Q, Zhang, C, & Chen, N. (2013). Enhancement of cytidine production by coexpression of gnd, zwf, and prs genes in recombinant *Escherichia coli* CYT15. *Biotechnology Letters*, 35, 245-251.
- Ferrari, J, Gunson, J, Lofgren, J, Krummen, L, & Warner, TG. (1998). Chinese hamster ovary cells with constitutively expressed sialidase antisense RNA produce recombinant dnase in batch culture with increased sialic acid. *Biotechnology and Bioengineering*, 60(5), 589-595.

- Figueroa, BJ, Chen, S, Oyler, GA, Hardwick, JM, & Betenbaugh, MJ. (2004). Aven and Bcl-xL enhance protection against apoptosis for mammalian cells exposed to various culture conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(6), 589-600.
- Flores, S, Anda-Herrera, Rd, Gosset, G, & Bolívar, FG. (2004). Growth-rate recovery of *Escherichia coli* cultures carrying a multicopy plasmid, by engineering of the pentose-phosphate pathway. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(4), 485-494.
- Fogolin, MB, Wagner, R, Etcheverrigaray, M, & Kratje, R. (2004). Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *Journal of Biotechnology*, 109, 179-191.
- Fox, SR, Patel, UA, Yap, MGS, & Wang, DIC. (2004). Maximizing interferon- γ production by chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: Experimental and modeling. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(2), 177-184.
- Fussenegger, M, Morris, RP, Fux, C, Rimann, M, von Stockar, B, Thompson, CJ, & Bailey, JE. (2000). Streptogramin-based gene regulation systems for mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 18(11), 1203-1208.
- Gaillet, B, Gilbert, R, Amziani, R, Guilbault, C, Gadoury, C, Caron, AW, . . . Massie, B. (2007). High-level recombinant protein production in CHO cells using an adenoviral vector and the cumate gene-switch. *Biotechnology Progress*, 23(1), 200-209.
- Gaillet, B, Gilbert, R, Broussau, S, Pilote, A, Malenfant, F, Mullick, A, . . . Massie, B. (2010). High-level recombinant protein production in CHO cells using lentiviral vectors and the cumate gene-switch. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(2), 203-215.
- Gawlitzeck, M, Vijayasankaran, N, Pacis, E, Li, F, Li, J, & Amanullah, A. (2010). Systematic Approaches to Develop Chemically Defined Cell Culture Feed Media. *BioPharm International*, 23(11).
- Genzel, Y, Ritter, JB, Kdnig, S, Alt, R, & Reichl, U. (2005). Substitution of Glutamine by Pyruvate To Reduce Ammonia Formation and Growth Inhibition of Mammalian Cells. *Biotechnology Progress*, 21, 58-69.
- Ghorbaniaghdam, A, Chen, J, Henry, O, & Jolicoeur, M. (2014a). Analyzing Clonal Variation of Monoclonal Antibody-Producing CHO Cell Lines Using an In Silico Metabolomic Platform. *PLoS ONE*, 9(3).
- Ghorbaniaghdam, A, Henry, O, & Jolicoeur, M. (2013). A kinetic-metabolic model based on cell energetic state: study of CHO cell behavior under Na-butyrate stimulation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(4), 469-487.
- Ghorbaniaghdam, A, Henry, O, & Jolicoeur, M. (2014b). An in-silico study of the regulation of CHO cells glycolysis. *Journal of Theoretical Biology*, 357, 112-122.
- Godbey, WT, Wu, KK, & Mikos, AG. (1999). Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 60(2-3), 149-160.
- Godbey, WT, Wu, KK, & Mikos, AG. (1999a). Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *Journal of Biomedical Materials Research*, 45(3), 268-275.

- Godbey, WT, Wu, KK, & Mikos, AG. (1999b). Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(9), 5177-5181.
- Gossen, M, & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(12), 5547-5551.
- Goudar, C, Biener, R, Boisart, C, Heidemann, R, Piret, J, Graaf, Ad, & Konstantinov, K. (2010). Metabolic flux analysis of CHO cells in perfusion culture by metabolite balancing and 2D [13C, 1H] COSY NMR spectroscopy. *Metabolic Engineering*, 12(2), 138-149.
- Grabenhorst, E, Schlenke, P, Pohl, S, Nimtz, M, & Conradt, HS. (1999). Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. *Glycoconjugate Journal*, 16(2), 81-97.
- Graham, FL, & Eb, AJvd. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 52(2), 456-467.
- Graham, FL, Smiley, J, Russel, WC, & Nairn, R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal of General Virology*, 36(1), 59-72.
- Grillari, J, Fortschegger, K, Grabherr, RM, Hohenwarter, O, Kunert, R, & Katinger, H. (2001). Analysis of alterations in gene expression after amplification of recombinant genes in CHO cells. *Journal of Biotechnology*, 87, 59-65.
- Gupte, RS, Ata, H, Rawat, D, Abe, M, Taylor, MS, Ochi, R, & Gupte, SA. (2011). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Is a Regulator of Vascular Smooth Muscle Contraction. *Antioxydants & Redox Signaling*, 14(4), 543-558.
- Han, X, Sunc, L, Fang, Q, Li, D, Gong, X, Wu, Y, . . . Shen, BQ. (2007). Transient expression of osteopontin in HEK 293 cells in serum-free culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(1-2), 133-140.
- Hardie, DG. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream. *Journal of Cell Science*, 117(23), 5479-5487.
- Harris, MH, & Thompson, CB. (2000). The role of the bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death & Differentiation*, 7(12), 1182-1191.
- Henry, O, & Durocher, Y. (2011). Enhanced glycoprotein production in HEK-293 cells expressing pyruvate carboxylase. *Metabolic Engineering*, 13, 499-507.
- Henry, O, Jolicoeur, M, & Kamen, A. (2011). Unraveling the metabolism of HEK-293 cells using lactate isotopomer analysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34, 263-273.
- Heuchel, R, Radtke, F, Georgiev, O, Stark, G, Aguet, M, & Schaffner, W. (1994). The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *The EMBO Journal*, 13(12), 2870-2875.
- Heyland, J, Blank, LM, & Schmid, A. (2011). Quantification of metabolic limitations during recombinant protein production in Escherichia coli. *Journal of Biotechnology*, 155(2), 178-184.

- Ho, PWL, Ho, JWM, Liu, H-F, So, DHF, Tse, ZHM, Chan, K-H, . . . Ho, S-L. (2012). Mitochondrial neuronal uncoupling proteins: a target for potential disease-modification in Parkinson's disease. *Translational Neurodegeneration*, 1(3).
- Hong, J, Cho, S, & al. (2010). Substitution of glutamine by glutamate enhances production and galactosylation of recombinant IgG in Chinese hamster ovary cells. *Microbiology and Biotechnology*, 88(4), 869-876.
- Hossler, P, Khattak, SF, & Li, ZJ. (2009). Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology*, 19(9), 936-949.
- Irani, N, Wirth, M, Heuvel, Jvd, & Wagner, R. (1999). Improvement of the Primary Metabolism of Cell Cultures by Introducing a New Cytoplasmic Pyruvate Carboxylase Reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 66(4), 238-246.
- Itoh, Y, Ueda, H, & Suzuki, E. (1995). Overexpression of bcl-2, apoptosis suppressing gene: Prolonged viable culture period of hybridoma and enhanced antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 48(2), 118-122.
- Jäger, V, Büssow, K, Wagner, A, Weber, S, Hust, M, Frenzel, A, & Schirrmann, T. (2013). High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnology*, 13.
- Jang, S-G, Lee, B-M, & Cho, J-Y. (2012). Effect of modified glucose catabolism on xanthan production in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39(4), 649-654.
- Jefferis, R. (2005). Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics. *Biotechnology Progress*, 21(1), 11-16.
- Jin, L, Zeng, X, Liu, M, Deng, Y, & He, N. (2014). Current Progress in Gene Delivery Technology Based on Chemical Methods and Nano-carriers. *Theranostics*, 4(3), 240-255.
- Kamen, A, & Henry, O. (2004). Development and optimization of an adenovirus production process. *The Journal of Gene Medicine*, 6(S1), S184-S192.
- Kildegaard, HF, Baycin-Hizal, D, Lewis, NE, & Betenbaugh, MJ. (2013). The emerging CHO systems biology era: harnessing the 'omics revolution for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(6), 1102–1107.
- Kim, JY, Kim, Y-G, & Lee, GM. (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 917-930.
- Kim, SH, & Lee, GM. (2007). Down-regulation of lactate dehydrogenase-A by siRNAs for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 152-159.
- Kim , SH, & Lee, GM. (2007). Functional expression of human pyruvate carboxylase for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells (DG44). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(3), 659-665.
- Kim, TK, & Eberwine, JH. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 3173-3178.

- Klein, T, Niklas, J, & Heinze, E. (2015). Engineering the supply chain for protein production/secretion in yeasts and mammalian cells. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(3), 453-464.
- Kochanowski, N, Blanchard, F, Cacan, R, Chirat, F, Guedon, E, Marc, A, & Goergen, J-L. (2008). Influence of intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents on recombinant interferon- γ glycosylation during batch and fed-batch cultures of CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(4), 721-733.
- Kou, T-C, Fan, L, Zhou, Y, Ye, Z-Y, Liu, X-P, Zhao, L, & Tan, W-S. (2011). Detailed understanding of enhanced specific productivity in Chinese hamster ovary cells at low culture temperature. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(3), 365-369.
- Kuo, W-Y, & Tang, TK. (1998). Effects of G6PD Overexpression in NIH3T3 Cells Treated with Tert-Butyl Hydroperoxide or Paraquat. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(7-8), 1130–1138.
- Kwon, D-H, Kim, M-D, Lee, T-H, Oh, Y-J, Ryu, Y-W, & Seo, J-H. (2006). Elevation of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity increases xylitol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43(1-4), 86-89.
- Lamotte, D, Buckberry, L, Monaco, L, Soria, M, Jenkins, N, Engasser, J-M, & Marc, A. (1999). Na-butyrate increases the production and α 2,6-sialylation of recombinant interferon- γ expressed by α 2,6- sialyltransferase engineered CHO cells. *Cytotechnology*, 29(1), 55-64.
- Lane, AN, & Fan, TW-M. (2015). Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Research*, 43(4), 2466-2485.
- Lee, HW, Christie, A, Starkey, JA, Read, EK, & Yoon1, S. (2015). Intracellular metabolic flux analysis of CHO cells supplemented with wheat hydrolysates for improved mAb production and cell-growth. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(2), 291-302.
- Lee, YY, Wong, KTK, Tan, J, Toh, PC, Mao, Y, Brusic, V, & Yap, MGS. (2009). Overexpression of heat shock proteins (HSPs) in CHO cells for extended culture viability and improved recombinant protein production. *Journal of Biotechnology*, 143(1), 34-43.
- Lee, YY, Yap, MGS, Hu, W-S, & Wong, KTK. (2003). Low-Glutamine Fed-Batch Cultures of 293-HEK Serum-Free Suspension Cells for Adenovirus Production. *Biotechnology Progress*, 19(2), 501-509.
- Li, R. (2014). Transient transfection of CHO cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing rainbow trout recombinant IFN- γ protein. *Cytotechnology*.
- Lin, AA, Kimura, R, & Miller, WM. (1993). Production of tPA in recombinant CHO cells under oxygen-limited conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(3), 339-350.
- Lipscomb, ML, Palomares, LA, Hernández, V, Ramírez, OT, & Kompala, DS. (2005). Effect of Production Method and Gene Amplification on the Glycosylation Pattern of a Secreted Reporter Protein in CHO Cells. *Biotechnology Progress*, 21(1), 40-49.
- Liu, C, Dalby, B, Chen, W, Kilzer, JM, & Chiou, HC. (2008). Transient transfection factors for high-level recombinant protein production in suspension cultured mammalian cells. *Molecular Biotechnology*, 39(2), 141-153.

- Loignon, M, Perret, S, Kelly, J, Boulais, D, Cass, B, Bisson, L, . . . Durocher, Y. (2008). Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFNalpha2b in HEK293 cells. *BMC Biotechnology*, 8(65).
- Lucarelli, G, Rutigliano, M, Galleggiante, V, Ribatti, D, Vavallo, A, Sanguedolce, F, . . . Battaglia, M. (2015). Metabolic profile of glycolysis and pentose phosphate pathway in clear cell-renal cell carcinoma. *Oncotarget*, 6(15), 13371-13386.
- Luo, J, Vijayasankaran, N, Autsen, J, Santuray, R, Hudson, T, Amanullah, A, & Li, F. (2012). Comparative metabolite analysis to understand lactate metabolism shift in Chinese hamster ovary cell culture process. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(1), 146-156.
- Majors, BS, Betenbaugh, MJ, Pederson, NE, & Chiang, GG. (2009). Mcl-1 overexpression leads to higher viabilities and increased production of humanized monoclonal antibody in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Progress*, 25(4), 1161-1168.
- Mancia, F, Patel, SD, Rajala, MW, Scherer, PE, Nemes, A, Schieren, I, . . . Shapiro, L. (2004). Optimization of protein production in mammalian cells with a coexpressed fluorescent marker. *Structure*, 12(8), 1355-1360.
- Mastrangelo, AJ, Hardwick, JM, Zou, S, & Betenbaugh, MJ. (2000). Part II. Overexpression of bcl-2 family members enhances survival of mammalian cells in response to various culture insults. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(5), 555-564.
- McAtee, AG, Templeton, N, & Young, JD. (2014). Role of Chinese hamster ovary central carbon metabolism in controlling the quality of secreted biotherapeutic proteins. *Pharmaceutical Bioprocessing*, 2(1), 63-74.
- Mercille, S, Johnson, M, Lanthier, S, Kamen, AA, & Massie, B. (2000). Understanding factors that limit the productivity of suspension-based perfusion cultures operated at high medium renewal rates. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(4), 435-450.
- Merten, O-W. (2002). Virus contaminations of cell cultures - A biotechnological view. *Cytotechnology*, 39(2), 91-116.
- Mosser, DD, Caron, AW, Bourget, L, Jolicoeur, P, & Massie, B. (1997). Use of a dicistronic expression cassette encoding the green fluorescent protein for the screening and selection of cells expressing inducible gene products. *BioTechniques*, 22(1), 150-161.
- Müller, D, Katinger, H, & Grillari, J. (2008). MicroRNAs as targets for engineering of CHO cell factories. *TRENDS in Biotechnology*, 26(7), 359–365.
- Mullick, A, Xu, Y, Warren, R, Koutroumanis, M, Guilbault, C, Broussau, S, . . . Massie, B. (2006). The cumatate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC Biotechnology*, 6, 43-61.
- Müthing, J, Kemminer, SE, Conradt, HS, Šagi, D, Nimtz, M, Kärst, U, & Peter-Katalinić, J. (2003). Effects of buffering conditions and culture pH on production rates and glycosylation of clinical phase I anti-melanoma mouse IgG3 monoclonal antibody R24. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(3), 321-334.
- Nicolae, A, Wahrheit, J, Bahnemann, J, Zeng, A-P, & Heinze, E. (2014). Non-stationary ¹³C metabolic flux analysis of Chinese hamster ovary cells in batch culture using extracellular labeling highlights metabolic reversibility and compartmentation. *BMC Biotechnology*, 8.

- Nicolas, C, Kiefer, P, Letisse, F, Krömer, J, Massou, S, Soucaille, P, . . . Portais, J-C. (2007). Response of the central metabolism of Escherichia coli to modified expression of the gene encoding the glucose-6-phosphate dehydrogenase. *FEBS Letters*, 581(20), 3771–3776.
- Niklas, J, Priesnitz, C, Rose, T, Sandig, V, & Heinzle, E. (2013). Metabolism and metabolic burden by α 1-antitrypsin production in human AGE1.HN cells. *Metabolic Engineering*, 16, 103-114.
- No, D, Yao, TP, & Evans, R. (1996). Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(8), 3346-3351.
- Oldiges, M, Lütz, S, Pflug, S, Schroer, K, Stein, N, & Wiendahl, C. (2007). Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(3), 495-511.
- Oyadomari, S, & E. Araki, MM. (2002). Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic β -cells. *Apoptosis*, 7(4), 335-345.
- Pandolfi, PP, Sonati, F, Rivi, R, Mason, P, Grosveld, F, & Luzzatto, L. (1995). Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *The EMBO Journal*, 14(21), 5209-5215.
- Park, H-S, Kim, I-H, Kim, I-Y, Kim, K-H, & Kim, H-J. (2000). Expression of carbamoyl phosphate synthetase I and ornithine transcarbamoylase genes in Chinese hamster ovary dhfr-cells decreases accumulation of ammonium ion in culture media. *Journal of Biotechnology*, 81(2-3), 129-140.
- Park, J, Choe, SS, Choi, AH, Kim, KH, Yoon, MJ, Suganami, T, . . . Kim, JB. (2006). Increase in glucose-6-phosphate dehydrogenase in adipocytes stimulates oxidative stress and inflammatory signals. *Diabetes*, 55(11), 2939-2949.
- Pham, N. (2013). *Identification de pistes d'ingénierie cellulaire par simulations du métabolisme de cellules mammifères CHO*. GCH4391- Projet individuel. École Polytechnique de Montréal.
- Pham, PL, Kamen, A, & Durocher, Y. (2006). Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. *Molecular Biotechnology*, 34(2), 225-237.
- Pham, PL, Perret, S, Cass, B, Carpentier, E, St-Laurent, G, Bisson, L, . . . Durocher, Y. (2005). Transient gene expression in HEK293 cells: Peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(3), 332-344.
- Pollack, N, Niere, M, & Ziegler, M. (2007). NAD Kinase Levels Control the NADPH Concentration in Human Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 33562-33571.
- Préville, X, Salvemini, F, Giraud, S, Chaufour, S, Paul, C, Stepien, G, . . . Arrigo, A-P. (1999). Mammalian Small Stress Proteins Protect against Oxidative Stress through Their Ability to Increase Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity and by Maintaining Optimal Cellular Detoxifying Machinery. *Experimental Cell Research*, 247(1), 61–78.
- Quek, L-E, Dietmair, S, Krömer, JO, & Nielsen, LK. (2010). Metabolic flux analysis in mammalian cell culture. *Metabolic Engineering*, 12(2), 161-171.

- Rajendra, Y, Kiseljak, D, Baldi, L, Hacker, DL, & Wurm, FM. (2011). A simple high-yielding process for transient gene expression in CHO cells. *Journal of Biotechnology*, 153(1-2).
- Ralser, M, Wamelink, MM, Kowald, A, Gerisch, B, Heeren, G, Struys, EA, . . . Krobitsch, S. (2007). Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *Journal of Biology*, 6.
- Rasmussen, SK, Næsted, H, Müller, C, Tolstrup, AB, & Frandsen, TP. (2012). Recombinant antibody mixtures: production strategies and cost considerations. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 526(2), 139-145.
- Rath, AG, Rehberg, M, Janke, R, Genzel, Y, Scholz, S, Noll, T, . . . Reichl, U. (2014). The influence of cell growth and enzyme activity changes on intracellular metabolite dynamics in AGE1.HN.AAT cells. *Journal of Biotechnology*, 178, 43-53.
- Robitaille, J. (2015). *Modélisation dynamique de cultures de cellules CHO produisant un anticorps monoclonal en mode cuvée-alimentée*. (Maîtrise Sciences Ès Appliquées), École Polytechnique de Montréal.
- Robitaille, J, Chen, J, & Jolicoeur, M. (In press). A single dynamic metabolic model can describe mAb producing CHO cells batch and fed-batch cultures on different culture media. *PLoS ONE*.
- Rodrigues, ME, Costa, AR, Henriques, M, Azeredo, J, & Oliveira, R. (2010). Technological progresses in monoclonal antibody production systems. *Biotechnology Progress*, 26(2), 332-351.
- Rosenstraus, M, & Chasin, LA. (1975). Isolation of Mammalian Cell Mutants Deficient in Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity: Linkage to Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(2), 493-497.
- Sacchetti, A, Subramaniam, V, Jovin, TM, & Alberti, S. (2002). Oligomerization of DsRed is required for the generation of a functional red fluorescent chromophore. *FEBS Letters*, 525(1-3), 13-19.
- Salvemini, F, Franze, A, Iervolino, A, Filosa, S, Salzano, S, & Ursini, MV. (1999). Enhanced Glutathione Levels and Oxidoresistance Mediated by Increased Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(5), 2750-2757.
- Sang, Y, Xie, K, Mu, Y, Lei, Y, Zhang, B, Xiong, S, . . . Qi, N. (2013). Salt ions and related parameters affect PEI-DNA particle size and transfection efficiency in Chinese hamster ovary cells. *Cytotechnology*.
- Sauer, U. (2006). Metabolic networks in motion: ^{13}C -based flux analysis. *Molecular Systems Biology*, 2(62).
- Sauerwald, TM, Betenbaugh, MJ, & Oyler, GA. (2002). Inhibiting apoptosis in mammalian cell culture using the caspase inhibitor XIAP and deletion mutants. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(6), 704-716.
- Sauerwald, TM, Oyler, GA, & Betenbaugh, MJ. (2003). Study of caspase inhibitors for limiting death in mammalian cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(3), 329-340.

- Sburlati, AR, Umaña, P, Prati, EGP, & Bailey, JE. (1998). Synthesis of Bisected Glycoforms of Recombinant IFN- β by Overexpression of β -1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase III in Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnology Progress*, 14(2), 189-192.
- Schneider, M, Alaoui, ME, Urs von Stockar, & Marison, aW. (1997). Batch cultures of a hybridoma cell line performed with *in situ* ammonia removal. *Enzyme and Microbial Technology*, 20(4), 268-276.
- Sellick, CA, Croxford, AS, Maqsood, AR, Stephens, G, Westerhoff, HV, Goodacre, R, & Dickson, AJ. (2011). Metabolite profiling of Recombinant CHO Cells: Designing Tailored Feeding Regimes That Enhance Recombinant Antibody Production. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(12), 3025-3031.
- Sellick, CA, Knight, D, Croxford, AS, Maqsood, AR, Stephens, GM, Goodacre, R, & Dickson, AJ. (2010). Evaluation of extraction processes for intracellular metabolite profiling of mammalian cells: matching extraction approaches to cell type and metabolite targets. *Metabolomics*, 6(3), 427-438.
- Selvarasu, S, Ho, YS, Chong, WPK, Wong, NSC, Yusufi, FNK, Lee, YY, . . . Lee, D-Y. (2012). Combined *in silico* modeling and metabolomics analysis to characterize fed-batch CHO cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(6), 1415-1429.
- Sengupta, N, Rose, ST, & Morgan, JA. (2011). Metabolic Flux Analysis of CHO Cell Metabolism in the Late Non-Growth Phase. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(1).
- Seth, G, Hossler, P, Yee, JC, & Hu, W-S. (2006). Engineering Cells for Cell Culture Bioprocessing - Physiological Fundamentals. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 101, pp. 119-164).
- Seth, G, Hossler, P, Yee, JC, & Hu, WS. (2006). Engineering cells for cell culture bioprocessing-physiological fundamentals. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 101, 119-164.
- Sheikholeslami, Z, Jolicoeur, M, & Henry, O. (2013a). The impact of the timing of induction on the metabolism and productivity of CHO cells in culture. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 162-171.
- Sheikholeslami, Z, Jolicoeur, M, & Henry, O. (2013b). Probing the metabolism of an inducible mammalian expression system using extracellular isotopomer analysis. *Journal of Biotechnology*, 164, 469-478.
- Shen, CF, & Kamen, A. (2012). Hyperosmotic pressure on HEK 293 cells during the growth phase, but not the production phase, improves adenovirus production. *Journal of Biotechnology*, 157(1), 228-236.
- Shi, F, Li, K, Huan, X, & Wang, X. (2013). Expression of NAD(H) Kinase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Improve NADPH Supply and L-isoleucine Biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* ssp. *lactofermentum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 504-521.
- Stanton, RC. (2012). Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life*, 64(5), 363-369.

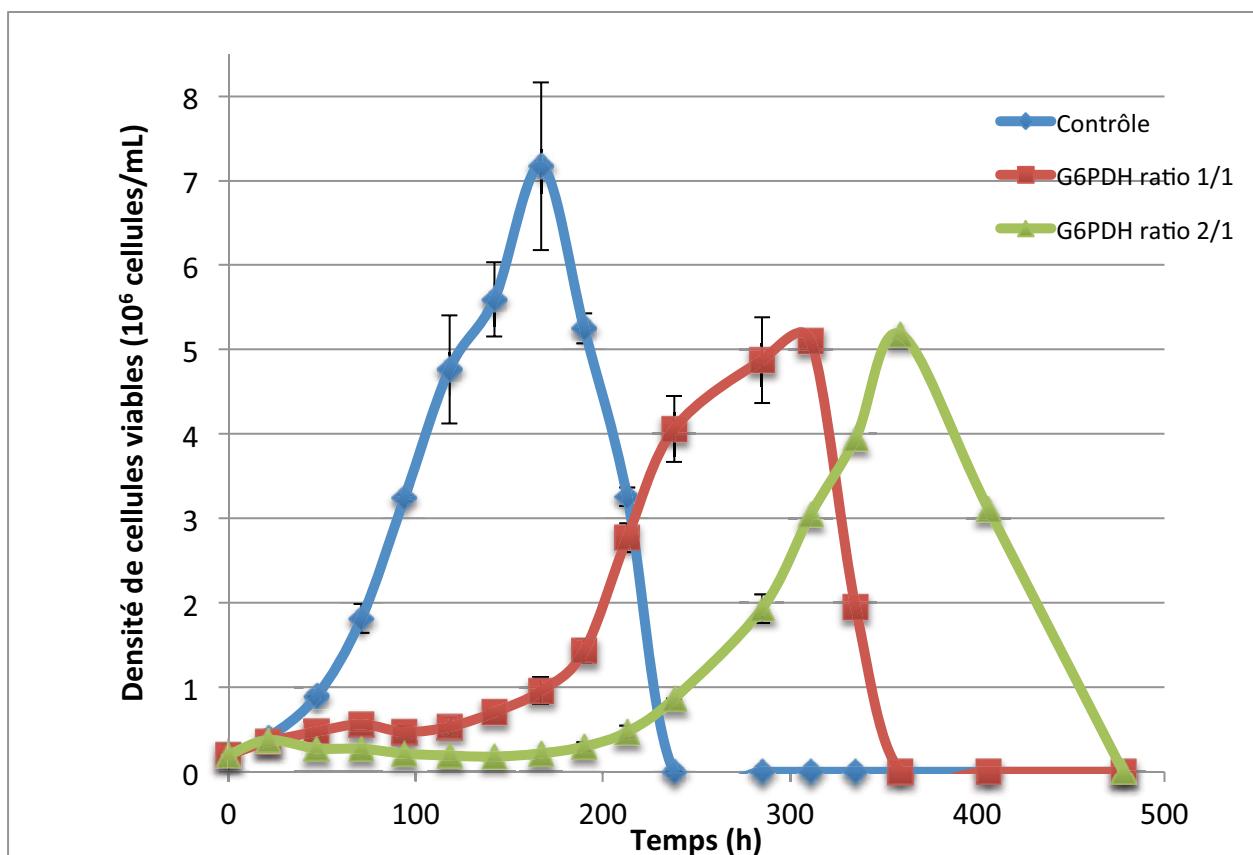
- Stanton, RC, Seifter, JL, Boxer, DC, Zimmerman, E, & Cantley, LC. (1991). Rapid release of bound glucose-6-phosphate dehydrogenase by growth factors. Correlation with increased enzymatic activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(19), 12442-12448.
- Stephanopoulos, GN, Aristidou, AA, & Nielsen, J. (1998). *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*.
- Sung, YH, Song, YJ, Lim, SW, Chung, JY, & Lee, GM. (2004). Effect of sodium butyrate on the production, heterogeneity and biological activity of human thrombopoietin by recombinant Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biotechnology*, 112(3), 323-335.
- Templeton, N, Dean, J, Reddy, P, & Young, JD. (2013). Peak Antibody Production is Associated With Increased Oxidative Metabolism in an Industrially Relevant Fed-Batch CHO Cell Culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(7).
- Templeton, N, Lewis, A, Dorai, H, Qian, EA, Campbell, MP, Smith, KD, . . . Young, JD. (2014). The impact of anti-apoptotic gene Bcl-2 Δ expression on CHO central metabolism. *Metabolic Engineering*, 25, 92-102.
- Tey, BT, & Al-Rubeai, M. (2004). Suppression of apoptosis in perfusion culture of Myeloma NS0 cells enhances cell growth but reduces antibody productivity. *Apoptosis*, 9(6), 843-852.
- Tian, W-N, Braunstein, LD, Pang, J, Stuhlmeier, KM, Xi, Q-C, Tian, X, & Stanton, RC. (1998). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10609-10617.
- Tian, WN, Braunstein, LD, Apse, K, Pang, J, Rose, M, Tian, X, & Stanton, RC. (1999). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *American Journal of Physiology*, 276(5 Pt 1), C1121-1131.
- Tinto', A, Gabernet, C, Vives, J, Prats, E, Cairo', JJ, Cornudella, Ls, & Go'dia, F. (2002). The protection of hybridoma cells from apoptosis by caspase inhibition allows culture recovery when exposed to non-inducing conditions. *Journal of Biotechnology*, 95, 205-214.
- Tom, R, Bisson, L, & Durocher, Y. (2007). Transient expression in HEK293-EBNA1 cells *Expression Systems: Methods Express*: Scion Publishing Ltd.
- Tome, ME, Johnson, DB, Samulitis, BK, Dorr, RT, & Briehl, MM. (2006). Glucose 6-phosphate dehydrogenase overexpression models glucose deprivation and sensitizes lymphoma cells to apoptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(7-8), 1315-1327.
- Ursini, MV, Parrella, A, Rosa, G, Salzano, S, & Martini, G. (1997). Enhanced expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. *Biochemical Journal*, 323, 801-806.
- Vallée, C, Durocher, Y, & Henry, O. (2014). Exploiting the metabolism of PYC expressing HEK293 cells in fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology*, 169, 63-70.
- Wang, XT, & Engel, PC. (2009). An optimised system for refolding of human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *BMC Biotechnology*, 9, 19.
- Wegner, A, Meiser, J, Weindl, D, & Hiller, K. (2015). How metabolites modulate metabolic flux. *Current Opinion in Biotechnology*, 34, 12-22.

- Wilkins, CA, Altamirano, C, & Gerdtzen, ZP. (2011). Comparative metabolic analysis of lactate for CHO cells in glucose and galactose. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(4), 714-724.
- Wilkins, CA, & Gerdtzen, ZP. (2015). Comparative Metabolic Analysis of CHO Cell Clones Obtained through Cell Engineering, for IgG Productivity, Growth and Cell Longevity. *PLoS ONE*, 10(3).
- Wlaschin, KF, & Hu, W-S. (2007). Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport. *Journal of Biotechnology*, 131(2), 168-176.
- Wong, DCF, Wong, KTK, Goh, LT, Heng, CK, & Yap, MGS. (2005). Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(2), 164-177.
- Wong, DCF, Wong, NSC, Goh, JSY, May, LM, & Yap, MGS. (2010). Profiling of N-glycosylation gene expression in CHO cell fed-batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(3), 516-528.
- Wurm, FM. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22, 1393-1398.
- Xie, L, & Wang, DIC. (2006). Fed-batch cultivation of animal cells using different medium design concepts and feeding strategies. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(2), 270-284.
- Xing, Z, Li, Z, Chow, V, & Lee, SS. (2008). Identifying inhibitory threshold values of repressing metabolites in CHO cell culture using multivariate analysis methods. *Biotechnology Progress*, 24(3), 675-683.
- Xu, Y, Osborne, BW, & Stanton, RC. (2005). Diabetes causes inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase via activation of PKA, which contributes to oxidative stress in rat kidney cortex. *American Journal of Physiology*, 289(5), F1040-1047.
- Ye, J, Kober, V, Tellers, M, Naji, Z, Salmon, P, & Markusen, JF. (2009). High-level protein expression in scalable CHO transient transfection. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(3), 542-551.
- Ying, W. (2008). NAD+/NADH and NADP+/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxydants & Redox Signaling*, 10(2), 179-206.
- Yoon, SK, Hwang, SO, & Lee, GM. (2004). Enhancing Effect of Low Culture Temperature on Specific Antibody Productivity of Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells: Clonal Variation. *Biotechnology Progress*, 20(6), 1683-1688.
- Yoon, SK, Song, JY, & Lee, GM. (2003). Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(3), 289-298.
- Zanghi, JA, Renner, WA, Bailey, JE, & Fussenegger, M. (2000). The Growth Factor Inhibitor Suramin Reduces Apoptosis and Cell Aggregation in Protein-Free CHO Cell Batch Cultures. *Biotechnology Progress*, 16(3), 319-325.

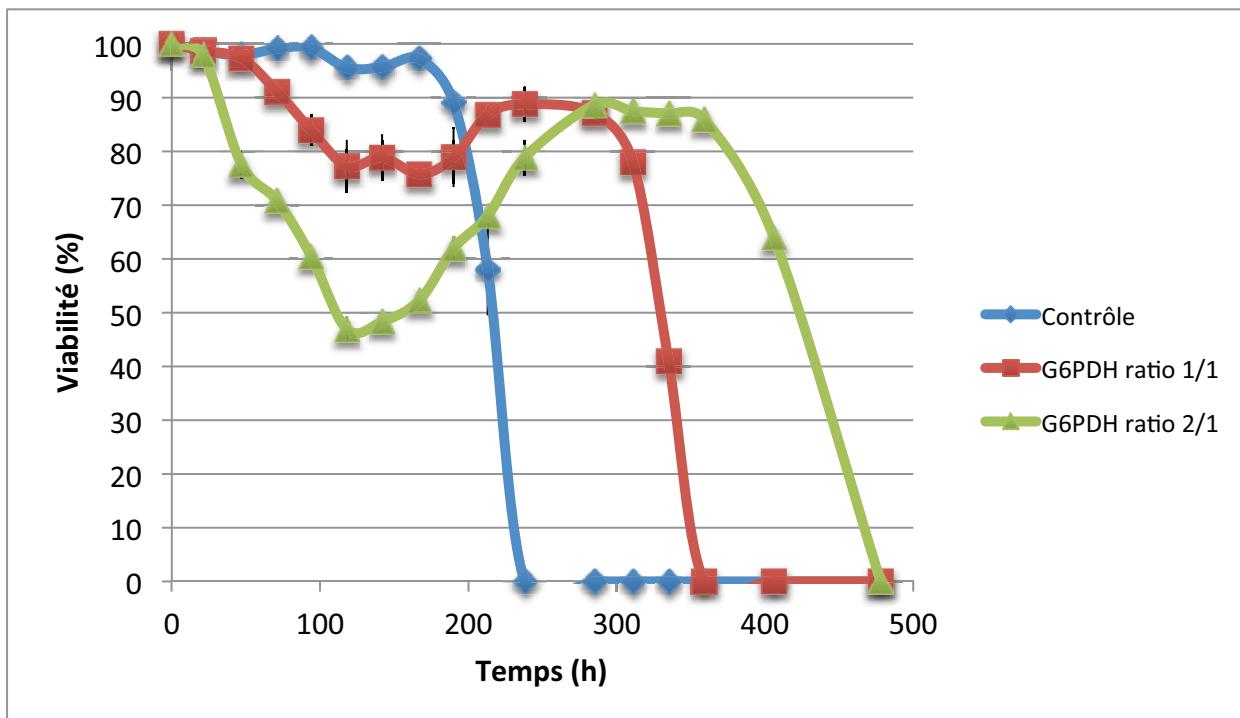
- Zhang, Z, Yang, Z, Zhu, B, Ji Hu, Liew, CW, Zhang, Y, . . . Stanton, RC. (2012). Increasing Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Activity Restores Redox Balance in Vascular Endothelial Cells Exposed to High Glucose. *PLoS ONE*, 7(11).
- Zheng, K, Bantog, C, & Bayer, R. (2011). The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. *mAbs*, 3(6), 568-576.

ANNEXE 1 RÉSULTATS DE SUREXPRESSION DE LA G6PDH SUR LES HEK293 AVEC TRANSFECTION À 24H ET DEUX RATIOS PEI/ADN DIFFÉRENTS

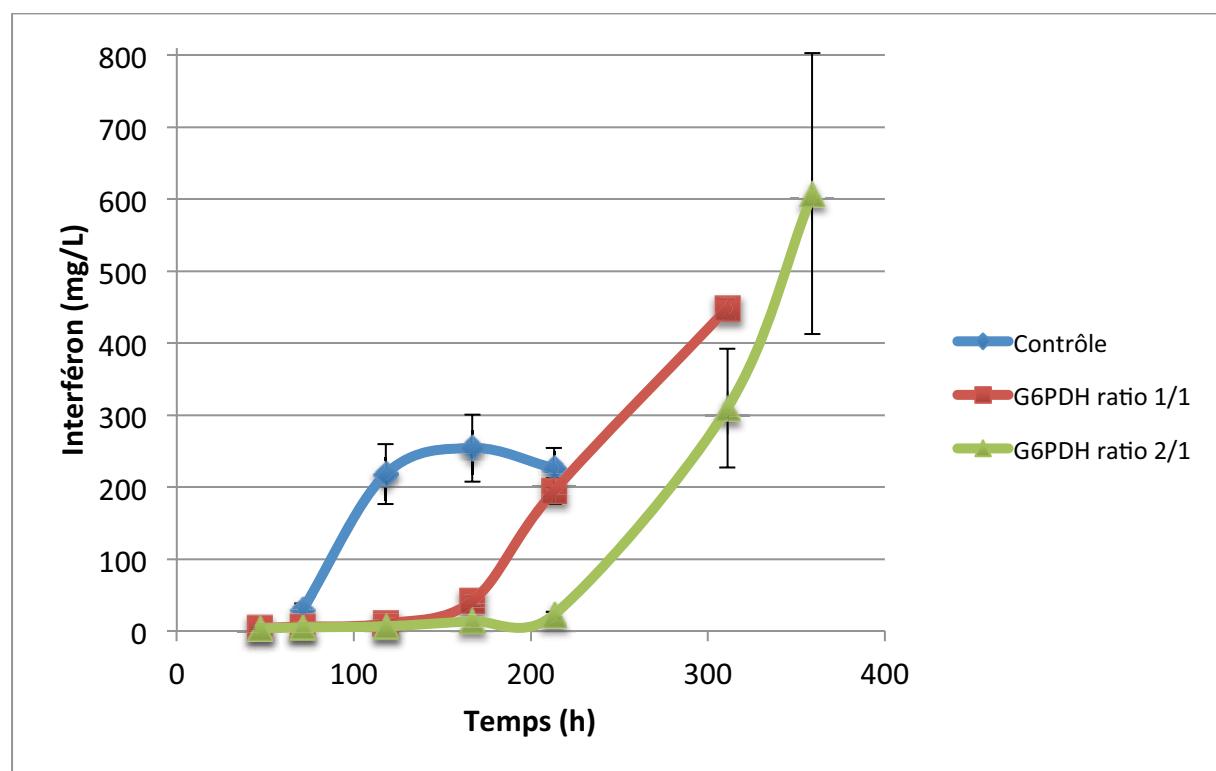
Une première expérience de transfection avait été effectuée sur les HEK293-F5 avec une transfection ayant lieu 24 h après le début de la culture, à des ratios PEI/ADN de 1/1 et 2/1. L'effet de la transfection sur la croissance cellulaire et la viabilité est clair, provoquant une phase de non-croissance et mort cellulaire sur les cellules transfectées. Mais la croissance reprend plus tard et l'accroissement de la durée de la culture semble s'être traduit par une augmentation de la production. Ces phénomènes sont repérables sur les courbes de consommation des nutriments (glucose, glutamine) et de production des sous-produits (lactate, glutamate). La culture ayant duré plus longtemps pour les cellules transfectées, elles ont produit plus de lactate et ont effectué leur switch métabolique vers la consommation de lactate plus tardivement. Étant donné les effets négatifs évidents de la transfection, ce protocole n'a pas été retenu.



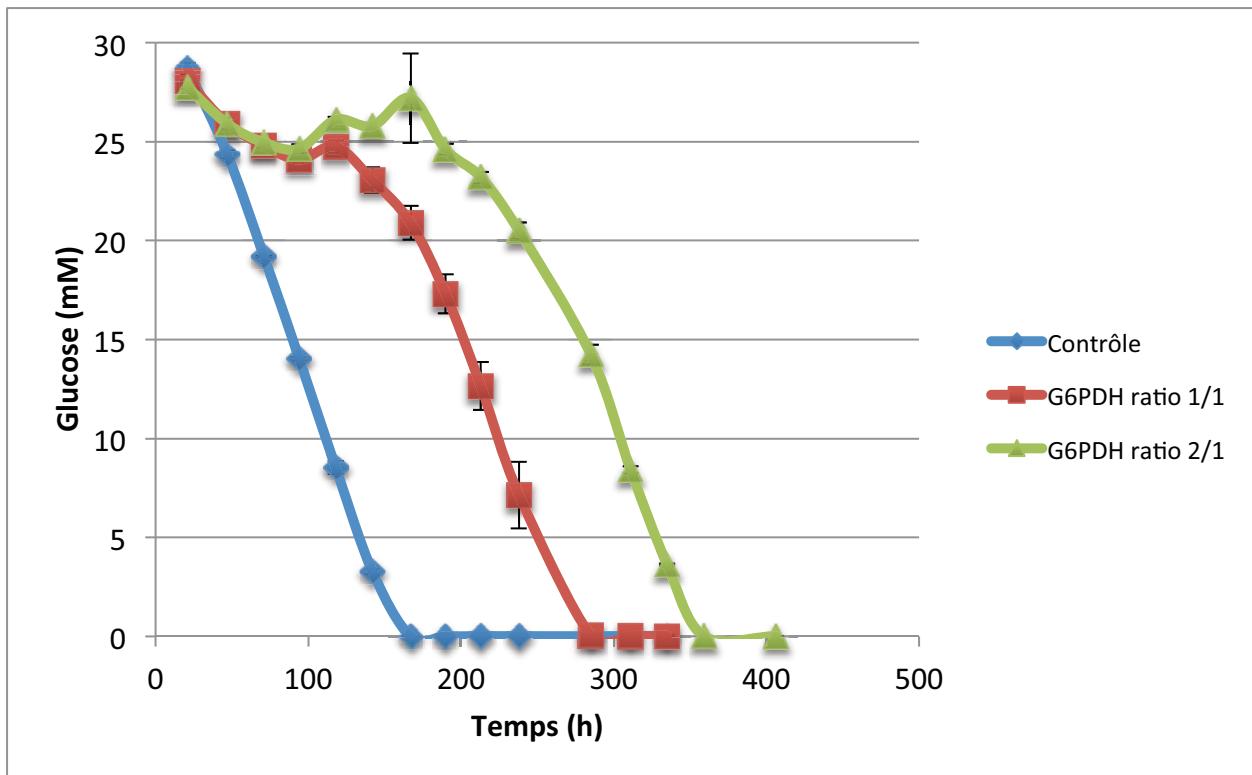
Annexe 1 - Comptes cellulaires



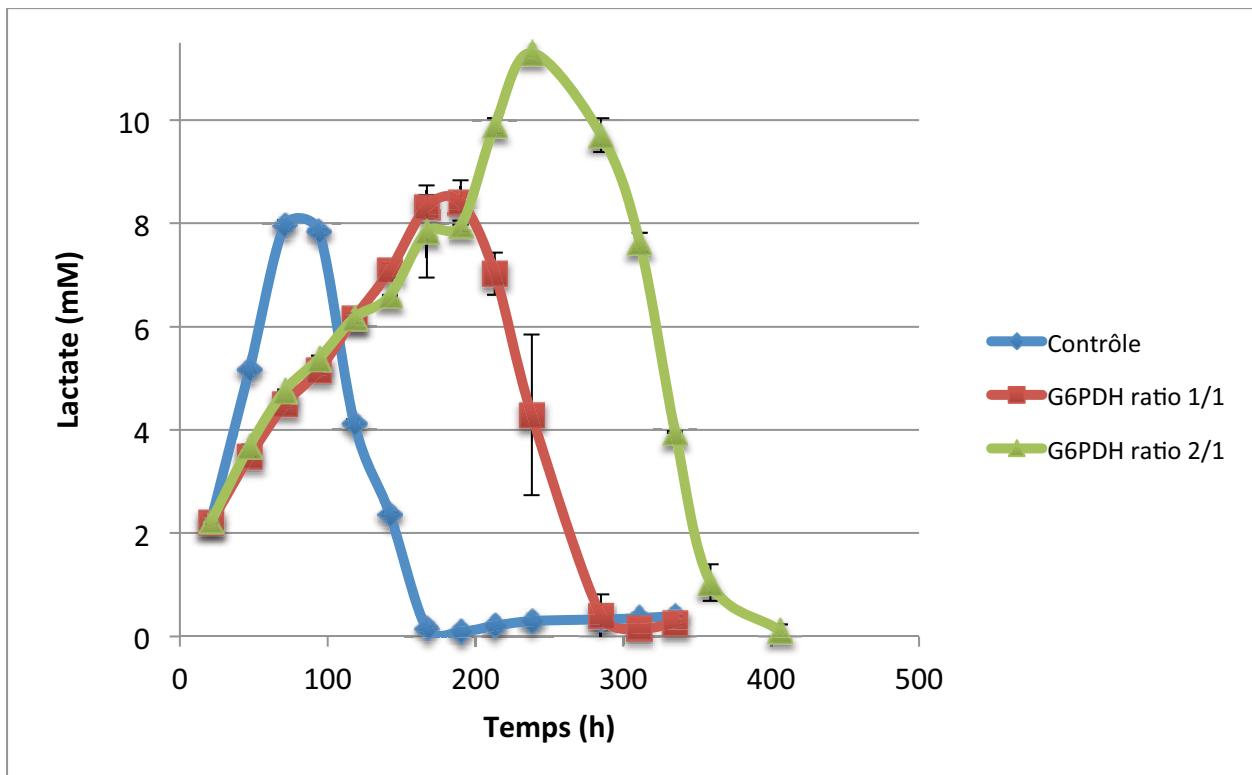
Annexe 1 – Viabilité cellulaire



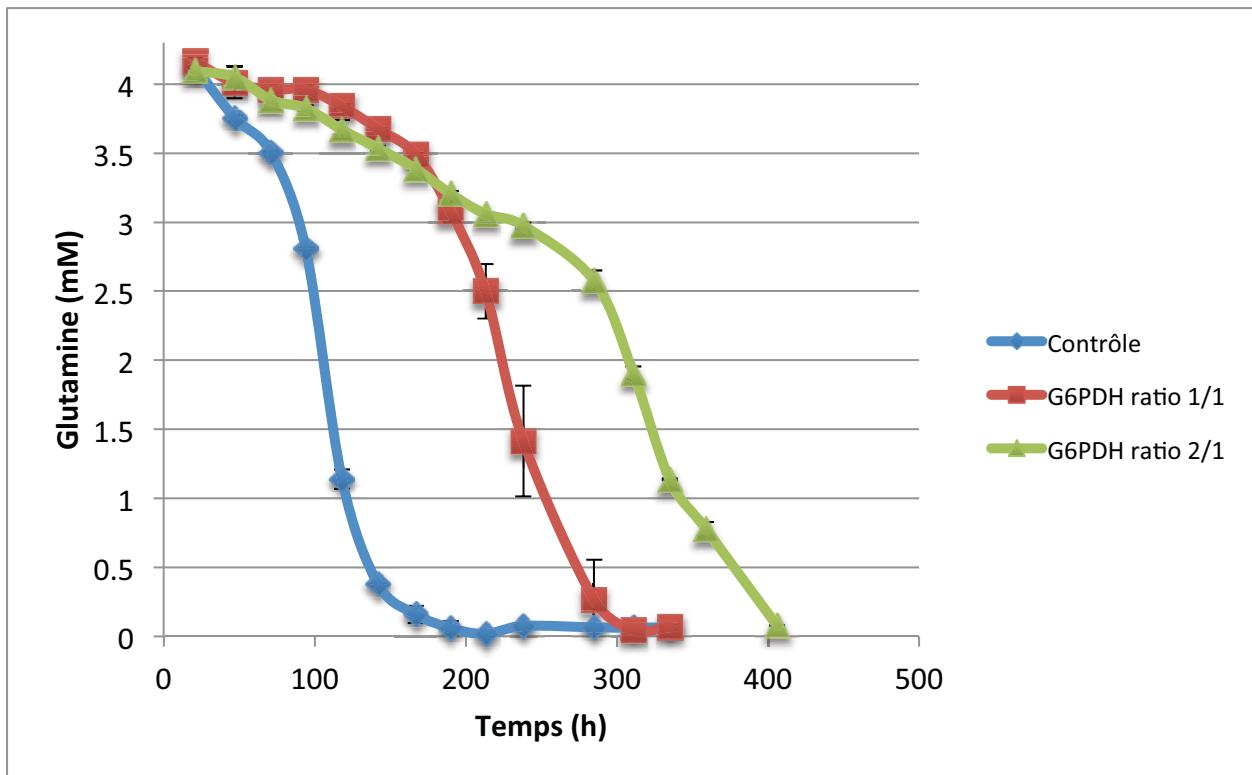
Annexe 1 – Production d'interféron



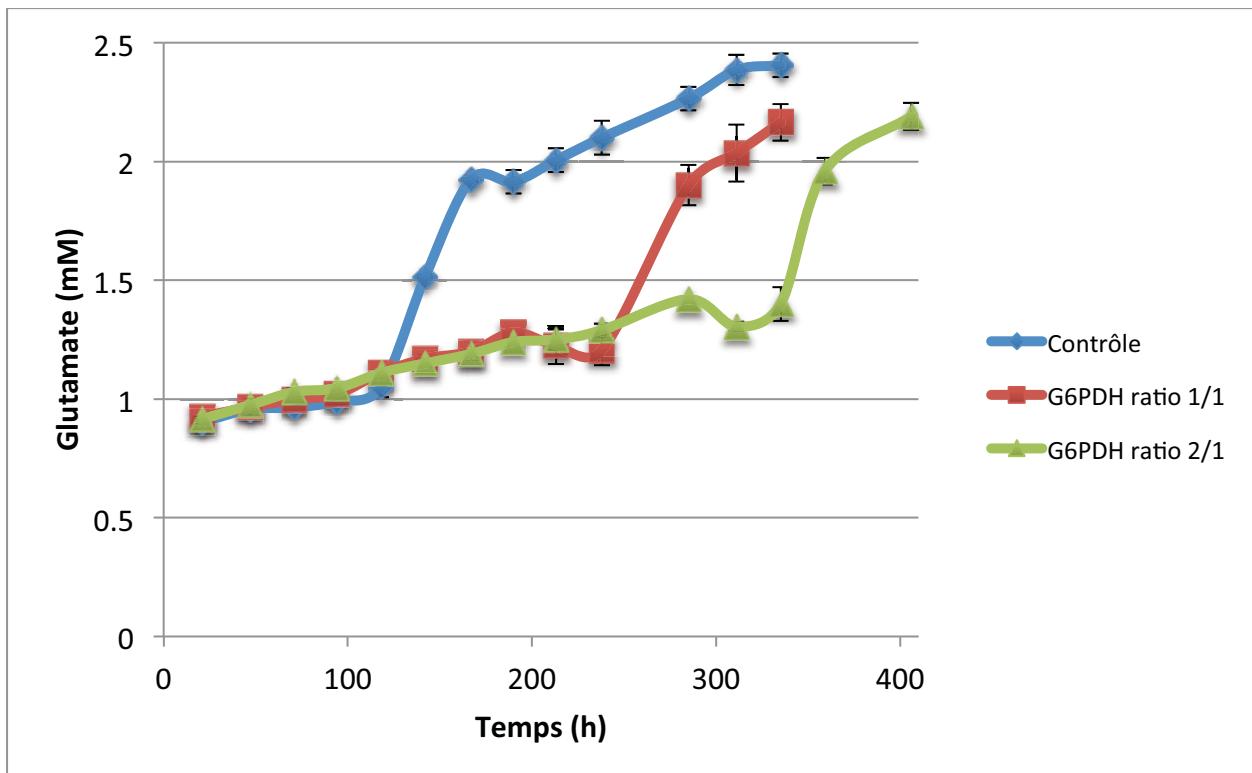
Annexe 1 – Consommation de glucose



Annexe 1 – Production/consommation de lactate



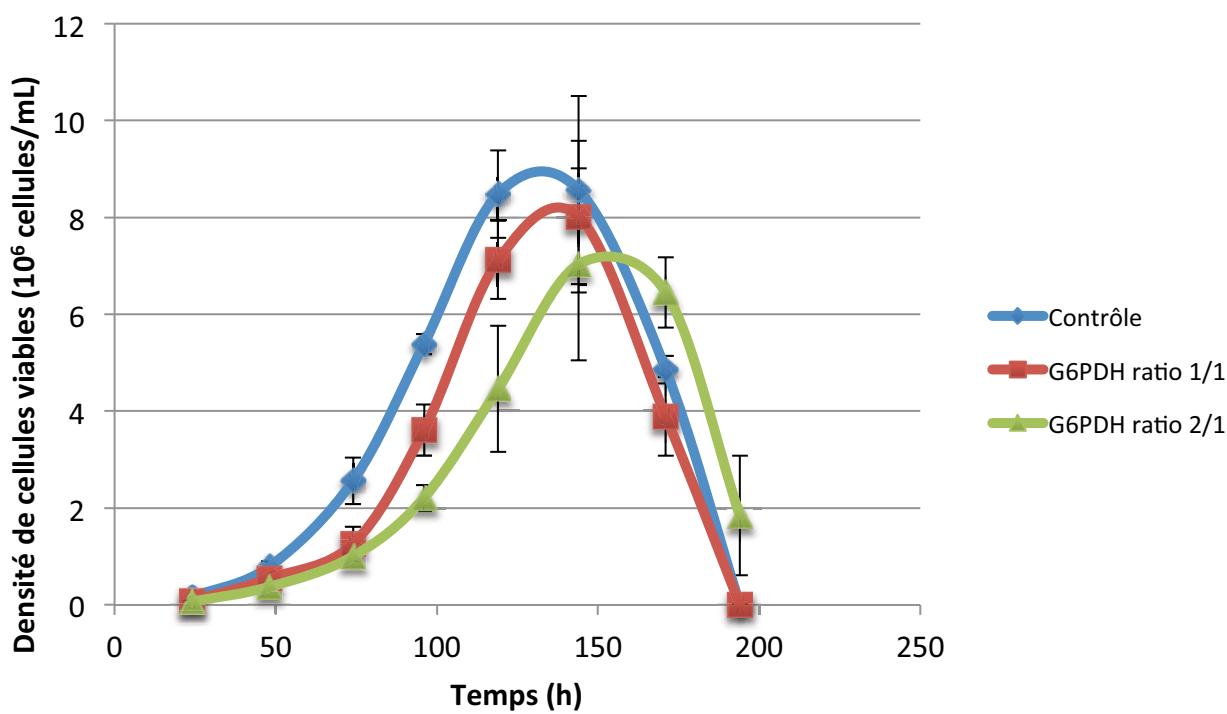
Annexe 1 – Consommation de glutamine



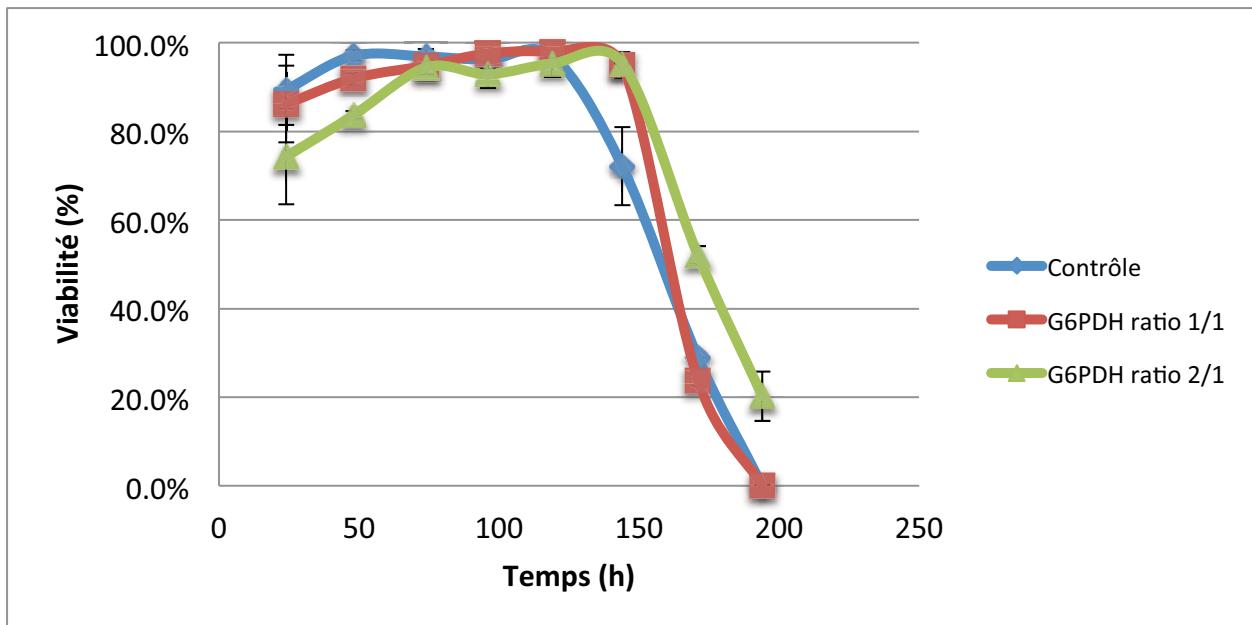
Annexe 1 – Production de glutamate

ANNEXE 2 RÉSULTATS DE SUREXPRESSION DE LA G6PDH SUR LES CHO-HP EN PLAQUE 6-PUITS

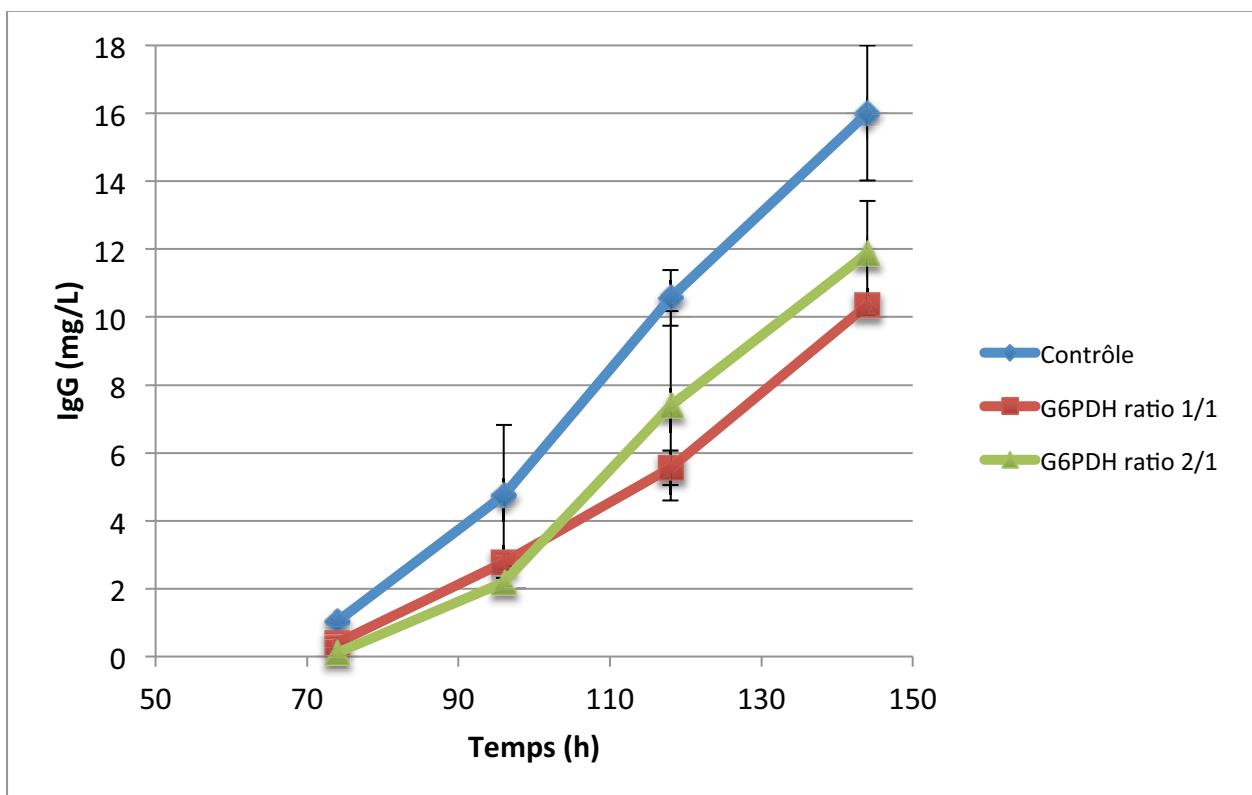
Des premières expériences en plaques 6-puits ont été réalisée sur les cellules CHO-HP. Les cellules ont été inoculées à 300 000 cellules/mL et transfectées 2 h après pour permettre leur induction à 52 h (une culture contrôle non transfectée, une transfection avec le plasmide codant pour l'enzyme à un ratio PEI/ADN de 1/1 et une transfection avec le plasmide codant pour l'enzyme à un ratio PEI/ADN de 2/1). Les résultats en termes de production spécifique laissaient entendre une amélioration de cette dernière, mais une légère baisse en termes de croissance cellulaire. Seulement, ces cellules ont été changées de milieu de culture pour permettre la transfection, et de l'agglomération a pu être observée faussant ainsi les comptes et les résultats (voir Annexe D). Ces résultats n'ont par ailleurs pas pu être reproduit en flacons agités.



Annexe 2 – Comptes cellulaires



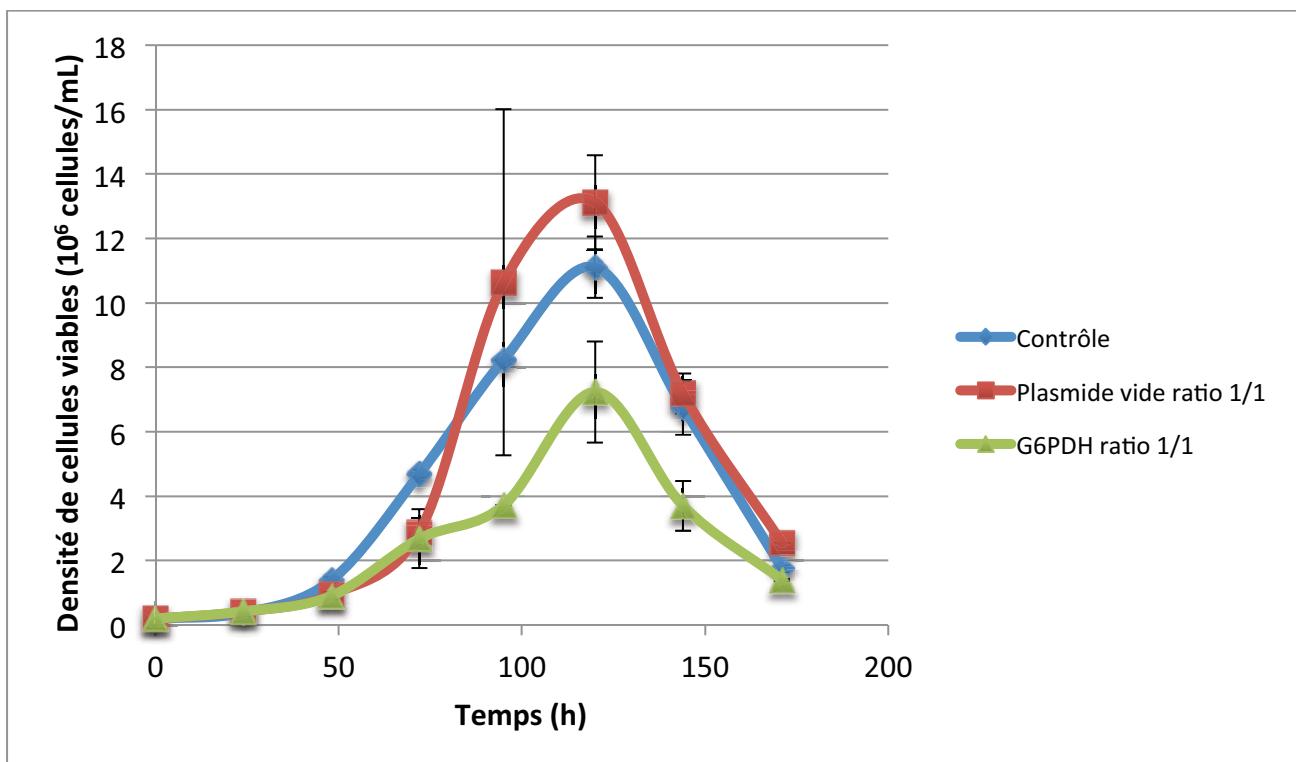
Annexe 2 – Viabilité cellulaire



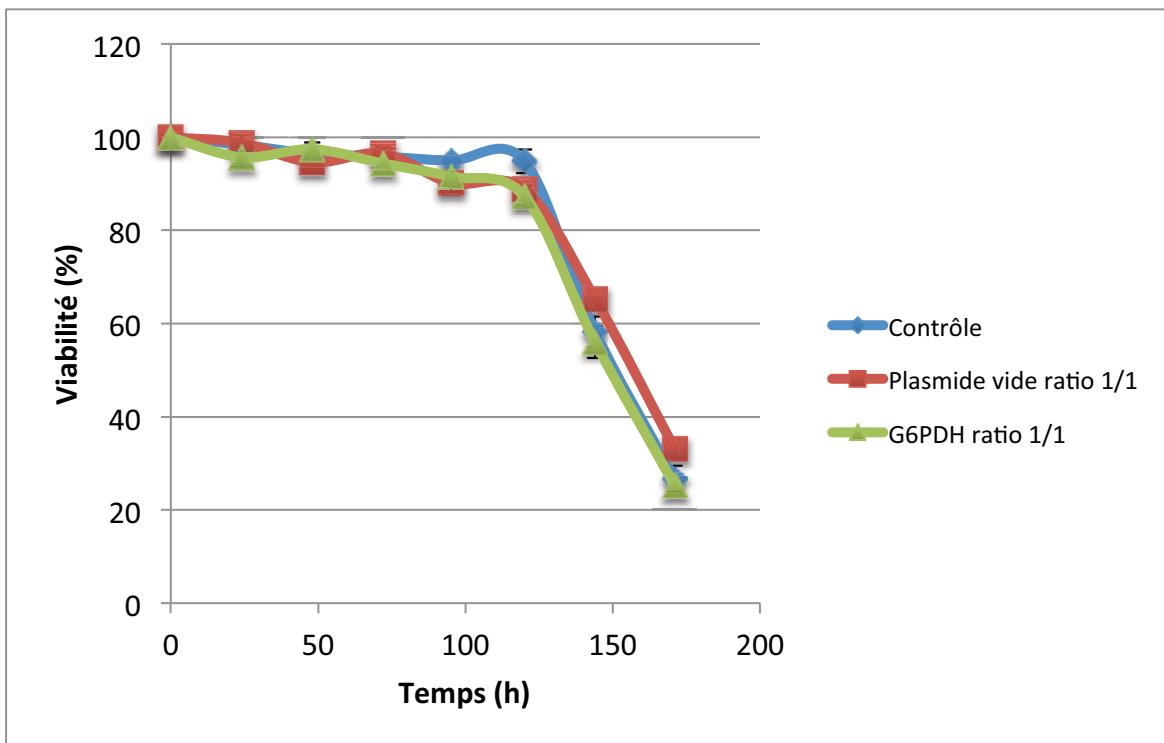
Annexe 2 – Production d'anticorps

ANNEXE 3 RÉSULTATS DE SUREXPRESSION DE LA G6PDH SUR LES CHO-EG2 EN PLAQUE 6-PUITS

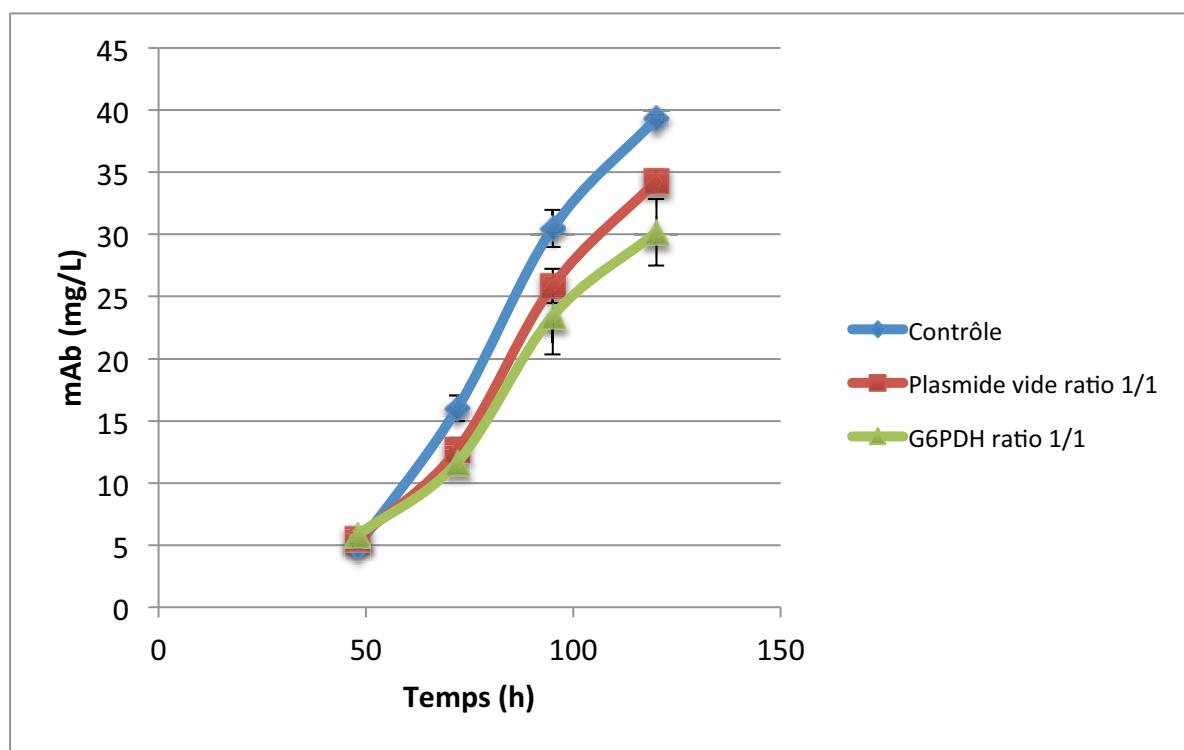
La même expérience en puits a été réalisée sur la lignée cellulaire CHO-EG2. L'inoculation s'est faite à 200 000 cellules/mL et la transfection a eu lieu à 24 h (une culture contrôle non transfectée, une transfection avec le plasmide vide à un ratio PEI/ADN de 1/1 et une transfection avec le plasmide codant pour l'enzyme à un ratio PEI/ADN de 1/1). Ici encore, les résultats de production spécifique laissaient penser une amélioration positive sur la production mais une grande baisse en termes de croissance cellulaire. À nouveau, les problèmes liés à l'adaptation au nouveau milieu ont entraîné des problèmes d'agglomération et de comptes cellulaires.



Annexe 3 – Comptes cellulaires



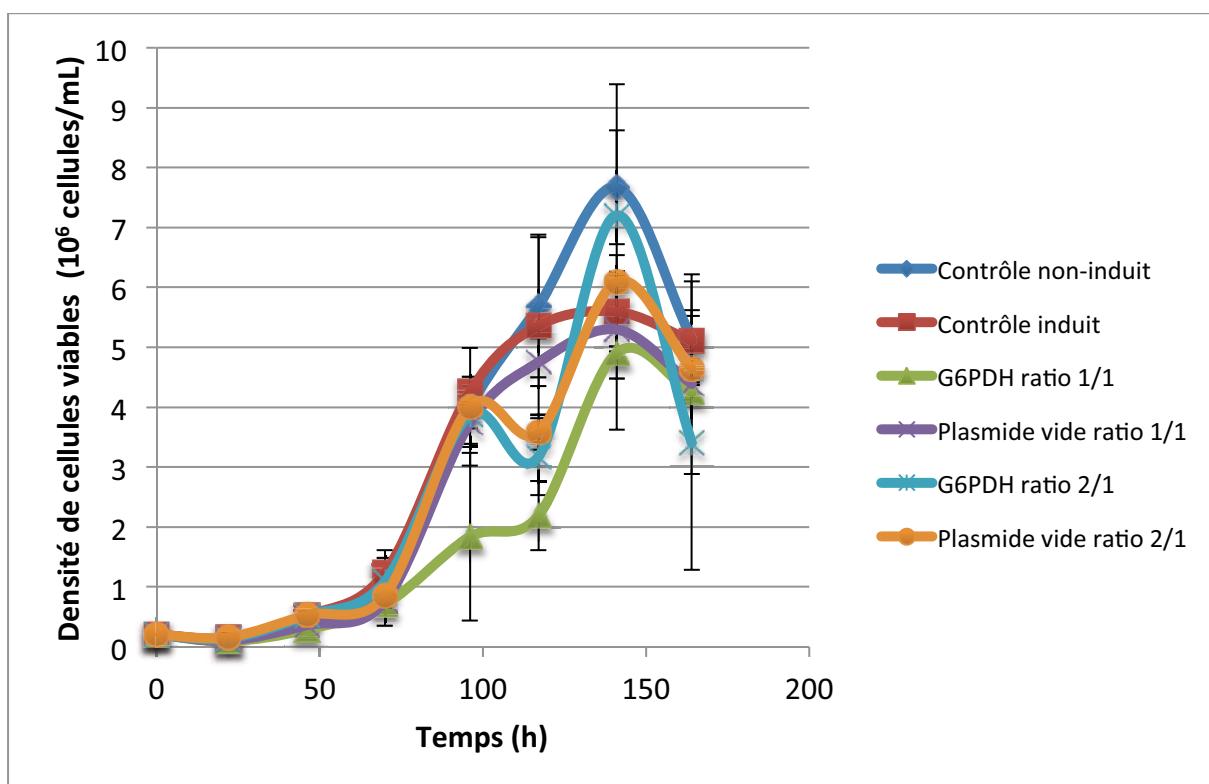
Annexe 3 – Viabilité cellulaire



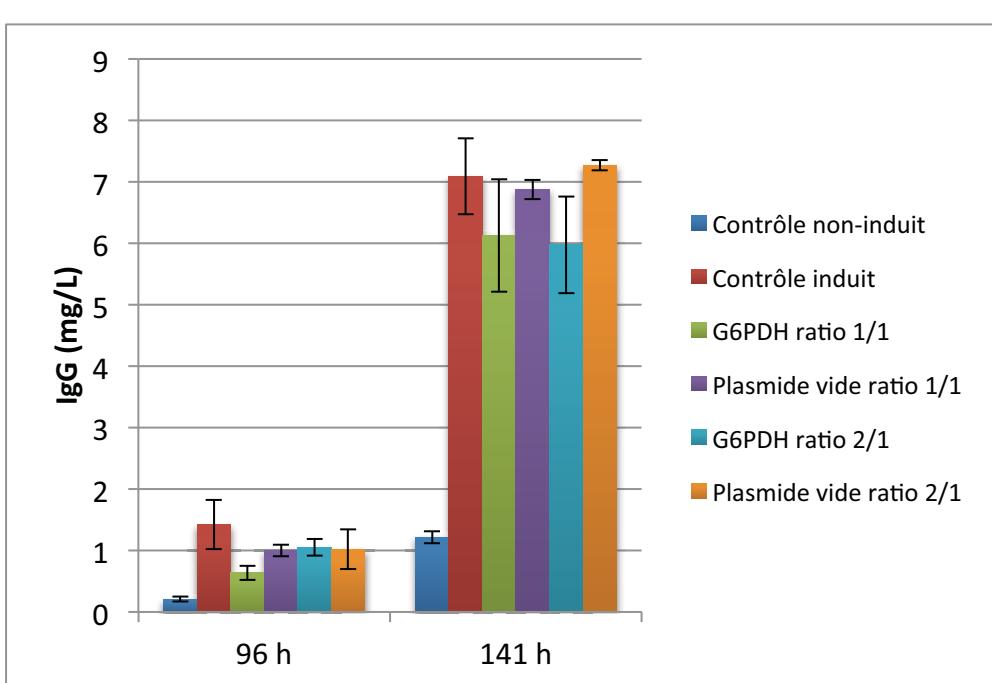
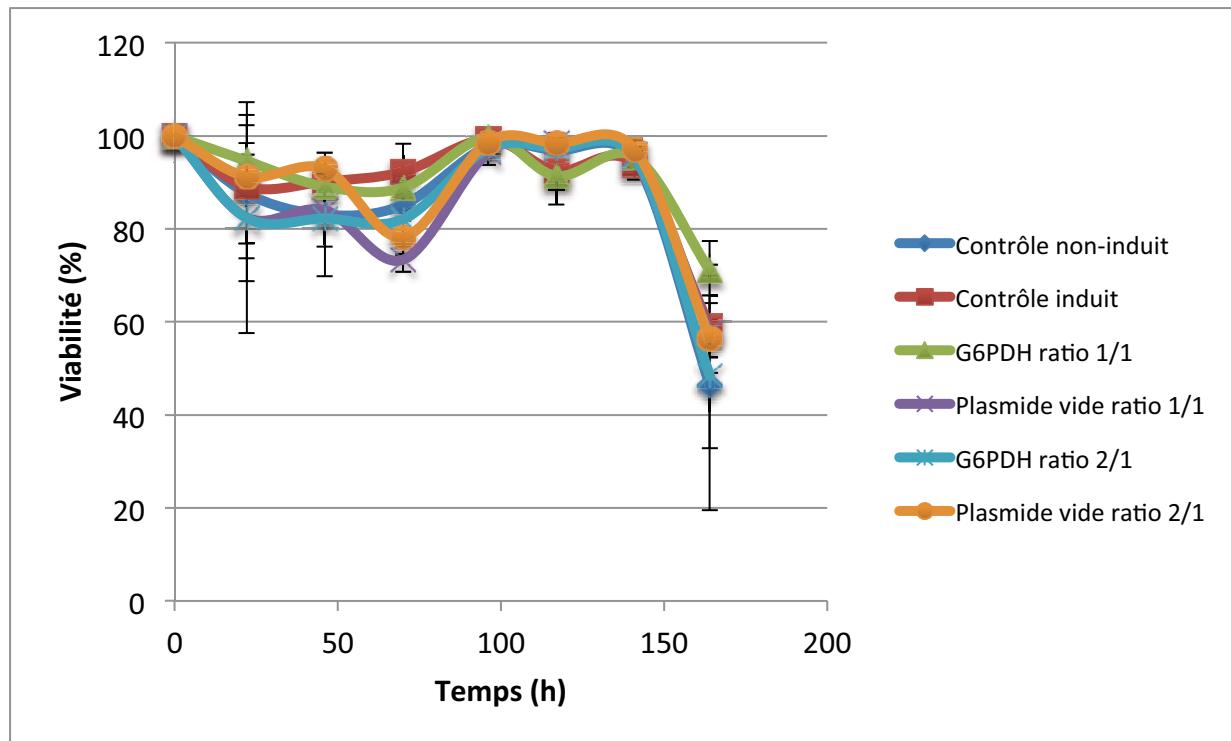
Annexe 3 – Production d'EG2

ANNEXE 4 RÉSULTATS DE SUREXPRESSION DE LA G6PDH SUR LES CHO-HP EN FLACONS AGITÉS

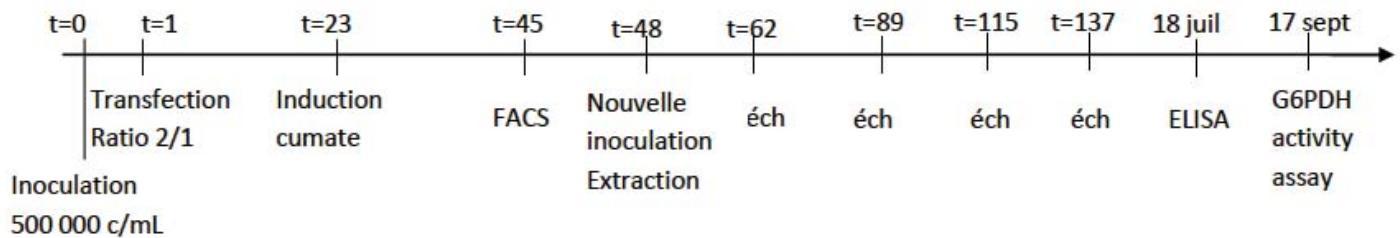
La G6PDH et le plasmide vide ont été transfectés en flacons agités dans les CHO-HP. La transfection a eu lieu à 48 h (environ 500 000 cellules/mL) et l'induction a eu lieu à 72 h (environ 1 millions de cellules/mL). Les conditions testées incluent : un contrôle non-induit et non transfété, un contrôle induit et non-transfété, des cultures induites et transfectées avec le plasmide vide ou le plasmide codant pour la G6PDH au ratio PEI/ADN 1/1 et des cultures induites et transfectées avec le plasmide vide ou le plasmide codant pour la G6PDH au ratio PEI/ADN 2/1. Les courbes de croissance et de viabilité montrent clairement un problème de compte cellulaire et de l'agglomération a été observée. Dans tous les cas, la comparaison des flacons transfectés avec le contrôle induit ne montre pas d'amélioration en termes de production.



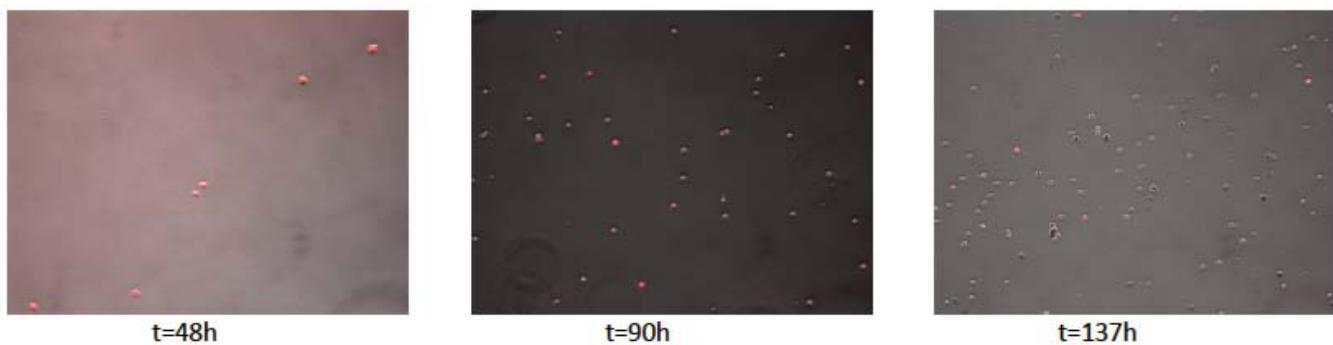
Annexe 4 – Comptes cellulaires



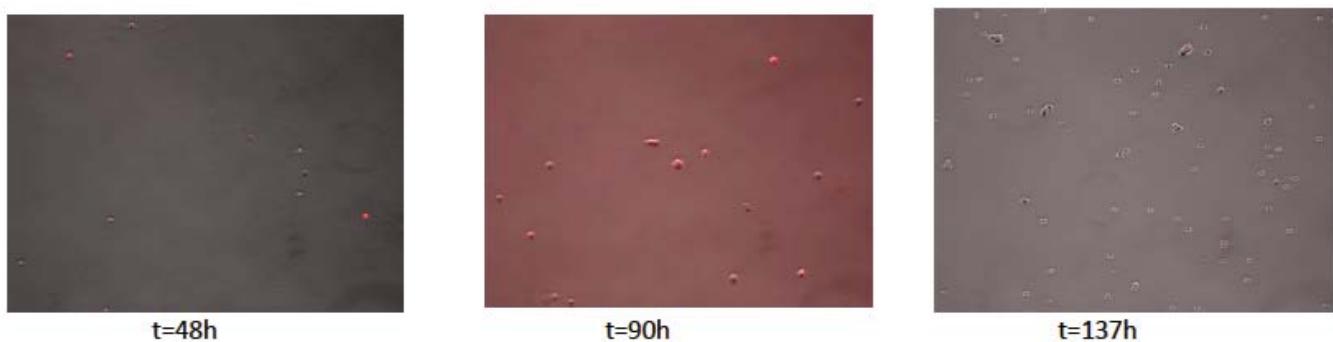
ANNEXE 5 RÉSULTATS DE SUREXPRESSION DE LA G6PDH SUR LES CHO-HP EN FLACONS AGITÉS APRÈS FACS



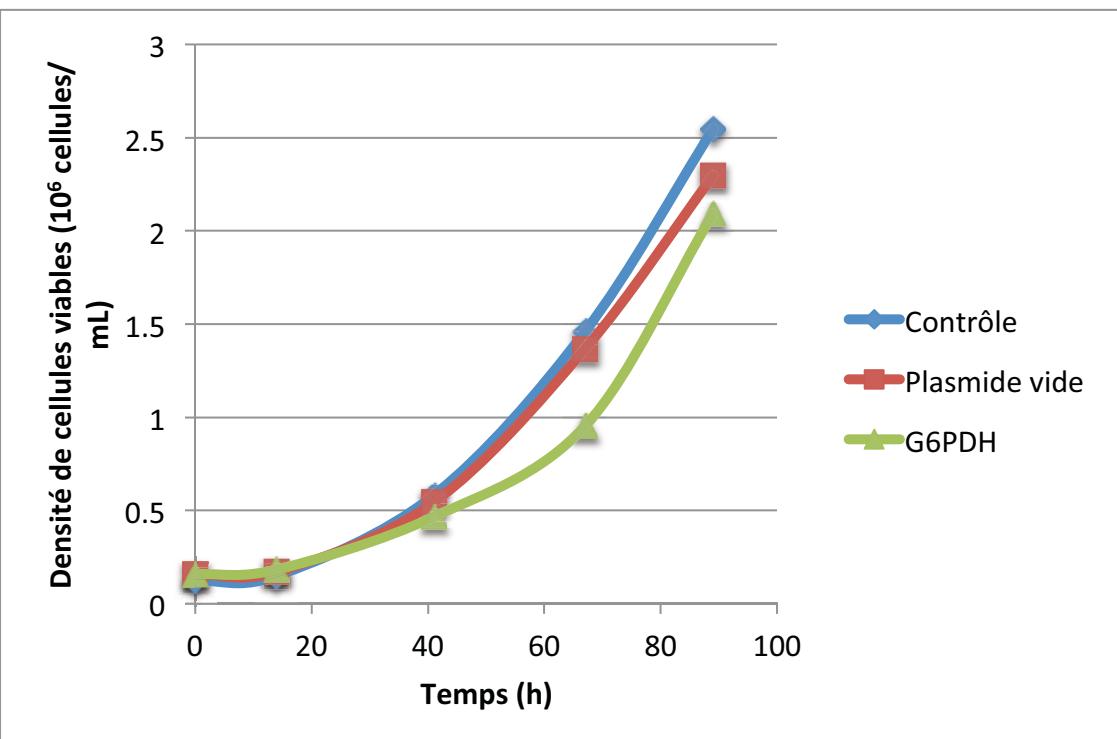
Suivi de la fluorescence de C+ (plasmide vide) :



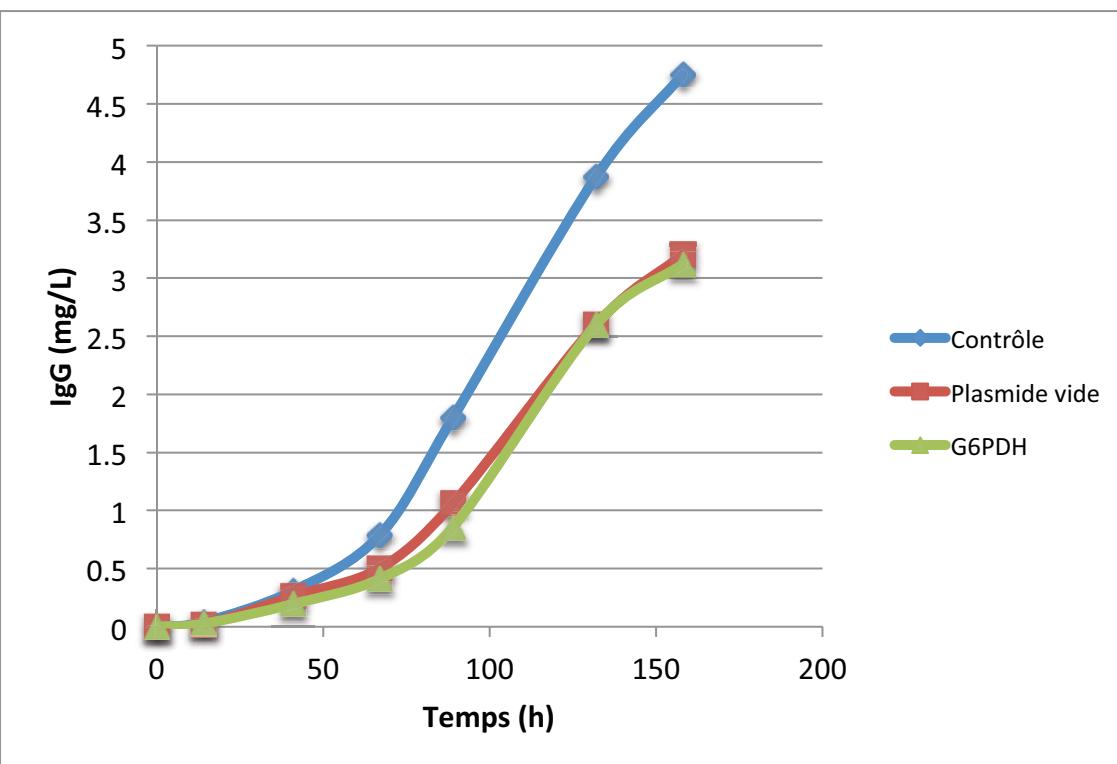
Suivi de la fluorescence de T (G6PDH) :



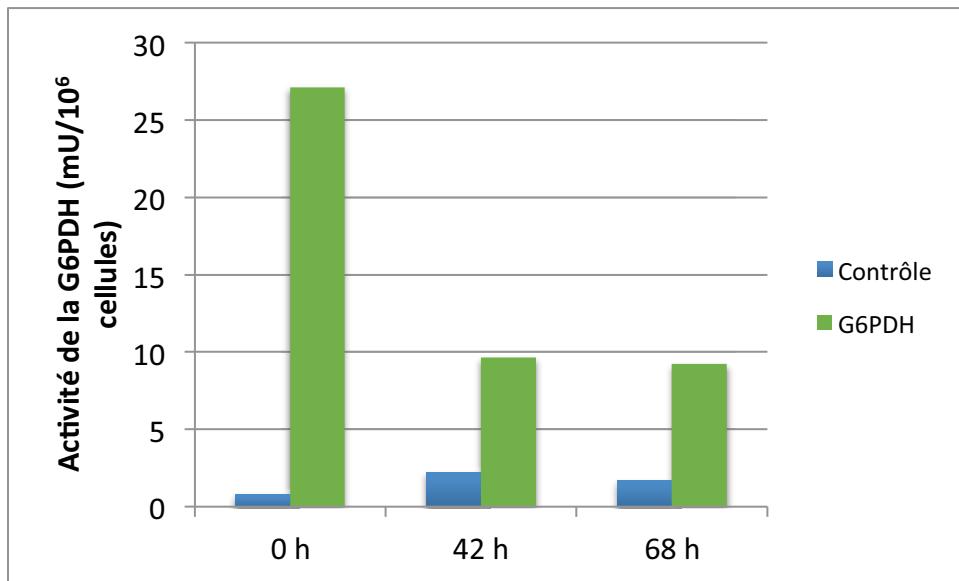
Annexe 5 – Protocole et suivi de fluorescence



Annexe 5 – Comptes cellulaires (après le FACS)



Annexe 5 – Production (après le FACS)



Annexe 5 – Activité de la G6PDH (après le FACS)

Ce protocole, même s'il a permis de montrer que la surexpression de la G6PDH n'avait aucun impact et que la G6PDH avait bien été surexprimée, est imparfait car le module de tri était défectueux. Nous n'avons pas récupéré le nombre de cellules positives à la fluorescence en raison d'un module de tri défectueux. De plus, les cellules récupérées étaient trop peu nombreuses pour lancer des duplicas et pas assez en forme pour obtenir une culture prolongée.