PolyPublie
Polytechnique Montréal

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL
UNIVERSITÉ D'INGÉNIERIE

Titre: Title:	Réduction de l'effet Warburg chez une lignée de cellules de mammifères productrices d'anticorps
Auteur: Author:	Léa Montégut
Date:	2019
Type:	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis
Référence: Citation:	Montégut, L. (2019). Réduction de l'effet Warburg chez une lignée de cellules de mammifères productrices d'anticorps [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/3936/

Document en libre accès dans PolyPublie
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: PolyPublie URL:	https://publications.polymtl.ca/3936/
Directeurs de recherche: Advisors:	Mario Jolicoeur
Programme: Program:	Génie biomédical

Ce fichier a été téléchargé à partir de PolyPublie, le dépôt institutionnel de Polytechnique Montréal
This file has been downloaded from PolyPublie, the institutional repository of Polytechnique Montréal

https://publications.polymtl.ca

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Réduction de l'effet Warburg chez une lignée de cellules de mammifères productrices d'anticorps

LÉA MONTÉGUT

Institut de génie biomédical

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie biomédical

Juillet 2019

© Léa Montégut, 2019.

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Réduction de l'effet Warburg chez une lignée de cellules de mammifères productrices d'anticorps

présenté par **Léa MONTÉGUT**

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

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

Marc LAVERTU, président
Mario JOLICOEUR, membre et directeur de recherche
Olivier HENRY, membre

DÉDICACE

À mes Ohana

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord mon directeur de recherche, le professeur Mario Jolicoeur, qui m'a proposé ce sujet de recherche puis accompagnée avec patience et enthousiasme tout au long de ma maîtrise. Merci de m'avoir guidée, conseillée et soutenue pendant ces deux années riches en apprentissages, tant humains que scientifiques.

J'adresse un merci particulier aux membres du laboratoire qui ont partagé leur avis, leurs conseils et leur sourire. Merci à Yuan pour son aide sans faille au labo, à Jingkui pour son expertise. Merci à Jorge, Pablo et Lenny pour leurs idées, leur expérience et leur énergie au quotidien.

Merci aussi aux membres des équipes « voisines » qui ont su partager plus qu'un coin de bureau et m'adopter aux pauses du midi aussi bien qu'au laboratoire. Les ELISA de Benoît, les astuces de culture cellulaire de Fred et Kahina, les conseils de Romane, Gwendoline et Audrey… votre aide m'a été précieuse autant que votre bonne humeur.

Enfin, je remercie du fond du cœur ma famille et mes amis pour leur soutien permanent pendant deux ans, pour ce projet comme pour tous les autres.

RÉSUMÉ

L'effet Warburg, ou glycolyse aérobie, est l'une des signatures métaboliques du cancer. Il est aussi largement observé chez les cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO), plateforme privilégiée par l'industrie pharmaceutique pour la production de médicaments. L'utilisation de la glycolyse aérobie, plutôt que de la respiration mitochondriale, comme voie catabolique principale est à l'origine d'un manque d'efficacité énergétique et d'une production accrue de lactate pouvant inhiber la croissance et la production. C'est pourquoi de nombreuses stratégies existent pour réduire l'effet Warburg durant les bioprocédés de cultures de cellules CHO. La plupart du temps, elles orientent le métabolisme vers la respiration en faisant appel à des modifications génétiques, activant ou inhibant des enzymes du métabolisme, ou à l'optimisation des conditions de culture, par le contrôle précis des échanges avec le milieu extracellulaire.

Nous proposons dans ce mémoire une troisième approche encore peu explorée. En s'inspirant des thérapies métaboliques appliquées pour diminuer l'effet Warburg dans le cadre du cancer, nous avons ajouté au milieu de culture des molécules interagissant avec certaines enzymes clés du métabolisme énergétique. Deux candidats ont été sélectionnés pour notre étude : l'acide lipoïque, connu pour activer l'enzyme responsable de l'entrée du flux glycolytique dans la mitochondrie, et le bleu de méthylène, connu pour faciliter les échanges d'électrons à la membrane mitochondriale.

Après avoir déterminé la dose maximale n'altérant pas la croissance pour chacune des drogues sur une lignée test de notre laboratoire capable de produire un anticorps monoclonal, nous avons mesuré leur effet sur la croissance, la viabilité, la consommation et la production de plusieurs métabolites importants, ainsi que sur des marqueurs directs de l'activité mitochondriale. Ce faisant, nous sommes parvenus à caractériser quelles voies métaboliques étaient activées et inhibées par la supplémentation de chacune des drogues et de leur combinaison. L'acide lipoïque semble encourager l'approvisionnement de la mitochondrie en intermédiaires réactionnels, tandis que le bleu de méthylène favorise les réactions d'oxydoréduction à la membrane mitochondriale et diminue le stress oxydatif qui en résulte. Ce dernier paramètre a un impact positif sur la productivité en anticorps, avec un titre final augmenté de 24 % par rapport au contrôle non traité. Ces résultats encourageants donnent un meilleur aperçu de la régulation métabolique des CHOs et présentent la supplémentation de drogues métaboliques comme une stratégie prometteuse pour augmenter la productivité des bioprocédés pharmaceutiques.

ABSTRACT

The Warburg effect, or aerobic glycolysis, is one of the metabolic signatures of cancer. It is also widely observed in Chinese hamster ovary (CHO) cells, the pharmaceutical industry's preferred platform for the production of drugs. The use of aerobic glycolysis, rather than mitochondrial respiration, as the main catabolic pathway impairs energy efficiency and increases lactate production, undermining cellular growth and production. This is why many existing strategies aim to reduce the Warburg effect during CHO-based bioprocesses. Most of the time, they direct the metabolism towards respiration by using genetic modifications, through the activation or inhibition of metabolic enzymes, or by optimizing culture conditions, through the precise control of exchanges with the extracellular environment.

In this work, we propose a third approach still scarcely investigated. Based on the example of metabolic therapies used in cancer treatments, we added effectors of certain energetic metabolism enzymes in the culture medium. Two candidates have been selected for our study: lipoic acid, known to activate the enzyme responsible for directing the glycolytic flux in the mitochondria, and methylene blue, known to facilitate electrons exchange at the mitochondrial membrane.

After determining the maximal dose without growth effects for each drug on an antibody-producing cell line available in our laboratory, we measured their effect on growth, viability, consumption and production of key metabolites, as well as direct markers of mitochondrial activity. Therefore, we managed to characterize which metabolic pathways were activated and inhibited by the supplementation of each drug and their combination. Lipoic acid appears to promote the supply of mitochondrial reaction intermediates, while methylene blue promotes redox reactions at the mitochondrial membrane and decreases the resulting oxidative stress. This last parameter has a positive impact on antibody productivity, with a final titer increased by 24%, compared to untreated control. These encouraging results provide a better insight into the metabolic regulation of CHOs and present metabolic drug supplementation as a promising strategy for increasing the productivity of pharmaceutical bioprocesses.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE III

REMERCIEMENTS IV

RÉSUMÉ V

ABSTRACT VI

TABLE DES MATIÈRES VII

LISTE DES TABLEAUX X

LISTE DES FIGURES XI

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS XIII

CHAPITRE 1 INTRODUCTION 1

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE 4

2.1 Métabolisme et effet Warburg 4

2.1.1 Le métabolisme central du carbone 4

2.1.2 Glycolyse, respiration, croissance et production 7

2.1.3 La glycolyse aérobie ou effet Warburg 12

2.2 Le métabolisme des cellules CHO : un modèle d'étude bien connu 16

2.2.1 Une plateforme de production d'anticorps 16

2.2.2 Approches métaboliques d'optimisation de culture des lignées CHO 19

2.2.3 Un métabolisme similaire aux cellules cancéreuses 28

2.3 Des drogues pour moduler le métabolisme 32

2.3.1 Approches thérapeutiques de modulation du métabolisme 32

2.3.2 L'acide lipoïque 35

2.3.3 Le dichloroacétate 37

2.3.4 Le bleu de méthylène 38

CHAPITRE 3 DÉMARCHE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT 41

CHAPITRE 4 ARTICLE 1: LIPOIC ACID AND METHYLENE BLUE REDUCE THE WARBURG EFFECT AND ENHANCE MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION IN CHO CELLS..... 44

4.1 Présentation de l'article 44

4.2 En-tête de l'article 44

4.3 Abstract 45

4.4 Introduction 45

4.5 Materials and methods 47

4.5.1 Cell line and medium 47

4.5.2 Culture and drug treatments 48

4.5.3 Cell count and extracellular metabolites measurements 48

4.5.4 Respirometry assays 49

4.5.5 Flow cytometry analysis of mitochondrial membrane potential and ROS production 49

4.5.6 ELISA quantification of mAb production 49

4.5.7 Statistical analysis 50

4.6 Results 50

4.6.1 Concentration response studies for α-LA and MB 50

4.6.2 α-LA and MB have distinct significant metabolic effects 52

4.6.3 Drug combination promotes cells OxPhos 54

4.6.4 Drugs affect mitochondrial membrane potential and oxidative stress level 56

4.6.5 MB significantly increases the final monoclonal antibody titer 57

4.7 Discussion 58
4.7.1 Up-regulation of pyruvate dehydrogenase can lead to OxPhos saturation 58
4.7.2 Methylene blue enhances the mitochondrial capacity 59
4.8 Conclusion 60
4.9 Aknowledgements 60
4.10 References 60
4.11 Supplementary Materials 67
CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE 68
5.1 Développement d'une méthode de test des drogues métaboliques 68
5.1.1 Adapter la dose à chaque lignée : une étape simple mais cruciale 68
5.1.2 Biomarqueurs métaboliques de l'effet Warburg 69
5.2 Stimuler le cycle TCA ne suffit pas pour abolir l'effet Warburg 72
5.2.1 L'acide lipoïque supporte l'activité du cycle TCA 72
5.2.2 Limitations de la capacité mitochondriale 74
5.2.3 Mode d'administration de l'acide lipoïque 78
5.3 Le bleu de méthylène libère la capacité mitochondriale 78
5.3.1 Activation des voies anaplérotiques 78
5.3.2 Un fonctionnement mitochondrial accru qui soutient la production 79
CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS 81
RÉFÉRENCES 83

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1. Effets métaboliques considérés comme déterminants pour la production d'anticorps ou d'autres protéines recombinantes dans la littérature 20

Tableau 2.2 Liste et effet d'additifs testés sur CHO pour augmenter la production 26

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1. Génération et consommation de la force proton-motrice à la membrane interne mitochondriale. “The regulation and physiology of mitochondrial proton leak.” (Divakaruni & Brand, 2011).....6

Figure 2.2. Rôles des intermédiaires du cycle TCA dans la biosynthèse. (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2012) Section 17.3, The Citric Acid Cycle Is a Source of Biosynthetic Precursors. ...9

Figure 2.3. Schéma du réseau métabolique simplifié des cellules CHO. Les flèches désignent les réactions enzymatiques liant plusieurs métabolites. Les noms des réactions sont sous la forme V(nom de l’enzyme) et les abréviations sont les mêmes que celles donnes au début de ce mémoire (Robitaille et al., 2015) 10

Figure 2.4. Mécanisme de régulation de l'activité du complexe pyruvate déshydrogénase (PDH) par la pyruvate déshydrogénase kinase (PDHK).....12

Figure 2.5. Le « goulot d’étranglement » mitochondrial : glycolyse aérobie observée à court et à long terme chez les cellules de mammifères et la levure. Pdc (pyruvate décarboxylase) est l’enzyme qui oriente le pyruvate vers la fermentation alcoolique chez *S. cerevisiae*. (de Alteriis et al., 2018).....14

Figure 2.6. Méthode de production des anticorps monoclonaux par hybridomes 17

Figure 2.7. Mécanismes moléculaires de la régulation métabolique des cellules tumorales. Les enzymes en violet sont celles sur-régulées ou activées dans le profil typique d’une cellule cancéreuse. Tiré de (Cairns et al., 2011) 30

Figure 2.8 Structure de l'α-acide lipoïque 35

Figure 2.9 Structure du dichloroacétate de sodium.....37

Figure 2.10 Structure du bleu de méthylène 38

Figure 2.11 Mécanisme de transfert d'électron alternatif par le bleu de méthylène dans la chaîne de transport des électrons à la membrane mitochondriale. Le bleu de méthylène (MB) contourne les complexes I à III pour transférer les électrons directement au cytochrome c (CytC),

augmentant la consommation d'oxygène et l'activité des complexes IV et V. Tiré de (Yang et al., 2017).....39

Figure 3.1. Cibles métaboliques des drogues choisies au sein des voies principales de production de l'énergie des cellules de mammifères comme la lignée CHO. L'acide lipoïque (α-LA) et le dichloroacétate (DCA) orientent le pyruvate, carrefour entre les voies fermentative et respiratoire, vers la mitochondrie. Le bleu de méthylène (MB) soulage la chaîne de transport des électrons d'une partie de son fonctionnement et réduit le niveau de stress mitochondrial. 42

Figure 5.1. Changements métaboliques majeurs entre les cellules productrices (bleu) et les cellules consommatrices (rouge) de lactate. L'épaisseur des flèches indique l'importance relative des flux métaboliques dans chacun des états métaboliques. Tiré de (Martínez et al., 2013). 74

Figure 5.2. Lien entre les 2-ketoacid dehydrogenases mitochondriales et le cycle TCA. Les enzymes 2-OADH (2-oxoadipate dehydrogenase), BCKDH (branched-chain ketoacid dehydrogenase), OGDH (α-ketoglutarate dehydrogenase) et PDH (pyruvate dehydrogenase) contribuent à diverses voies métaboliques dont les produits peuvent alimenter le cycle TCA. Tiré de (Solmonson & DeBerardinis, 2018) 77

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

La liste des sigles et abréviations présente, dans l'ordre alphabétique, les sigles et abréviations utilisés dans le mémoire ainsi que leur signification.

AcCoA	Acétyl coenzyme A
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
Akt	Protein kinase B
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
CHO	Chinese hamster ovary
CoA	Coenzyme A
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DCA	Dichloroacetate
FACS	Fluorescence activated cells sorting
FADH	Flavin adenine dinucleotide
G6P	Glucose-6-phosphate
G6PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GLC	Glucose
GLUT	Glucose transporter
hFc	Human fragment crystallizable region

HIF	Hypoxia inducible factor
IgG	Immunoglobuline G
LDH	Lactate déshydrogénase
mAb	Monoclonal antibody
MAL	Malate
MB	Methylene blue
MDH	Malate déshydrogénase
ME	Malic enzyme
mTOR	Mechanical target of rapamycin
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OXA	Oxaloacétate
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PDHK	Pyruvate déshydrogénase kinase
PEP	Phosphoenolpyruvate
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases
PK	Pyruvate kinase
PPP	Pentose phosphate pathway

PYC2	Pyruvate carboxylase 2
PYR	Pyruvate
R5P	Ribose-5-phosphate
rhGM-CSF	Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
ROS	Reactive oxygen species
TCA	Tricarboxylic cycle
α-KT	α-ketoglutarate
α-LA	α-lipoic acid

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

La production et commercialisation de biomolécules thérapeutiques complexes n'a cessé de prendre de l'ampleur depuis leur émergence dans la deuxième moitié du vingtième siècle, avec la pénicilline comme précurseur industriel, à partir de *Penicillium chrysogenum* (Moyer, 1945), et l'insuline comme première par recombinaison génétique de *Escherichia coli* (Goeddel et al., 1979). Entre janvier 2014 et juillet 2018 seulement, parmi les nouveaux médicaments approuvés par les instances de régulation aux États-Unis, près de la moitié (97 sur 207) étaient issus de biotechnologies impliquant la recombinaison génétique (i.e. insertion du gène codant pour une biomolécule d'intérêt dans une plateforme cellulaire hôte) plutôt que de la synthèse chimique (Walsh, 2018). Parmi ces thérapeutiques, nous retrouvons majoritairement des protéines telles que les anticorps monoclonaux (mAb) produits par culture *in vitro* de cellules de mammifère. Leur importance se reflète tant du point de vue du nombre d'innovations approuvées que des parts de marché, et cette tendance continuera de s'accentuer au fil des années (Walsh, 2014, 2018).

Avec les années, les compagnies biopharmaceutiques ont favorisé des plateformes cellulaires issues de mammifères pour la production de mAbs. Plus particulièrement, les lignées d'ovaires de hamster chinois, ou *Chinese Hamster Ovary* (CHO), font consensus car elles permettent de produire des biomolécules aux caractéristiques proches de celles trouvées chez l'humain (Rader & Langer, 2018). Avec l'arrivée à échéance des premiers brevets de protéines recombinantes thérapeutiques et l'apparition sur le marché des médicaments biosimilaires (Harvey, 2017), l'industrie biopharmaceutique cherche à maintenir sa compétitivité par une augmentation continue en productivité. Les stratégies d'amélioration des bioprocédés proposées par la communauté de chercheurs sont variées : optimisation de la lignée hôte par génie génétique, stratégies d'alimentation, modes de culture... Cependant, entre la régulation très contraignante du domaine pharmaceutique et les coûts liés au développement et à la modification d'un bioprocédé, peu de résultats académiques peuvent être transposés au niveau industriel.

Au cours des dernières années, la popularité des lignées CHO a tout de même permis de financer un grand nombre d'études théoriques et appliquées sur leur fonctionnement et, ainsi, un intérêt croissant s'est développé pour l'étude de leur métabolisme en interaction avec leur milieu de culture. Défini comme l'ensemble des réactions biochimiques ayant lieu au sein de la cellule en

relation avec son environnement pour se maintenir en vie, le métabolisme se place par essence au cœur de toutes les fonctions cellulaires. De nombreuses similarités ont été démontrées entre le profil métabolique des cellules CHO et celui, tout aussi fréquemment étudié, des cellules cancéreuses. Ainsi, un parallèle évident, et encore peu exploité, apparaît lorsque l'on observe les voies de la production d'énergie, ou catabolisme. Les cellules CHO, comme la plupart des lignées cancéreuses, sont fortement glycolytiques : même en présence d'oxygène elles n'utilisent pas ou peu la respiration pour produire leur énergie (DeBerardinis & Chandel, 2016; Hefzi et al., 2016; Martínez et al., 2013). Ce trait métabolique a été découvert sur des cellules cancéreuses par Otto Warburg en 1927 (Warburg, Wind, & Negelein, 1927). Nommé *effet Warburg* par extension lorsqu'il est rencontré chez des cellules de mammifères, il est surprenant pour plusieurs raisons. D'une part, la voie de la respiration est largement plus efficace pour produire de l'énergie à partir des glucides contenus dans l'alimentation que la voie de la glycolyse seule. D'autre part, ce phénotype conduit à la production de grandes quantités de lactate, ce qui acidifie le milieu extracellulaire si le pH n'est pas contrôlé ou augmente l'osmolarité si c'est la cas, altérant dans les deux cas la croissance des cellules et la production d'anticorps (Hartley, Walker, Chung, & Morten, 2018).

Plusieurs études mettent en relation la capacité des cellules de produire leur énergie dans la mitochondrie avec une production élevée. Empiriquement, des études réalisées *in silico* et *in vitro* montrent une corrélation entre le niveau d'activité mitochondriale et le niveau de production : plus le cycle de Krebs et la respiration cellulaire sont actifs, plus le titre obtenu en produit final est important (Gupta et al., 2017; Robitaille, Chen, & Jolicoeur, 2015). Ces observations sont confirmées du point de vue mécanistique. Ainsi, des liens clairs ont pu être établis entre le repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique, processus très gourmand en énergie, et la capacité de la mitochondrie à fournir cette énergie ainsi que divers signaux moléculaires (Kaufman & Malhotra, 2014).

Ce projet de maîtrise s'intéresse donc à la diminution de l'effet Warburg dans le but d'accroître la capacité de production de protéines recombinantes dans un modèle de cellules CHO productrices d'anticorps monoclonaux. À partir des connaissances acquises au laboratoire sur le métabolisme des CHOs, nous avons passé en revue les stratégies proposées dans la littérature ciblant la modulation d'enzymes spécifiques afin d'augmenter la production de mAbs. Ainsi, au vu des similarités métaboliques entre les cellules CHO et les cellules cancéreuses, nous nous sommes

inspirés des thérapies métaboliques utilisées dans le domaine de l'oncologie pour proposer une stratégie novatrice de réduction de l'effet Warburg par l'utilisation de drogues métaboliques déjà connues du milieu clinique. Une telle stratégie d'action présente deux avantages majeurs : elle ne nécessite qu'une modification mineure du milieu de culture, et présente peu de risques sanitaires, les molécules étant sélectionnées parmi des thérapeutiques déjà utilisées chez l'humain. Ce mémoire présente les résultats obtenus chez CHO en termes de modulation du métabolisme et d'augmentation de la production grâce à nos drogues candidates, i.e. l'acide lipoïque et le bleu de méthylène.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

Dans ce chapitre, nous présenterons une revue de la littérature dont l'analyse a mené à l'identification précise de la problématique étudiée dans ce mémoire. Nous commencerons par définir l'effet Warburg en le comparant au métabolisme « normal » de production d'énergie des cellules de mammifères. Ensuite, nous justifierons notre stratégie de thérapie métabolique appliquée aux cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) en montrant l'importance de leur utilisation industrielle, les succès et les limites des méthodes appliquées jusqu'ici. Nous tenterons de définir quelques cibles clées dans la régulation du métabolisme à l'aide des connaissances acquises sur les cellules CHO et sur les cellules cancéreuses. Suite à la sélection de nos cibles métaboliques, nous présenterons les drogues candidates et leur impact attendu sur le comportement général des cellules, en termes de physiologie et de production. Nous présenterons enfin les cibles métaboliques et drogues choisies pour cette étude ainsi que leurs effets attendus en nous basant sur de précédentes publications.

2.1 Métabolisme et effet Warburg

Nous commençons par présenter ici les voies principales du métabolisme énergétique d'une cellule de mammifère. En effet, pour comprendre notre objet d'étude, l'effet Warburg, il est nécessaire d'avoir une compréhension globale du mode de fonctionnement d'une cellule de mammifère « normale », des principales voies en jeu et de leur interconnexion. Nous nous attarderons ensuite à décrire le phénomène de l'effet Warburg et à donner un aperçu de sa compréhension actuelle.

2.1.1 Le métabolisme central du carbone

Le métabolisme est défini comme l'ensemble des réactions biochimiques ayant lieu au sein de la cellule et avec son environnement. En particulier, on distingue le catabolisme, qui consiste à dégrader des substrats carbonés pour générer des sous-unités précurseurs de synthèse de macromolécules (e.g. lipides, protéines, ADN, etc.) tout en produisant de l'énergie, de l'anabolisme, qui au contraire synthétise les matériaux cellulaires à partir des composés présents dans l'environnement cellulaire et précurseurs issus du catabolisme (Butler & Jenkins, 1989). Ces deux sous-métabolismes sont donc intimement liés.

Chez les mammifères, tel que pour les cellules eucaryotes, la flexibilité et la complexité du réseau métabolique font intervenir de multiples sources d'énergie et de nutriments, mais la composition majoritairement carbonée du vivant fait de la voie de production d'énergie par le carbone une voie centrale. Le glucose est ainsi considéré comme le principal substrat carboné car c'est une des sources d'énergie directement assimilables par les cellules à la première étape de la voie de la glycolyse, et trouvée en abondance dans l'alimentation (Jequier, 1994). Pour cette raison, on le retrouve comme source de carbone principale de la plupart des milieux de culture, dont ceux pour les cellules de mammifères (Landauer, 2014).

La première étape de la glycolyse consiste en l'import du glucose dans le cytoplasme au moyen de transporteurs. Ces derniers peuvent être des transporteurs par diffusion facilitée (modulée ou non par des hormones comme l'insuline) ou bien des transporteurs actifs Na^+-dépendants. Dans le cas des cellules CHO, la forme prédominante est celle par diffusion facilitée sensible à l'insuline avec la famille des transporteurs GLUT (Harrison, Buxton, & Czech, 1991; Hasegawa, Anraku, Kasahara, Akamatsu, & Nishijima, 1990). Outre la présence d'insuline, de nombreux autres facteurs environnementaux ou métaboliques régulent l'entrée de glucose, impactant ainsi l'ensemble des flux métaboliques subséquents (Fan et al., 2015).

Une fois internalisé, le glucose (GLC) est divisé en deux molécules de pyruvate (PYR) en suivant la voie métabolique de la glycolyse ou voie Embden-Meyerhof-Parnas. Cette chaîne de réactions enzymatiques produit au total 2 ATP et 2 NADH par molécule de glucose.

La première option est de clore la glycolyse par une étape de conversion en acide lactique et d'exporter ce dernier en-dehors de la cellule. Cette étape est réalisée par une enzyme appelée lactate déshydrogénase (LDH), qui oxyde simultanément un NADH en NAD^+. On parle alors de fermentation, un mécanisme qui est principalement utilisé en conditions anaérobiques.

En présence d'oxygène, le pyruvate est transporté jusqu'à la matrice mitochondriale pour entrer dans le cycle de Krebs ou cycle TCA (*tricarboxylic acid*). Ce transfert à travers la membrane mitochondriale se fait via des transporteurs spécifiques, de manière passive pour la membrane externe puis de manière active pour la membrane mitochondriale interne (Herzig et al., 2012). L'oxydation du pyruvate se poursuit avec l'acylation de la coenzyme A (CoA) grâce à l'enzyme pyruvate déshydrogénase (PDH), selon la réaction :

$$PYR + NAD^+ + CoA - SH \xrightarrow{PDH} Acetyl - CoA + CO_2 + NADH + H^+$$

La coenzyme A est un élément clé car il permet de transférer le groupe acide acétique et de faire subir aux résidus carbonés les réactions d'oxydation successives du cycle de Krebs, jusqu'au CO_2.

Ce cycle assume trois fonctions principales. Le pouvoir réducteur issu de ces oxydations est récupéré sous la forme réduite des coenzymes NADH et $FADH_2$.

La production d'énergie s'achève par l'étape de la respiration, ou phosphorylation oxydative. Au niveau de la membrane interne de la mitochondrie se trouvent les complexes de la chaîne de transport des électrons (Figure 2.1). Les électrons fournis par les coenzymes NADH et $FADH_2$ sont transférés d'un complexe à l'autre jusqu'à l'accepteur final d'électrons, O_2. Au cours de ce transfert, des protons H^+ sont transportés de manière active vers l'espace intermembranaire mitochondrial. Il en résulte un gradient intermembranaire aussi appelé force proton-motrice : l'énergie que génère leur retour vers la matrice mitochondriale est récupérée par un moteur moléculaire appelé ATP-synthase, et stockée sous la forme de molécules d'ATP (3 ATP par NADH, 2 par $FADH_2$). Cependant, il existe des protéines de « fuite » (« leak ») qui découplent le potentiel membranaire mitochondrial de la respiration phosphorylative (Figure 2.1). Les protons retournent vers la matrice mitochondriale de manière passive, pour réagir directement avec l'oxygène en résultant en molécules d'eau, sans conversion d'ADP en ATP (Cheng et al., 2017; Divakaruni & Brand, 2011). Cette réaction parallèle de combustion s'accompagne de génération de chaleur.

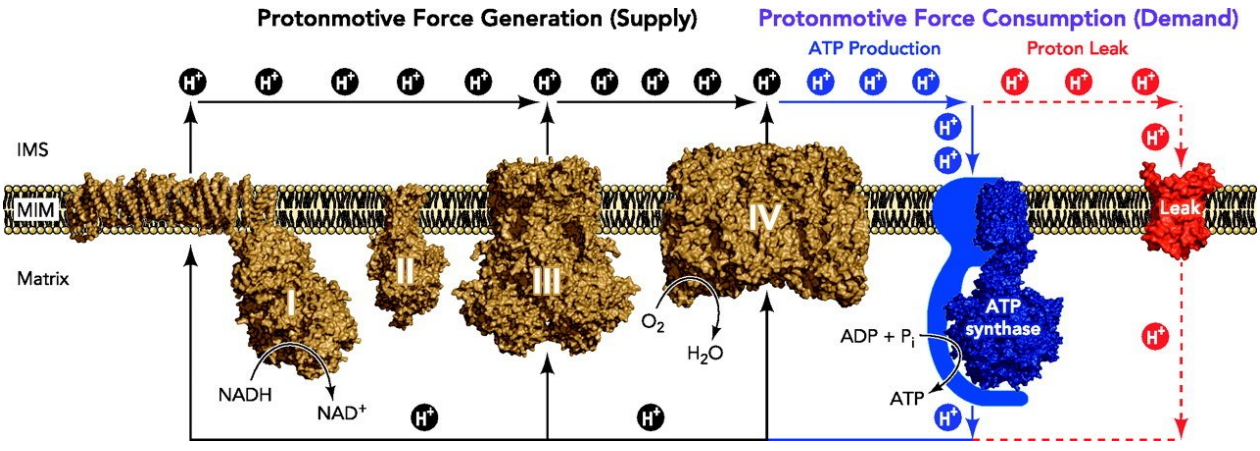

Figure 2.1. Génération et consommation de la force proton-motrice à la membrane interne mitochondriale. Les protons sont pompés dans l'espace intermembranaire (IMS) par les complexes I à IV de la chaîne de transport des élections puis utilisés par l'APT-synthase pour la génération d'ATP ou perdus sous forme de fuite électronique (*leak)*. Tiré de (Divakaruni & Brand, 2011).

2.1.2 Glycolyse, respiration, croissance et production

De nombreuses voies métaboliques sont intimement liées aux voies de la glycolyse et de la respiration. En effet, les intermédiaires réactionnels des voies que nous avons décrites plus haut peuvent être produits ou consommés par d'autres réactions. La régulation de telles réactions enzymatiques détermine l'importance relative des flux réactionnels de chacune des voies au sein de la cellule et peut avoir un impact majeur sur sa physiologie.

2.1.2.1 La glycolyse, un avantage prolifératif

Le premier intermédiaire de la glycolyse, le Glucose-6-phosphate (G6P), initie en parallèle la voie des pentoses phosphates (PPP). Ce dernier est oxydé par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), il perd un carbone pour former le ribulose-5-phosphate (R5P), libérant du CO_2 et la forme réduite de la navette NADPH.

$$G6P + 2\,NADP^+ \xrightarrow{G6PDH} R5P + 2\,NADPH + CO_2$$

Cette réaction est irréversible mais le R5P est converti en ribose et peut servir à alimenter plusieurs voies différentes. Il est en particulier utilisé par la synthèse de nucléotides ou d'acides aminés, dont certains intermédiaires peuvent, s'ils sont en excès, réalimenter la glycolyse. Ces trois voies sont donc inter-régulées : des cellules hautement glycolytiques favoriseront la prolifération cellulaire car elles alimenteront abondamment la production des précurseurs de l'ADN et des protéines nécessaires à la réplication cellulaire. Des cellules avec une forte demande en NADPH favoriseront de même la PPP car la synthèse des riboses est accompagnée d'une production plus importante de ce cofacteur au pouvoir de réduction important et impliqué dans les réactions de biosynthèse (Rajala, Rajala, Kooker, Wang, & Anderson, 2016).

On pourrait ainsi penser que de hauts niveaux de glycolyse sont souhaitables en culture cellulaire pour alimenter à la fois la production d'énergie par la voie respiratoire et la production de blocs élémentaires pour la croissance via la PPP. Cependant, de hauts niveaux de glycolyse sont associés à une forte production de lactate en bout de chaîne. C'est une conséquence naturellement observée dans de nombreuses cultures pour désengorger la voie de la glycolyse. Longtemps considéré comme un simple sous-produit de la glycolyse, le lactate influe considérablement sur le système : l'acidification du milieu inhibe la croissance (Bonarius et al., 2001; Butler & Jenkins, 1989), mais ce dernier peut aussi servir de substrat en alimentant la gluconéogenèse (production de glucose) et

certains vont jusqu'à parler de « lactormone » pour qualifier les effets variés du lactate tant au niveau métabolique que transcriptionnel (Brooks, 2002; Hashimoto, Hussien, Oommen, Gohil, & Brooks, 2007; San-Millán & Brooks, 2017).

La prépondérance de la voie de la glycolyse encourage donc la croissance, mais au prix de perturbations majeures du mode de fonctionnement cellulaire. Enfin, s'il est courant que les cellules hautement glycolytiques prolifèrent, il a été montré qu'à l'inverse de hauts niveaux de glycolyse ne sont pas nécessaires à la prolifération : dans ce cas les flux de la PPP sont privilégiés (McKeehan, 1982).

2.1.2.2 La mitochondrie, voie de l'énergie et de la biosynthèse

En bout de chaîne glycolytique, le pyruvate peut être importé dans la mitochondrie et alimenter le cycle TCA. On l'a vu, le potentiel réducteur des intermédiaires produits lorsque le cycle tourne sont utilisés à la membrane mitochondriale pour produire de l'énergie sous forme d'ATP. Lorsqu'on arrête l'oxydation du glucose au pyruvate pour produire le lactate, 2 équivalents d'ATP sont produits par mole de glucose. En comparaison, si l'oxydation se poursuit et si l'on va jusqu'à la phosphorylation oxydative, 36 équivalents d'ATP sont produits au total par mole de glucose. La voie mitochondriale présente donc un clair avantage en terme d'efficacité énergétique, menant à une meilleure production pour les protéines complexes dont la biosynthèse est exigeante en énergie (Shuler, Kargi, & DeLisa, 2017).

De plus, les intermédiaires du cycle de Krebs sont impliqués dans de très nombreuses voies de biosynthèse comme montré à la Figure 2.2. La complexité de ce réseau est telle que des changements minimes de concentration pour l'un des intermédiaires du cycle peuvent avoir des conséquences importantes sur une des voies de la biosynthèse et inversement. D'un autre côté, le fait que ces réactions soient liées confèrent à la cellule une certaine flexibilité métabolique. La nature cyclique de cette voie permet ainsi de compenser l'absence d'un métabolite par la surabondance d'un autre. De fait, la glycolyse n'est pas le seul point d'entrée du cycle TCA : les voies annexes qui permettent d'alimenter le cycle sont nommées voies *anaplérotiques*. Chez la lignée CHO-K1 il a été montré qu'une part significative du flux du cycle de Krebs provenait du catabolisme de la glutamine (glutaminolyse) et d'autres acides aminées essentiels (Nicolae, Wahrheit, Bahnemann, Zeng, & Heinzle, 2014). À l'inverse, il est possible de compenser l'absence de glutamine dans un milieu de culture en supplémentant ce milieu par d'autres intermédiaires du

cycle comme l'alpha-kétoglutarate, l'acide succinique et l'acide citrique (Ha & Lee, 2014). On voit donc que le cycle de l'acide tricarboxylique est un pivot essentiel au bon fonctionnement cellulaire, mais que sa très grande flexibilité d'opération est le fruit d'une combinaison complexe des voies qui lui sont connectées.

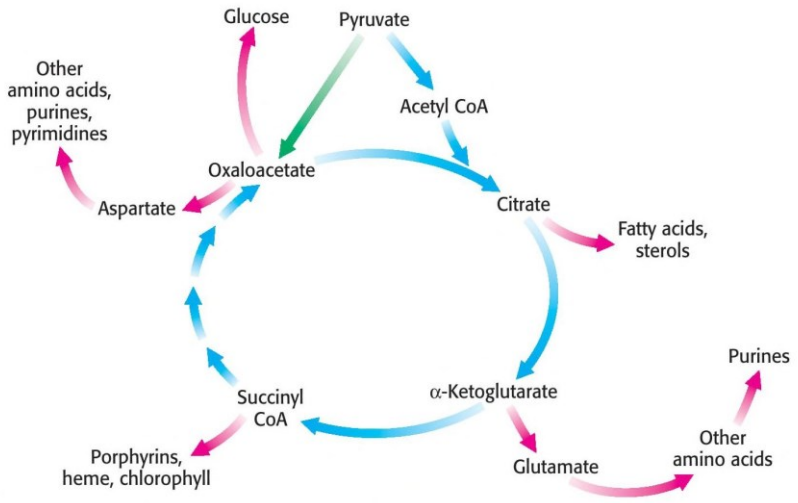

Figure 2.2. Rôles des intermédiaires du cycle TCA comme précurseurs des voies anaboliques. Outre sa fonction énergétique via la chaîne de transport des électrons, le cycle TCA alimente par ses intermédiaires de nombreuses voies anaboliques (ici en rose) comme la synthèse des acides gras, des acides nucléiques, etc. Tiré de (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2012)

Une cellule saine fonctionne en utilisant à la fois la glycolyse et la respiration. On qualifiera une cellule de plus ou moins *glycolytique* ou *respiratoire* lorsqu'elle favorisera *relativement* l'un ou l'autre des deux modes. On l'a vu, la voie mitochondriale permet une meilleure efficacité énergétique et subvient aux besoins de la cellule pour de nombreux intermédiaires, c'est pourquoi en général une cellule de mammifère sera régulée de manière à favoriser la respiration en présence d'oxygène. Ces mécanismes de régulation sont très nombreux et complexes : ils font intervenir des boucles de rétroaction positives et négatives entre les différentes voies que nous ne chercherons pas à développer dans cette section. Pour résumer les voies principales qui nous intéressent et leur interconnexion chez la lignée CHO, nous nous appuierons sur le schéma métabolique simplifié proposé par Robitaille et al. en 2015. Il prend en compte les réactions principales des voies de la glycolyse, du cycle TCA, de la glutaminolyse et de la voie des PPP ; ainsi que des modèles simplifiés d'utilisation des acides aminés et autres intermédiaires réactionnels pour alimenter la croissance et la production d'anticorps (Figure 2.3).

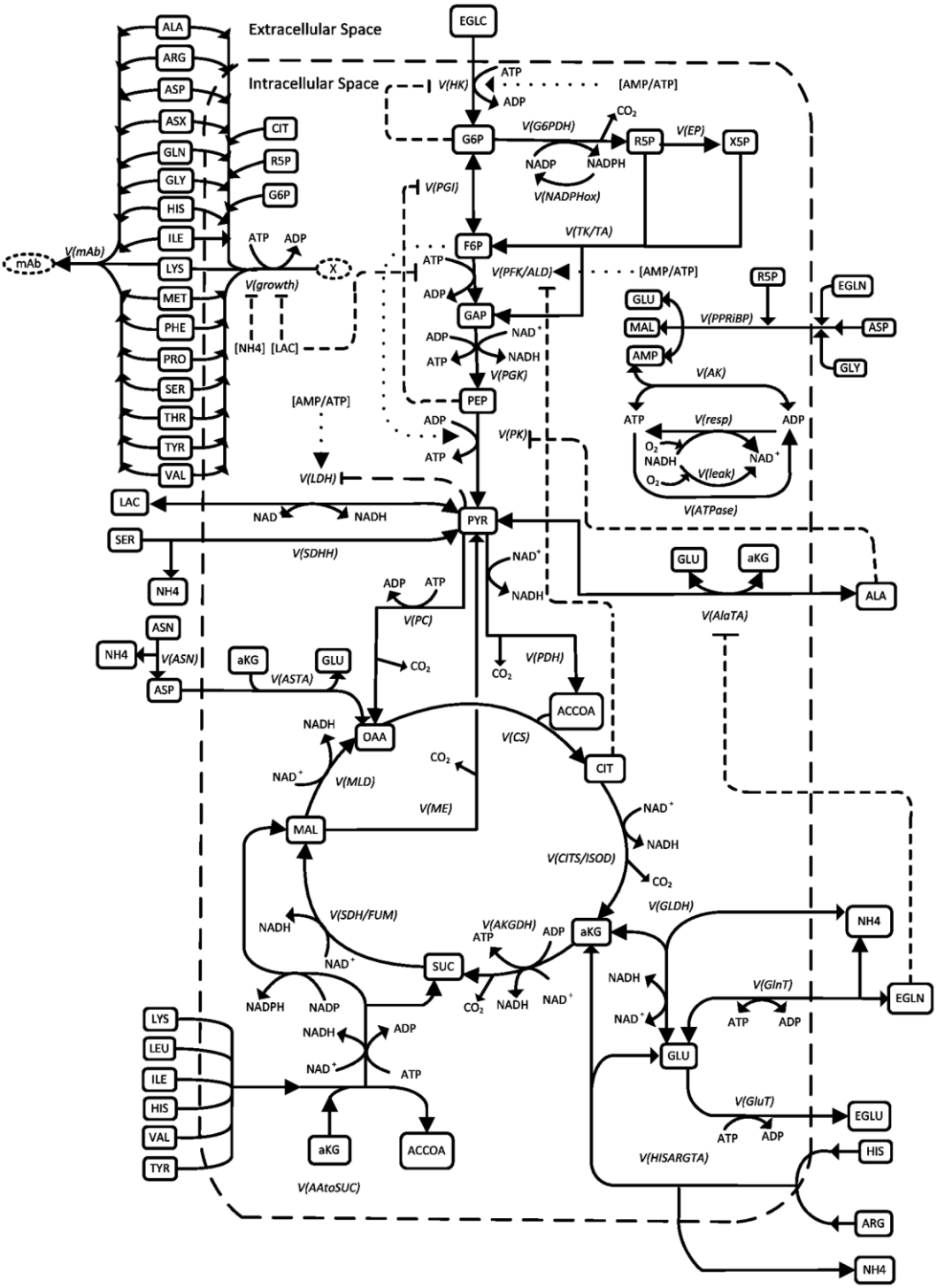

Figure 2.3. Schéma du réseau métabolique simplifié des cellules CHO. Les flèches désignent les réactions enzymatiques liant plusieurs métabolites. Les noms des réactions sont sous la forme V(nom de l'enzyme) et les abréviations sont les mêmes que celles données au début de ce mémoire (Robitaille et al., 2015)

2.1.2.3 Le pyruvate comme carrefour métabolique

Le métabolite à l'intersection des deux voies métaboliques qui nous intéressent est le pyruvate (PYR). Dans la démarche de contrôle métabolique qui est la nôtre, il apparaît comme une cible de choix. De multiples réactions de production et consommation de ce dernier existent tant dans le cytoplasme que dans la mitochondrie, rendant sa concentration dépendante de l'activité de nombreuses enzymes que nous allons lister ici.

La *pyruvate kinase* (PK) catalyse la réaction de production du pyruvate et d'ATP à partir du phosphoenolpyruvate (PEP) et d'ADP. Cette réaction a lieu au bout de la chaîne d'oxydation de la glycolyse, et peut agir comme un « entonnoir » : en bloquant la formation de pyruvate elle peut encourager la bifurcation du flux glycolytique vers la voie des pentoses phosphates (PPP) productrice de NADPH et de riboses utiles à la croissance (Gruning et al., 2011).

L'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs peut se faire soit en le convertissant en acétylcoenzyme A (AcCoA) via la *pyruvate déshydrogénase* (PDH), soit en le convertissant en oxaloacétate (OXA) via la *pyruvate carboxylase*. Ces deux métabolites sont aussi impliqués dans d'autres voies métaboliques : OXA peut participer à la néoglucogenèse ou à la production de nucléotides et AcCoA au métabolisme des acides aminés et à la synthèse des lipides (Gray, Tompkins, & Taylor, 2014). L'activité de la pyruvate carboxylase est négligeable lorsque la glutaminolyse est suffisamment active pour alimenter le cycle de Krebs (Bonarius et al., 2001; Quek, Dietmair, Kromer, & Nielsen, 2010). De plus, le caractère irréversible de la réaction catalysée par le complexe de la PDH en fait un candidat idéal pour jouer sur la régulation entre les différentes voies.

Le mécanisme de régulation principal de la PDH est la phosphorylation/déphosphorylation d'une sérine dans sa sous-unité E1 (Patel, Nemeria, Furey, & Jordan, 2014). L'enzyme catalysant la phosphorylation inactivatrice de la PDH fait partie des *phosphate déshydrogénase kinases* (PDHK, Figure 2.4).

Certaines réactions jouent sur la proportion relative des différents intermédiaires du cycle TCA avec le pyruvate. On peut citer les *enzymes maliques* (ME) qui catalysent des réactions qui permettent de faire sortir des intermédiaires du cycle comme le malate (MAL) et le reconvertir en pyruvate. Différentes formes de ME ont été identifiées, leur activité dépendant de NAD^+ ou $NADP^+$ selon si elles sont localisées à la mitochondrie ou dans le cytoplasme (Liu et al., 2016; Xiao, Wang, Handy, & Loscalzo, 2018). Une autre réaction d'arrêt de l'oxydation du pyruvate est opérée par

l'*alanine transaminase* : à partir de glutamate et de pyruvate, elle produit de l'alanine et de l'alpha-kétoglutarate. Ces réactions sont réversibles et permettent une régulation fine du cycle mais ne sont en général pas majoritaires du point de vue de l'analyse des flux métaboliques (Ahn & Antoniewicz, 2011; Dean & Reddy, 2013; Robitaille et al., 2015).

Enfin, le pyruvate peut être consommé par la *lactate déshydrogénase* (LDH) pour terminer prématurément l'oxydation du glucose et produire du lactate. Cette réaction est systématique lorsque la glycolyse a lieu mais elle est réversible. Nous le verrons plus tard, l'une des particularités des cellules CHO est de réassimiler le lactate sous certaines conditions.

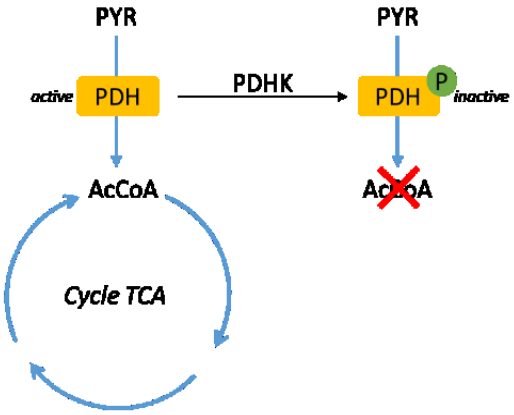

Figure 2.4. Mécanisme de régulation de l'activité du complexe pyruvate déshydrogénase (PDH) par la pyruvate déshydrogénase kinase (PDHK)

En conclusion, le pyruvate est un élément hautement régulé au carrefour entre les voies glycolytique et tricarboxylique. Même si, comme on l'a vu, le cycle de Krebs a d'autres points d'entrée et peut par exemple être alimenté par des acides aminés, la quantité de pyruvate et l'activité de la PDH sont des facteurs déterminants dans l'intensité des flux réactionnels du cycle TCA comme les flux en amont sur la voie de la glycolyse.

2.1.3 La glycolyse aérobie ou effet Warburg

Découverte par Otto Warburg en 1924 dans le cadre de ses recherches sur le métabolisme des cellules tumorale, la glycolyse aérobie est caractérisée par l'utilisation majoritaire de la voie glycolytique même en présence d'oxygène. Découverte sur quelques lignées cancéreuses, cette propension à favoriser la voie fermentative au détriment de la consommation d'oxygène par la respiration est ensuite étendue par Crabtree à un plus grand nombre de lignées (Crabtree, 1929).

Ce dernier découvre qu'un mécanisme équivalent existe chez la levure *S. cerevisiae*, modèle eucaryote unicellulaire. En présence de hautes concentrations en glucose, les levures favorisent la fermentation alcoolique, conduisant à la production d'éthanol (similairement au lactate chez les mammifères), mais font intervenir le même type de mécanisme que les cellules cancéreuses (De Deken, 1966). Comment expliquer ces comportements métaboliques anormaux ?

L'explosion des technologies génétiques à la fin du vingtième siècle a mis de côté pendant un temps l'étude de l'hypothèse métabolique dans le cadre du cancer. Ainsi, il ne fait pas partie des « hallmarks of cancer » établis par Hanahan et Weiberg en 2001. Il faut attendre leur actualisation en 2011 pour que le métabolisme anormal fasse son apparition avec la mention de « dérégulation énergétique ». Aujourd'hui, l'implication de l'effet Warburg dans le métabolisme du cancer en fait un sujet de recherche particulièrement étudié, même si les mécanismes de régulation par lesquels il survient sont encore mal compris.

L'activité respiratoire anormale est-elle une cause ou une conséquence du cancer ? Pour répondre à cette question, un premier modèle consiste à donner la *disruption de la mitochondrie* comme origine du cancer. Une phosphorylation oxydative défectueuse entraîne une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et produit des mutations au niveau des génomes mitochondrial et nucléaire. Cette instabilité génomique, à l'origine de la tumeur et de sa propagation, serait ensuite compensée par une utilisation prioritaire de la glycolyse, les cellules cancéreuses se servant moins de leur mitochondrie pour produire moins de ROS (S. Zhang et al., 2015). Cette hypothèse est difficilement généralisable à l'ensemble des tumeurs : toutes les cellules tumorales ne sont pas également glycolytiques *in vivo* (Viale, Corti, & Draetta, 2015). Plus encore, la plupart des cellules cancéreuses conservent une certaine capacité mitochondriale essentielle à leur survie – principalement via la production d'intermédiaires de voies anaboliques. Ainsi, il a été montré qu'une capacité minimale de phosphorylation oxydative par la protéine p32 est nécessaire à la survie des cellules tumorales, écartant la possibilité de défaut mitochondriaux graves (Fogal et al., 2010).

Une hypothèse plus souvent avancée est celle de l'*avantage prolifératif*. En produisant via la voie des PPP des intermédiaires nécessaires à la croissance et un niveau basal d'ATP, la voie de la glycolyse permet de soutenir une forte croissance. Il n'empêche que le cycle de Krebs demeure nécessaire alors que l'on observe que la plupart du carbone est converti en lactate (Lunt SY 2011).

Du point de vue du lactate, une hypothèse similaire est que le dégagement acide pourrait attaquer les cellules saines environnantes et favoriser le développement de la tumeur. Cependant, cela n'est pas un motif commun à tous les cancers, et l'on observe même un « reverse-Warburg » : les cellules tumorales comme les cellules CHO sont capables de réassimiler le lactate produit par les cellules environnantes (Lee & Yoon, 2015) constituant un réseau d'interactions complexes entre les cellules productrices et consommatrices de lactate.

À première vue, il n'existe donc pas de raison simple de se passer d'un mode de production d'énergie efficace. Pour les cellules de levure, on observe un effet Crabtree différent à court et à long terme. À court-terme, le transfert du pyruvate vers la mitochondrie est maintenu et c'est l'excès de pyruvate qui est dirigé vers la fermentation. À long-terme en revanche, la phosphorylation oxydative est dérégulée et la quasi-totalité du flux glycolytique est fermentée (Figure 2.5). Une explication possible est qu'énergétiquement, si la mitochondrie est saturée, elle ne suffit même plus à couvrir les dépenses en ATP que représentent les premières étapes de la glycolyse (2 ATP consommés par molécule de glucose convertie en fructose 1,6-biphosphate). L'intérêt énergétique de la cellule est alors de ne plus passer du tout par la mitochondrie mais d'avoir le flux glycolytique le plus important possible pour mettre à profit le bilan global de la glycolyse de 2 ATP produits par molécule de glucose (2 ATP consommés mais ensuite 4 ATP produits par conversion du fructose 1,6-biphosphate en 2 pyruvates) (de Alteriis, Carteni, Parascandola, Serpa, & Mazzoleni, 2018).

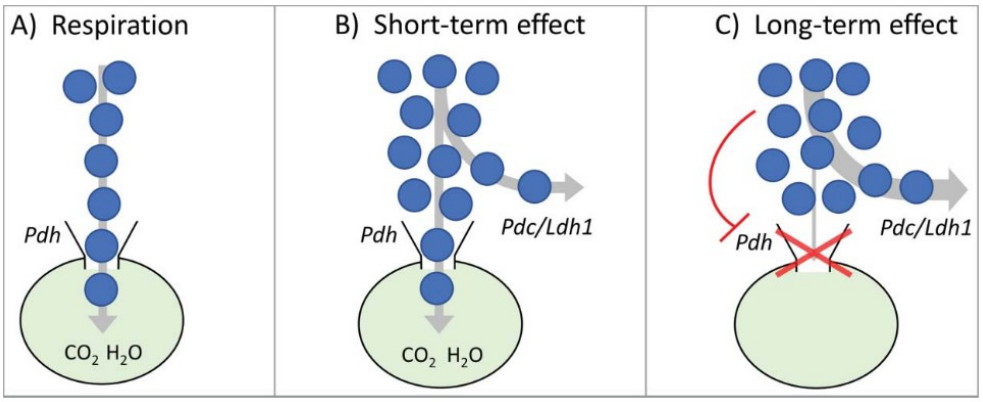

Figure 2.5. Le « goulot d'étranglement » mitochondrial : glycolyse aérobie observée à court et à long terme chez les cellules de mammifères et la levure. Pdc (pyruvate décarboxylase) est l'enzyme qui oriente le pyruvate vers la fermentation alcoolique chez *S. cerevisiae*. Tiré de (de Alteriis et al., 2018)

En définitive, les mécanismes à l'origine de l'effet Warburg sont complexes et demeurent non résolus. Pour autant, cet effet est observé dans de nombreuses lignées cellulaires allant des cellules cancéreuses aux levures, en passant par les cellules CHO auxquelles nous nous intéressons. La régulation métabolique sous effet Warburg favorise la voie de la glycolyse, particulièrement peu efficace énergétiquement mais semblant encourager une croissance rapide, au détriment de la voie mitochondriale. Jouer sur cette régulation semble donc être un moyen privilégié de provoquer des effets ciblés sur le métabolisme cellulaire.

Dans le cas de la production de protéines recombinantes comme les anticorps par les cellules CHO, les besoins en précurseurs des nucléotides produits par la glycolyse et la voie des PPP sont bas alors que la demande énergétique est élevée. En effet, les anticorps sont des molécules complexes et leur production est un processus cellulaire coûteux et les milieux de culture sont calibrés pour fournir à la cellule l'ensemble des acides aminés nécessaires à la formation des produits d'intérêt. Au-delà de leur synthèse, la production d'anticorps inclut des réactions de maturation comme la glycosylation de certains résidus qui sont à la fois gourmandes en énergie et cruciales pour la qualité du produit fini. L'utilisation préférentielle de la voie mitochondriale pour la production de l'ATP devrait en théorie optimiser l'usage des nutriments dans le milieu de culture. La cellule produirait ainsi plus d'énergie pour une même consommation de glucides et ne perdrait pas autant de ressources dans la croissance. Enfin, on devrait observer une production moindre de lactate : avec moins d'acidification du milieu, moins de signaux perturbateurs, on s'attend à améliorer la biosynthèse de la protéine d'intérêt.

Nous chercherons donc à lutter contre l'effet Warburg chez CHO afin de favoriser la voie respiratoire afin de promouvoir une gestion plus efficace d'énergie et une production accrue. Cette lignée étant, nous l'avons dit, très utilisée dans la recherche et dans l'industrie, de nombreux travaux ont été réalisés pour étudier ses particularités métaboliques. Nous allons à présent présenter ce que nous savons déjà du fonctionnement de notre lignée d'intérêt et de la régulation de leur métabolisme afin de trouver les cibles métaboliques que nous voudrons viser.

2.2 Le métabolisme des cellules CHO : un modèle d'étude bien connu

2.2.1 Une plateforme de production d'anticorps

On ne peut s'intéresser aux cellules CHO sans mentionner qu'elles font partie des modèles de production de protéines recombinantes le plus répandu dans l'industrie pharmaceutique, en particulier pour la production d'anticorps monoclonaux (mAb). De quarante-sept molécules en 2014 (Dawn M Ecker, 2014) à cent aujourd'hui (site officiel de la Food and Drugs Administration, https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/, consulté le 27 mai 2019), le nombre de mAb approuvés comme médicaments par la FDA est en augmentation constante et représente un marché de plusieurs dizaines voire centaines de milliards de dollars. Ils présentent un intérêt thérapeutique dans de nombreux domaines (vaccination, cancer, maladies auto-immunes, maladies génétiques, etc.) et leur production fait l'objet de recherches intensives (Santos, Quintilio, Manieri, Tsuruta, & Moro, 2018).

La méthode de production historique des anticorps est dite par immunisation : elle consiste à exposer de manière répétée un animal à un antigène donné, puis à récupérer les anticorps produits par son système immunitaire en réponse à l'exposition à l'antigène directement dans son sérum. Outre les préoccupations éthiques liées à ce mode de production, son principal inconvénient réside dans le fait que le produit est un cocktail de différents clones d'anticorps dont certains peuvent avoir une réactivité croisée avec d'autres antigènes. On parle dans ce cas d'*anticorps polyclonaux*.

Afin d'augmenter la spécificité et de mieux contrôler la réactivité des molécules produites, l'industrie pharmaceutique a besoin, entre autres, de bioprocédés hautement reproductibles. En 1975, une méthode développée par Georges Khöler et Cesar Milstein a permis de produire de grandes quantités d'anticorps issus d'un seul clone de lymphocyte B (Köhler & Milstein, 1975). Elle repose sur la fusion d'une cellule B sélectionnée dans le sérum d'une souris immunisée avec une cellule de myélome à la capacité de prolifération infinie. Il est possible de sélectionner un *hybridome* possédant à la fois les capacités de réplication infinies de la cellule cancéreuse et celles de production d'anticorps du lymphocyte B (Figure 2.6). Les cellules obtenues sont des clones qui produiront le même anticorps : on parle alors d'*anticorps monoclonal*.

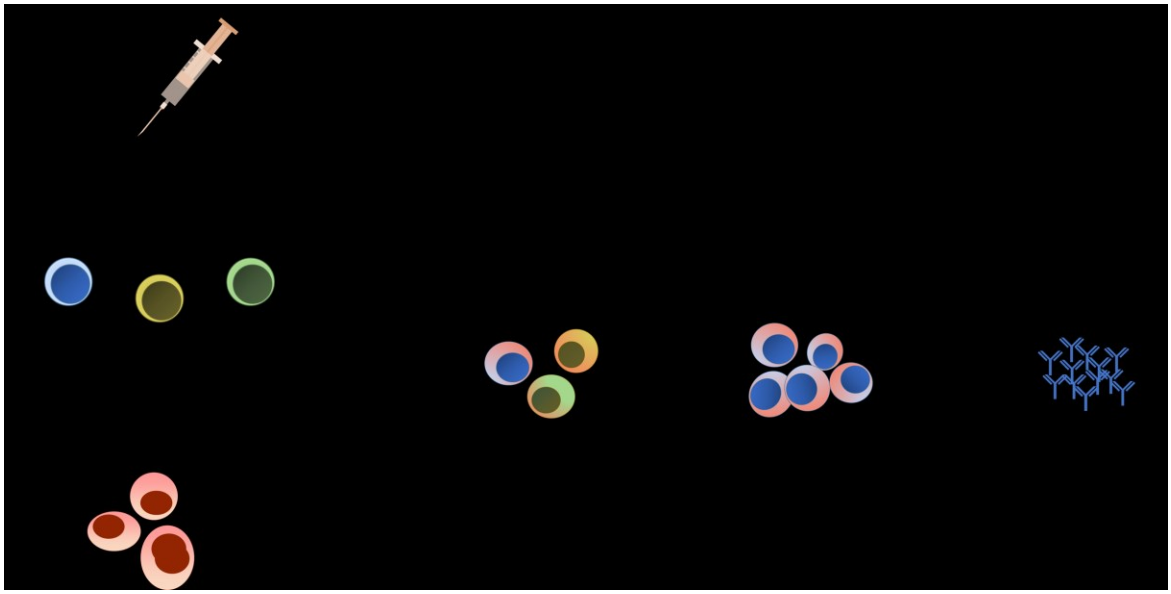

Figure 2.6. Méthode de production des anticorps monoclonaux par hybridomes

La productivité d'hybridomes fusionnant des cellules humaines et murines n'égalant que rarement celle des cellules recombinantes, une approche par génie génétique a été développée dans les années 1990 pour pouvoir produire des anticorps humains (Borth, Strutzenberger, Donalies, Kunert, & Katinger, 1996). Elle consiste à intégrer le gène de la protéine à produire dans le génome d'une lignée cellulaire hôte, qui se charge alors de la production. Le développement de méthodes de production standardisées a permis à cette méthode d'être largement favorisée industriellement (Ecker, Jones, & Levine, 2015) même si la production d'une molécule complexe comme un anticorps (environ 150 kDa pour un IgG, avec quatre chaînes peptidiques assemblées) présente de nombreux défis.

La lignée CHO-EG2-1A7 que nous étudions nous a été fournie par le Dr. Yves Durocher du Conseil national de recherches du Canada. Modèle des cellules transformées utilisées dans l'industrie pharmaceutique, elle produit l'anticorps EG2-hFc, dit *chimérique*. Il s'agit de l'association par génie génétique de deux fragments issus d'espèces distinctes. EG2 est un fragment d'anticorps de lama contenant la partie variable de l'anticorps qui reconnaît et se fixe sur sa cible. Dans notre cas il s'agit du récepteur de facteur de croissance EGFR, cible thérapeutique privilégiée pour certains types de cancer. Pour lui donner une meilleure stabilité dans le sérum humain lorsqu'utilisé comme drogue contre le cancer et permettre sa reconnaissance par le système immunitaire humain, il est couplé à un fragment de la partie constante des anticorps IgG humains (hFc). L'intérêt d'une telle

construction chimérique est que l'anticorps obtenu est à la fois plus léger qu'une molécule d'immunoglobuline complète de type IgG, et elle peut reconnaître son antigène et rester stable après injection (Bell et al., 2010). Cette séquence a été introduite dans la lignée CHO DXB-11 par l'équipe du Dr. Yves Durocher, et un pool des clones les plus productifs (clones 1 à 7) a été sélectionné (Agrawal et al., 2012; Toussaint, Henry, & Durocher, 2016).

Ce modèle a plusieurs avantages. D'une part il est fidèle à la réalité de l'industrie pharmaceutique car il a été développé selon ses standards. D'autre part, nous disposons d'une certaine connaissance du métabolisme « normal » de ces cellules grâce aux expériences déjà réalisées dans notre laboratoire. Leur mode de fonctionnement a été décrit comme stable au cours de la phase exponentielle (Robitaille et al., 2015). Les mêmes expériences ont abouti à une productivité plutôt bonne, avec une concentration finale en anticorps de quelques dizaines de mg/L lors de simples cultures en mode cuvée. En somme, le choix de cette lignée nous permettra de transposer les connaissances acquises à des plateformes CHO utilisées dans le milieu industriel. Les stratégies déployées pour augmenter la productivité des cultures industrielles sont nombreuses : optimisation de l'alimentation, améliorations des infrastructures, génie génétique… Nous nous intéresserons à celles dites d'ingénierie métabolique, qui utilisent le métabolisme cellulaire comme levier pour augmenter la production.

2.2.2 Approches métaboliques d'optimisation de culture des lignées CHO

2.2.2.1 Le métabolisme central du carbone, une cible pour moduler la productivité

Le grand nombre d'études réalisées sur de nombreuses lignées CHO montre à quel point sont regroupées sous ce nom des lignées diverses. La publication du génome complet et annoté de la lignée CHO-K1 en 2011(Xu et al., 2011) est le point de départ qui a permis depuis lors de collecter à grande échelle des données génomiques, transcriptomiques, protéomiques, métabolomiques, ... Un effort d'intégration de ces données est depuis peu entrepris pour faire ressortir des tendances générales de cette abondance d'études (Stolfa et al., 2018) et promouvoir une approche intégrée entre développement des lignées, études en laboratoire et mise en place des procédés.

Du point de vue métabolique, le consensus est réel lorsqu'il s'agit de montrer une forte activité glycolytique, tout particulièrement en phase de croissance (Ahn & Antoniewicz, 2011; Chong et al., 2012; Robitaille et al., 2015). Au-delà de ce constat, la plupart des études s'intéressent aux facteurs influençant la production de protéines recombinantes dans le but d'optimiser les procédés de production. Afin de résumer les très nombreuses pistes évoquées en ce sens, nous regroupons au Tableau 2.1 une série de facteurs métaboliques proposés comme déterminants pour la biosynthèse de protéines recombinantes dans la littérature récente.

Ces résultats sont issus de méthodes variées, mêlant expérimentation et modélisation, sélection et comparaison de lignées à haute ou basse productivité, et implémentation de stratégies de cultures optimisées. Pourtant, il est frappant de constater que presque tous les facteurs proposés comme déterminants participent au métabolisme central du carbone, que ce soit dans le sens d'une glycolyse et fermentation réduite (consommation de glucose, production de lactate) ou d'une activité mitochondriale accrue (voies anaplérotiques augmentées, capacité d'oxydation).

Pour mettre à profit cette spécificité métabolique des cellules CHO et gagner en efficacité de production, les principales stratégies adoptées sont la modification génétique pour reprogrammer leur métabolisme ou la mise en place de bioprocédés optimisés, avec des stratégies d'alimentation et des milieux de culture parfaitement adaptés aux besoins des lignées ou l'addition de suppléments augmentant le rendement (Kelly, Alarcon Miguez, Alves, & Barron, 2018; Pereira, Kildegaard, & Andersen, 2018). Nous présentons ici des cas représentatifs des nombreux essais effectués en ce sens et discutons des limites de ces deux approches.

Tableau 2.1. Effets métaboliques considérés comme déterminants pour la production d'anticorps ou d'autres protéines recombinantes dans la littérature

Principal facteur favorisant la biosynthèse de protéines recombinantes	**Références**
Disponibilité des acides aminés essentiels dans le milieu	(Fan et al., 2015; Kishishita et al., 2015)
Réduction de la synthèse du lactate (ou ré-assimilation du lactate)	(Dean & Reddy, 2013; Gagnon et al., 2011; Hartley et al., 2018; Toussaint, Henry, & Durocher, 2016; Zagari, Jordan, Stettler, Broly, & Wurm, 2013; Zalai et al., 2015)
Réduction de la synthèse d'ammonium	(Altamirano, Paredes, Cairo, & Godia, 2000; Ozturk & Palsson, 1991)
Sur-alimentation du cycle TCA par la glutamine	(Dean & Reddy, 2013; Popp et al., 2016)
Sur-alimentation du cycle TCA par le pyruvate	(Buchsteiner, Quek, Gray, & Nielsen, 2018; Dean & Reddy, 2013; Ghorbaniaghdam, Henry, & Jolicoeur, 2014)
Activité des enzymes du cycle TCA	(Chong et al., 2010)
Capacité mitochondriale de phosphorylation oxydative pendant la phase de production	(Ahn & Antoniewicz, 2011; Chong et al., 2012; Fernandez-Martell, Johari, & James, 2018; Templeton, Dean, Reddy, & Young, 2013; Zagari et al., 2013)
Régulation du statut d'oxydoréduction	(Ahn & Antoniewicz, 2011; Chong et al., 2012; Handlogten et al., 2018; Orellana et al., 2015)

2.2.2.2 Stratégies génétiques de modulation du métabolisme

Avec des technologies génétiques de plus en plus performantes (CRISPR/Cas9, ARN courts interférents, …) et un génome décrypté en détails (Hefzi et al., 2016; Xu et al., 2011), le génie génétique est une approche très populaire d'optimisation des bioprocédés basés sur les cellules CHO. Outre la manipulation génétique des voies métaboliques qui nous intéresse ici, l'amélioration de la glycosylation des protéines, la résistance à l'apoptose ou l'augmentation artificielle des niveaux d'expression sont autant de stratégies qui ont été employées sur des lignées CHO (Fischer, Handrick, & Otte, 2015; J. Y. Kim, Kim, & Lee, 2012).

Il ne faut pas oublier que la première étape d'optimisation génétique effectuée pour toute lignée CHO recombinante est la sélection de clones démontrant des capacités de production et/ou de croissance les plus élevées, ou selon les critères définis. Outre les méthodes traditionnelles par comptage ou titrage du produit, des indicateurs métaboliques peuvent être utilisés. Par exemple, un faible potentiel membranaire mitochondrial (mesuré par cytométrie de flux) a été proposé comme biomarqueur d'une consommation de glucose moindre, associée à moins de lactate produit et une meilleure productivité (Hinterkörner et al., 2007). De la même manière, Popp et al. (2016) proposent un ensemble de biomarqueurs métaboliques, principalement basés sur les taux de consommation et les flux intracellulaires des acides aminés, pour réaliser un criblage plus fiable des lignées hautement productrices. Ils obtiennent une bonne prédictibilité pour la productivité des clones testés au prix d'analyses métaboliques intracellulaires très coûteuses, peu réalistes pour le développement systématique de bioprocédés (Popp et al., 2016).

Concernant la régulation du métabolisme par génie génétique, de nombreuses études se sont penchées sur la réduction des déchets métaboliques (i.e. perte de ressources). Les principaux sont, nous l'avons vu, le lactate issu de la glycolyse et l'ammonium issu de la glutaminolyse, connus pour leurs effets négatifs sur la croissance cellulaire et la production (Glacken, Fleischaker, & Sinskey, 1986; Lao & Toth, 1997; Ozturk & Palsson, 1991). Une première option pour ce faire est de réguler les entrées et sorties des principales voies métaboliques concernées. On peut par exemple modifier les transporteurs membranaires responsables de l'approvisionnement en carbohydrates. Une approche consistant à surexprimer le transporteur de fructose GLUT5 plutôt que des transporteurs de glucose comme GLUT1 a ainsi permis de recalibrer l'apport en sucre sur la demande cellulaire et de limiter la production de lactate en culture (H. Le et al., 2013; Wlaschin &

Hu, 2007). D'autres chercheurs ont au contraire tenté de bloquer la sortie de lactate en diminuant les niveaux d'expression de la LDH grâce à des ARN courts interférents. Cependant les effets mesurés apparaissent comme dépendants des clones et n'influent que marginalement sur la production (S. H. Kim & Lee, 2007).

Une deuxième option pour orienter le métabolisme vers une utilisation plus efficace des ressources est de favoriser le fonctionnement du cycle TCA. Ainsi, il a été proposé de surexprimer la malate déshydrogénase (MDH), considérée comme étape limitante du cycle (Chong et al., 2010). Si les rendements en ATP, NADH et en cellules obtenus sont augmentés en parallèle d'une diminution de la production de lactate et de malate, aucun résultat n'est présenté pour la production par Chong et al. Toujours pour augmenter les flux métaboliques mitochondriaux, plusieurs études ont exprimé chez CHO l'enzyme PYC2, pyruvate carboxylase cytoplasmique de levure (Fogolin, Wagner, Etcheverrigaray, & Kratje, 2004; Gupta et al., 2017; Toussaint et al., 2016). La pyruvate carboxylate transforme le pyruvate cytoplasmique en malate et transporte ce dernier vers la mitochondrie pour prendre part au cycle TCA. Cette stratégie donne lieu à des résultats probants : Fogolin et al. doublent la production de leur protéine d'intérêt rhGM-CSF ; Gupta et al. obtiennent 70 % d'augmentation de l'expression de leur anticorps monoclonal, une diminution du lactate sécrété et une augmentation de la qualité du produit final ; pour Toussaint et al., la viabilité augmente, tout comme la densité cellulaire maximale, et la production finale est accrue de 20 %. Des stratégies similaires ont été décrites pour diminuer la production d'ammonium en jouant sur l'expression d'enzymes du cycle de l'urée (Park, Kim, Kim, Kim, & Kim, 2000) ou sur les transporteurs permettant d'internaliser les acides aminés (Tabuchi & Sugiyama, 2013; Tabuchi, Sugiyama, Tanaka, & Tainaka, 2010).

Cependant, en reproduisant trois des stratégies les plus étudiées à l'identique sur différentes lignées, Wilkens et Gerdtzen trouvent des résultats contrastés : si l'expression de GLUT5 conduit à une viabilité accrue, la productivité spécifique reste inchangée, PYC2 augmente bien la croissance mais diminue la production, MDH diminue à la fois la croissance et la production (Wilkens & Gerdtzen, 2015). Ils proposent une hypothèse de déséquilibre redox pour expliquer que, dans certains cas, la modification du métabolisme ne se traduit pas par l'augmentation attendue de productivité. Une telle étude, basée sur la répétition de manipulations déjà publiées, fournit des informations précieuses quant à la reproductibilité des méthodes génétiques. Elle démontre que, si des résultats encourageants ont été obtenus sur certaines lignées, ce type de méthodes est

difficilement reproductible, dépend de la lignée, est sensible à l'instabilité génétique et doit faire appel à un processus de développement long et dispendieux.

Le métabolisme est la science des échanges entre la cellule et son environnement. Plutôt que de vouloir changer le programme génétique des cellules pour modifier leur mode de fonctionnement, on peut appliquer le raisonnement inverse et tenter d'améliorer l'énergétique des cellules en jouant sur l'environnement dans lesquelles on les cultive. On voudrait pouvoir atteindre le même but, soit moduler le métabolisme vers une utilisation plus efficiente des ressources, en partant d'une lignée déjà développée et approuvée par les organismes de régulation.

2.2.2.3 Optimisation des bioprocédés

L'optimisation du milieu de culture et du procédé de culture est la stratégie à la base de toute culture commercialement rentable. La mise en place de cuvées alimentées et de procédés par perfusion, avec des ajouts et/ou des retraits dans le milieu de culture a permis à l'industrie biopharmaceutique de cultiver les cellules de mammifères à très hautes densités et d'atteindre des titres supérieurs à 10 g/L (Huang et al., 2010).

A partir de la connaissance du métabolisme des cellules CHO, de nombreux essais ont été réalisés portant sur des modifications du milieu de culture et de la composition ou de la fréquence d'alimentation. La plupart utilisent une fois de plus comme critère la diminution des déchets toxiques, principalement le lactate et l'ammonium, pour améliorer les performances de culture. Ce type de stratégies est appliqué depuis des décennies sur des lignées de cellules de mammifères incluant CHO, dont Freund et Croughan proposent une revue générale (Freund & Croughan, 2018). On peut les regrouper en quatre principes généraux :

- *Le remplacement des sources de carbones principales* (glucose et/ou glutamine) par des sources alternatives conduisant à la formation de moins de déchets. Citons ici le remplacement du glucose par d'autres sucres comme le galactose (Altamirano, Cairo, & Godia, 2001), de la glutamine par le glutamate, l'asparagine ou d'autres acides aminées (D. Y. Kim et al., 2013; Kuwae, Ohda, Tamashima, Miki, & Kobayashi, 2005) ou les deux à la fois (Altamirano et al., 2000). Ces stratégies évitent bien l'accumulation des déchets toxiques mais parfois au prix de la croissance (Altamirano et al., 2000; Duval, Demangel, Miossec, & Geahel, 1992).

- *La mise en place de procédés avec boucles de rétroaction* pour maintenir des concentrations basses en glucose et/ou glutamine et prévenir l'accumulation de déchets par excès de substrat. L'alimentation est alors déclenchée pour maintenir un niveau non nul mais faible en substrat, soit en mesurant directement la concentration en glucose ou glutamine (Glacken et al., 1986; Hayter et al., 1993), soit en utilisant le lien entre consommation de glucose et pH via l'acide lactique (Gagnon et al., 2011). Cependant, des doutes ont été mis au jour concernant la qualité des protéines recombinantes produites avec de tels procédés : la privation en sucres nuirait à la qualité des produits en diminuant le taux de glycosylation des protéines (Fan et al., 2015; Villacrés, Tayi, Lattová, Perreault, & Butler, 2015).
- *La formulation d'un milieu et d'un feed (alimentation) optimaux :* en se basant sur la connaissance de la stoéchiométrie du métabolisme, des formulations optimales peuvent être mises au point pour une lignée donnée. Par exemple, Kishishita proposent par analyse métabolique que trois acides aminés sont essentiels pour la production de mAb par leur lignée CHO : la sérine, la cystéine et la tyrosine. Ils mettent ainsi en place une stratégie d'alimentation en ces trois acides aminés, tout en veillant à ce que les ajouts ne soient pas en excès et ne provoquent pas l'accumulation de lactate (Kishishita et al., 2015). Cependant, ce type de méthodes repose sur une formulation par essai-erreur et met en jeu des processus d'optimisation longs et spécifiques à chaque lignée (Fan et al., 2015), ainsi que les besoins peuvent évoluer avec l'état physiologique des cellules en cours de culture. Enfin, la plupart des études de ce type sont effectuées pour des fins de développement de milieux commerciaux mais ne donnent pas accès à la combinaison précise des milieux ainsi optimisés (Handlogten et al., 2018; Huang et al., 2010; Ma et al., 2009; Zalai et al., 2015), limitant leur portée scientifique.
- *Le contrôle d'autres paramètres de culture* comme la température ou le pH. En réduisant la température, on met artificiellement fin à la phase de croissance et on permet une transition métabolique vers la production (Bollati-Fogolin et al., 2005). Durant la période à basse température, l'activité cellulaire est globalement diminuée, en particulier la respiration est atténuée, mais moins de ressources sont consommées par la croissance et on obtient dans les faits une augmentation de la productivité globale. Cet effet peut être combiné à un contrôle précis du pH pour gagner encore en productivité (S. K. Yoon, Choi, Song, & Lee, 2005). Le pH est contrôlé dans la plupart des procédés industriels, et la

diminution en température est aussi employée couramment, principalement afin de laisser le temps aux processus de glycosylation de s'opérer correctement. L'avantage majeur de ces techniques est qu'elles sont facilement combinées à tout procédé.

Ces techniques fréquemment employées présentent, nous l'avons dit, un inconvénient majeur. Elles nécessitent de longues phases de recherche et développement spécifiques à chaque lignée et chaque milieu basal, menant à complexifier le procédé et à en augmenter le coût. Ainsi, elles sont peu généralisables en dehors de leur plateforme de production d'origine et doivent montrer des gains importants en productivité pour justifier un tel investissement en temps et en argent.

2.2.2.4 La supplémentation en additifs simples

Partant des inconvénients mentionnés pour les méthodes génétiques et d'optimisation des procédés, on constate qu'une méthode idéale devrait avoir deux caractéristiques majeures : être simple à mettre en place dans tout type de procédé (cuvée, cuvée alimentée, perfusion et chemostat, à petite ou grande échelle) et être facilement adaptable à toute lignée cellulaire. Les enzymes du métabolisme central du carbone sont globalement conservées à travers des lignées, c'est leur expression et la modulation de leur activité respective qui expliquent les différences observées inter-lignées (Young, 2013). La supplémentation du milieu avec des molécules effectrices qui interfèreraient avec ces enzymes clés apparaît donc comme une alternative séduisante.

Plusieurs études ont proposé d'ajouter de petites molécules au milieu pour augmenter la productivité des CHO en culture. Le Tableau 2.2 recense les principales molécules testées ainsi que leurs effets notables sur les phénotypes de production et de croissance. Toutes ces molécules n'agissent pas forcément sur le métabolisme, mais sur des mécanismes cellulaires conservés parmi les lignées mammifères. Au mieux de notre connaissance, aucun autre candidat agissant spécifiquement sur le métabolisme n'a pour l'instant été essayé sur des lignées CHO.

Tableau 2.2 Liste et effet d'additifs testés sur CHO pour augmenter la production

Additif	Effets *Mécanisme proposé*	Références
Butyrate ou dérivés	Augmentation de la productivité spécifique, inhibition de la croissance (parfois baisse de qualité du produit) *Activateur de transcription*	(McMurray-Beaulieu, Hisiger, Durand, Perrier, & Jolicoeur, 2009; Mimura et al., 2001; Oh, Vig, Chua, Teo, & Yap, 1993; Palermo, DeGraaf, Marotti, Rehberg, & Post, 1991; Rodriguez, Spearman, Huzel, & Butler, 2005; Sung, Song, Lim, Chung, & Lee, 2004; Yin et al., 2018)
Propionate	Augmentation de la productivité spécifique et du titre final, inhibition de la croissance *Activateur de transcription*	(Chun, Park, Chung, & Bang, 2003; Sung Kwan Yoon & Ahn, 2007)
Diméthylsulfoxide	Augmentation de la productivité spécifique, arrêt de la croissance *Chaperone protéique*	(Liu & Chen, 2007b; Liu, Chu, & Hwang, 2001; Rodriguez et al., 2005)
Glycérol	Réduction de l'agrégation du produit, inhibition de la croissance *Chaperone protéique*	(Liu & Chen, 2007a; Rodriguez et al., 2005)
Cuivre	Augmentation du taux de production spécifique et du titre final, effet peu clair sur la qualité *Cofacteur mitochondrial*	(Kaschak et al., 2011; Luo, Zhang, et al., 2012; Qian et al., 2011; Yuk et al., 2015; Yuk et al., 2014)
Dichloroacétate	Augmentation de la viabilité et du titre final (voir section 2.3.3) *Activateur de la PDH*	(Buchsteiner et al., 2018)

À titre d'exemple et parce qu'il a été une des toutes premières stratégies proposées et qu'il a été largement étudié pour son impact sur le métabolisme, nous détaillerons les études réalisées sur l'ajout d'ions cuivre. Cofacteur indispensable à plusieurs enzymes mitochondriales, le cuivre est requis à de nombreuses voies métaboliques par échanges oxydoréductifs mais peut pour cette même raison devenir un poison (i.e. un inhibiteur) via la génération excessive de ROS (Arigony et al., 2013; Gaetke & Chow, 2003). Bien qu'essentiel, sa concentration dans les milieux commerciaux n'est pas toujours contrôlée (Arigony et al., 2013).

Un ensemble cohérent d'articles montre qu'en supplémentant de manière accrue le milieu en cuivre tout au long de la culture, une ré-assimilation du lactate et une augmentation du titre final en anticorps peuvent être obtenues (Luo, Vijayasankaran, et al., 2012; Qian et al., 2011; Yuk et al., 2015). L'augmentation du titre final n'est pour autant pas proportionnelle à la quantité de cuivre disponible. Au contraire, il existe une concentration minimale en cuivre nécessaire à la capacité d'assimilation du lactate et au-delà de laquelle les améliorations sont marginales. Elle varie selon les lignées mais demeure autour de 10-100 nM, soit en-dessous des concentrations toxiques connues (Yuk et al., 2015).

Du point de vue mécanistique, l'hypothèse avancée est celle d'une interaction directe avec les enzymes de la mitochondrie. De fait, la régulation se fait de manière post-transcriptionnelle et agit sur le métabolisme oxydatif (Qian et al., 2011; Yuk et al., 2014). Le cuivre étant cofacteur de la cytochrome c oxydase (Ishida, Andreux, Poitry-Yamate, Auwerx, & Hanahan, 2013), sa présence semble nécessaire à l'activité mitochondriale et à son équilibre redox. Ces résultats sont confirmés par une analyse des flux métaboliques qui a démontré une réduction des flux dans le cycle TCA et une stimulation de la glycolyse pour une culture déficiente en cuivre par rapport à son contrôle non déficient (Nargund, Qiu, & Goudar, 2015).

L'inconvénient majeur de cette méthode est que la présence de cuivre en abondance dans le milieu peut perturber les mécanismes de maturation des protéines produites. Des disparités ont été mesurées parmi les variants de mAbs produits suite à l'ajout de cuivre : niveaux inférieurs de thiols libres (Chaderjian, Chin, Harris, & Etcheverry, 2005), amidation par proline de l'extrémité C-terminale (Kaschak et al., 2011) ou surabondance de variants de type C-lysine (Luo, Zhang, et al., 2012). Cette forte variabilité des profils est encore mal comprise et peut dépendre de la lignée et du produit formé (Yuk et al., 2015).

En conclusion, le cuivre est un exemple de supplément aidant à la ré-assimilation du lactate qui nous intéresse dans le cadre de la diminution de l'effet Warburg. Il a particulièrement attiré notre attention car c'est l'une des rares stratégies de modulation du métabolisme par supplémentation du milieu de culture avec une molécule simple dont l'effet a été relié à la balance entre glycolyse et respiration. Cependant, les effets du cuivre sur le métabolisme ne sont pas bien élucidés et deux inconvénients limitent son usage : il est potentiellement toxique et a un effet mal connu sur la maturation des protéines recombinantes.

Si des stratégies de supplémentation du milieu par des molécules simples existent, elles demeurent minoritaires. Le peu de candidats retenus jusqu'à présent n'est pas utilisé en routine dans l'industrie, au mieux de notre connaissance, du fait de leurs inconvénients en termes de croissance ou de qualité des produits finaux. Afin d'identifier de nouvelles molécules candidates capables de moduler le métabolisme des cellules CHO productrices d'anticorps de manière contrôlée, nous nous sommes inspirés d'un domaine adjacent. Dans le milieu de la santé, il existe des drogues simples que l'on emploie dans le but de modifier le comportement métabolique des cellules malades ou saines. On parle alors de thérapie métabolique. C'est le cas du dichloroacétate récemment testé sur des cultures de cellules CHO (Buchsteiner et al., 2018) et utilisé depuis plusieurs années dans le cadre clinique pour diminuer la concentration sanguine de lactate chez les patients atteints d'acidose lactique congénitale (Stacpoole, Lorenz, Thomas, & Harman, 1988).

Un élément clé peut nous aider à identifier de nouvelles stratégies : les cellules CHO sont métaboliquement similaires aux cellules cancéreuses, largement étudiées dans le cadre des thérapies métaboliques. Nous proposons ici un résumé des principales voies de régulation de l'effet Warburg connues chez les cellules cancéreuses et transposables aux cellules CHO. Cet état de l'art nous instruira sur des leviers moléculaires à notre disposition et nous aidera à choisir des cibles adéquates dans notre démarche d'application de thérapies métaboliques aux cellules CHO.

2.2.3 Un métabolisme similaire aux cellules cancéreuses

Le cancer est une maladie reliée à la prolifération cellulaire non contrôlée. Parmi les caractéristiques de base des cellules cancéreuses, on trouve évidemment une croissance illimitée. Du point de vue métabolique, il faut soutenir la demande énergétique et les besoins en matériaux, briques précurseurs élémentaires nécessaires à une prolifération soutenue. On parle alors de reprogrammation métabolique des tumeurs (da Veiga Moreira et al., 2019; DeBerardinis &

Chandel, 2016). Ces deux caractéristiques sont retrouvées, et nous allons le détailler dans cette section, chez la lignée que nous avons choisie pour notre étude.

Les lignées de cellules d'ovaires de hamster chinois font partie d'une large classe de lignées cellulaires appelées lignées immortalisées. Elles sont définies comme des cellules qui prolifèrent indéfiniment, qu'il s'agisse de lignées tumorales ou de lignées modifiées génétiquement, et peuvent donc être utilisées et étudiées pendant de nombreuses générations (Carter & Shieh, 2015). D'abord isolée par Theodore T. Puck en 1957 (Puck, Cieciura, & Robinson, 1958), la lignée CHO a depuis été modifiée à de nombreuses reprises mais conserve sa caractéristique principale : celle d'une croissance illimitée et stable en culture, comparable aux lignées tumorales.

De tels taux de croissance soutenus reposent sur des altérations majeures de l'ensemble des voies métaboliques. Nous l'avons vu chez CHO, l'augmentation de la part de glycolyse est l'une des caractéristiques principales de cette régulation, confirmée dans la plupart des lignées. Si les détails des mécanismes en jeux sont moins étudiés chez les lignées CHO que chez les cellules tumorales, de nombreux indices montrent des similarités entre les deux modèles.

L'adaptation métabolique des cellules cancéreuses repose sur trois axes principaux : une génération rapide d'ATP pour soutenir la demande énergétique liée à une croissance rapide, une synthèse augmentée des macromolécules biologiques et une régulation accrue de leur statut redox (Cairns, Harris, & Mak, 2011). Les signaux moléculaires qui mènent à ces modifications sont générés par des oncogènes : il s'agit de gènes présents naturellement dans les cellules mais dont la dérégulation contribuera au développement des tumeurs. En particulier, la voie PI3K-AKT-mTOR est une voie très fréquemment mutée parmi les lignées tumorales (Y. Zhang et al., 2017). Elle joue un rôle crucial pour réguler la croissance, la prolifération, l'apoptose, et la survie cellulaire : c'est par ces fonctions que les gènes PI3K, AKT et mTOR ont d'abord été décrits comme oncogènes. Il a depuis été montré qu'ils participent aussi directement à la régulation métabolique des tumeurs. Parmi leurs cibles, on trouve de nombreuses enzymes de la glycolyse régulées positivement (Figure 2.7). L'activation de cette voie métabolique va ainsi directement augmenter la glycolyse, mais aussi activer le facteur de transcription HIF (Hypoxia Inducible Factor) normalement uniquement actif en conditions d'hypoxie. La cellule répondra ainsi en privilégiant la voie fermentative malgré la présence d'oxygène.

L'étude réalisée en 2014 par Edros, McDonnel et Al-Rubeai montre que les mêmes voies de signalisation moléculaire sont déterminantes pour les capacités de prolifération et de survie des cellules CHO. Plus encore, elle établit une corrélation forte entre le niveau d'activation de la voie mTOR et la productivité spécifique observée chez six lignées transformées pour produire des anticorps monoclonaux (Edros, McDonnell, & Al-Rubeai, 2014). D'autres études génomiques montrent des liens similaires entre des modifications des niveaux d'expression de gènes liés à l'apoptose et la productivité observée chez différentes lignées CHO (Lewis et al., 2013).

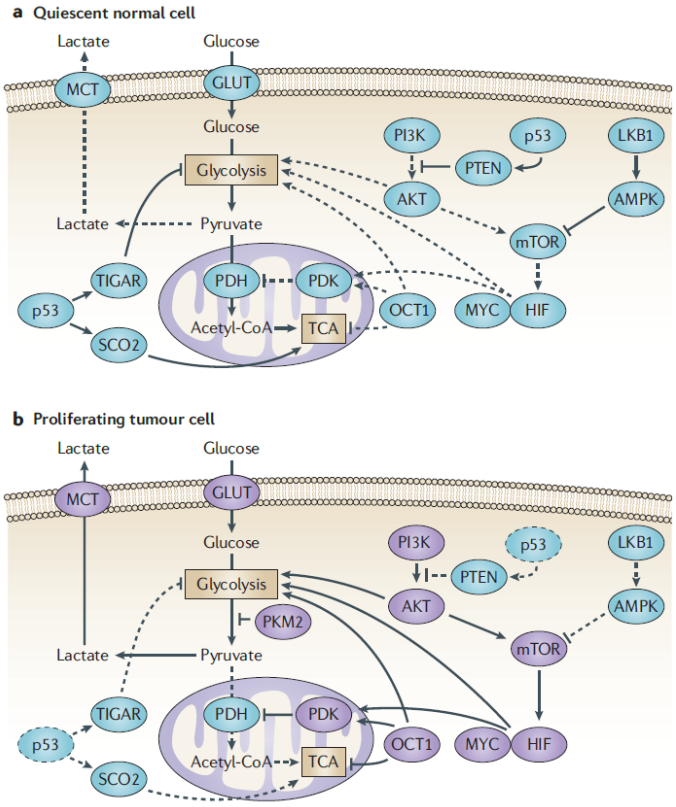

Figure 2.7. Mécanismes moléculaires de la régulation métabolique des cellules tumorales. Les enzymes et facteurs de croissance en violet sont ceux sur-régulés ou activées dans le profil typique d'une cellule cancéreuse. Tiré de (Cairns et al., 2011)

Toujours chez les cellules cancéreuses, la voie mitochondriale demeure essentielle à la survie des cellules. Pour maintenir, malgré l'hyperactivation de la glycolyse, un fonctionnement minimal du cycle TCA dont les intermédiaires jouent un rôle clé dans la synthèse des lipides et des nucléotides, plusieurs voies anaplérotiques sont activées. On cite en particulier la glutaminolyse qui transforme

la glutamine en glutamate puis en α-cétoglutarate (α-KT) pour alimenter le cycle TCA. Elle est fortement sollicitée dans de nombreuses lignées cancéreuses, au point de faire de l'alimentation en glutamine une potentielle cible thérapeutique pour empêcher la croissance des cellules tumorales (Jin, Alesi, & Kang, 2016; Q. Wang et al., 2014). Ce n'est donc pas un hasard si la plupart des milieux chimiquement définis utilisés chez CHO sont supplémentés par de fortes concentrations en glutamine, de 2 à 6 mM en général (Landauer, 2014) contre 0,6 mM dans le sang (Wilmore & Shabert, 1998). Ce choix empirique connu depuis les années soixante (Eagle, Oyama, Levy, Horton, & Fleischman, 1956) est aujourd'hui justifié par le suivi de marqueurs isotopiques qui montrent que, particulièrement en phase de croissance, les cellules CHO s'appuient majoritairement sur la glutamine pour alimenter le cycle TCA car la plupart du flux glycolytique est transformé en lactate (Ahn & Antoniewicz, 2011, 2013).

Enfin, un nombre croissant d'études réalisées dans le domaine de l'oncologie révèlent l'importance de la régulation redox pour la survie des cellules au profil métabolique perturbé que sont les cellules cancéreuses. Longtemps considérées comme des molécules purement dévastatrices, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) causent en effet des dommages à l'ADN, l'ARN et aux protéines à hautes concentrations. Pourtant, on constate qu'à des niveaux plus faibles elles constituent de véritables signaux cellulaires. Ainsi, les cellules cancéreuses montrent une production accrue de ROS dans la mitochondrie et le cytosol. Cette augmentation est liée encore une fois à l'activation des voies PI3K et HIF (Diebold & Chandel, 2016) et elle soutient la prolifération et le développement de métastases (Porporato et al., 2014; Weinberg et al., 2010). Les niveaux élevés de ROS présentent, nous l'avons dit, un danger immédiat : à la fois activatrices et destructrices, ces molécules doivent être régulées précisément. C'est pourquoi les cellules cancéreuses répondent aux niveaux accrus de ROS par une augmentation de leurs niveaux d'antioxydants (Gorrini, Harris, & Mak, 2013).

Une étude publiée en 2018 montre de fait qu'au cours de l'optimisation d'un procédé de production d'anticorps par une lignée CHO, le facteur majoritairement déterminant pour la productivité est la capacité des cellules à s'adapter au stress oxydatif généré par l'augmentation de la production. Ainsi, ils démontrent que les cellules capables de produire le plus d'anticorps sont celles qui sont capables de réguler ce stress oxydatif en générant des espèces redox comme la glutathionne (Handlogten et al., 2018). Ces résultats nous confirment que chez CHO comme chez les cellules cancéreuses, la régulation oxydative est un paramètre crucial pour la survie et la production.

Un nombre croissant d'études propose de viser les particularités métaboliques que nous avons listées pour soigner le cancer. La littérature fournie du domaine de l'oncologie nous donne ainsi de précieuses informations sur la régulation des voies de la glycolyse de la respiration, du statut redox et sur les stratégies qui peuvent être mises en place pour modifier ces régulations. Les cellules CHO étant métaboliquement proches des cellules cancéreuses, nous pourrons nous inspirer des stratégies déployées dans le cadre du cancer pour les appliquer à notre lignée avec, comme objectif, une productivité accrue en mAbs.

2.3 Des drogues pour moduler le métabolisme

Partant du constat que la régulation métabolique des cellules CHO conduit à un déséquilibre entre glycolyse et respiration, notre objectif est de moduler leur métabolisme pour lutter contre l'effet Warburg. L'idée de départ est d'orienter le flux glycolytique vers le cycle TCA plutôt que vers la production de lactate. Ainsi, on abroge d'un côté la production de l'acide lactique inhibiteur, et de l'autre on favorise la création des intermédiaires nécessaires à la production d'énergie par la respiration. Cependant, on a vu que l'augmentation des flux métaboliques dans la mitochondrie peut créer des signaux de stress et perturber l'équilibre d'oxydoréduction de la cellule. On cherchera donc à réguler dans un même temps l'état d'oxydation pour éviter d'impacter négativement la biosynthèse.

Pour ce faire, on recherche dans la littérature des stratégies déjà testées pour moduler le métabolisme à l'aide de médicaments. L'intérêt de procéder par ajout de drogues est d'une part la facilité d'implémentation et d'autre par l'adaptation à tous types de lignées. On développe ainsi une stratégie versatile, capable d'être transposée à tout type de procédé et de faire face à la variabilité métabolique reconnue des cellules CHO.

2.3.1 Approches thérapeutiques de modulation du métabolisme

Des stratégies de modulation du métabolisme par des drogues sont employées depuis des décennies : elles sont évidentes pour traiter les symptômes dans le cas de maladies métaboliques comme le diabète ou l'obésité. Cependant, des liens croissants sont découverts entre le métabolisme et d'autres maladies. L'un des exemples les plus frappants de la littérature récente est le domaine de cancer, avec comme figure de proue de la « révolution métabolique » la Metformine. Prescrite en première intention pour le diabète (Nathan et al., 2009), des études épidémiologiques

ont mis en lumière la diminution de l'occurrence du cancer chez les patients traités par cette molécule (Evans, Donnelly, Emslie-Smith, Alessi, & Morris, 2005). Le lien entre l'effet métabolique de la Metformine et la limitation de la survie des cellules cancéreuses a depuis été confirmé (Wheaton et al., 2014), ouvrant la porte à de nombreuses autres stratégies métaboliques dans la lutte contre le cancer.

On peut regrouper les cibles visées par la recherche en oncologie en cinq catégories principales :

- *Les enzymes de la glycolyse* : cette voie métabolique, principal soutien de la production d'énergie des cellules tumorales, constitue une cible privilégiée. Citons par exemple l'inhibition de l'hexokinase (H. Wang et al., 2016), de la lactate déshydrogénase (A. Le et al., 2010) ou l'activation de la pyruvate déshydrogénase que nous détaillerons aux paragraphes 2.3.2 et 2.3.3.
- *La chaîne de transport des électrons* : on l'a vu la phosphorylation oxydative est essentielle au fonctionnement des cellules tumorales. La Metformine fait partie des molécules agissant sur la chaîne de transport des électrons, elle inactive le complexe I (Wheaton et al., 2014), mais on trouve des molécules agissant sur les autres complexes comme de nombreux inhibiteurs de la pompe à ATP (Li, Li, Sun, & Liu, 2017).
- *La glutaminolyse et les autres voies anaplérotiques* : l'une des particularités métaboliques du cancer est de faire tourner le cycle TCA au-delà de la capacité mitochondriale de phosphorylation oxydative pour alimenter les voies de biosynthèse (Porporato, Dhup, Dadhich, Copetti, & Sonveaux, 2011). La glutaminolyse (Jin et al., 2016; Q. Wang et al., 2014), l'autophagie et les autres voies sur-régulées de l'anabolisme (DeBerardinis & Chandel, 2016), sont des voies essentielles qui peuvent être utilisées à l'encontre des tumeurs.
- *Les antioxydants* : l'activité métabolique anormale des cellules cancéreuses provoque un haut niveau de stress oxydatif qui est compensé par de hauts niveaux d'antioxydants. Bloquer la génération d'antioxydants comme le NADPH (Gorrini et al., 2013), ou saturer les capacités de réduction de la cellule en la soumettant à une forte dose de vitamine C (Yun et al., 2015), sont des exemples de stratégies thérapeutiques mettant à profit cette vulnérabilité métabolique.

- *Les facteurs de transcription* : la régulation peut enfin se faire de manière indirecte en visant les facteurs de transcription ayant un effet sur le métabolisme. Ces cibles, comme HIF, AMPK ou PI3K (Deshmukh, Deshpande, Arfuso, Newsholme, & Dharmarajan, 2016; Porporato et al., 2011) ne sont pas des cibles purement métaboliques. En effet, elles ont aussi la particularité de réguler de nombreux autres procédés cellulaires : elles agissent aussi sur la prolifération, la survie, l'apoptose, etc.

Le but des thérapies dans le cadre du cancer est de provoquer la mort cellulaire : en général on utilise une combinaison de plusieurs drogues pour bloquer simultanément différentes voies métaboliques essentielles. Dans notre cas, on veut au contraire encourager un meilleur fonctionnement des cellules. Nous rechercherons parmi les stratégies existantes des drogues capables de désengorger la glycolyse sans provoquer de stress ou de mortalité qui seraient forcément dommageables pour la production.

Un autre domaine peut nous aider pour accomplir cet objectif : la neurologie. Le cerveau repose, dans son fonctionnement normal, sur la glycolyse aérobique (Goyal et al., 2017). Une forte activité glycolytique peut être associée, nous l'avons vu, à de hauts niveaux de stress oxydatif : ces problématiques sont justement retrouvées dans les pathologies neurologiques. Ainsi, les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson sont associées à la fois à une assimilation moindre de glucose (Frazier et al., 2019) et à un stress oxydatif anormalement élevé (Subramaniam & Chesselet, 2013) lié à un défaut d'activité mitochondriale (Hirai et al., 2001). Pour traiter l'aspect métabolique des maladies neurologiques, les pistes abordées s'appuient sur deux stratégies majeures : l'augmentation de l'assimilation de glucose, le plus souvent en diminuant la résistance des cellules à l'insuline (Bosco, Fava, Plastino, Montalcini, & Pujia, 2011; Frazier et al., 2019), et la diminution du stress oxydatif (Linseman, 2009; Wen et al., 2011). La première stratégie est inutile à notre étude car nos cellules sont déjà fortement glycolytiques, cependant nous verrons à la sous-section 2.3.4 que nous pouvons appliquer la deuxième stratégie de neuroprotection pour aider à la réduction du stress oxydatif lié au fonctionnement des cellules CHO.

En définitive, nous avons choisi de tester deux drogues décrites dans la littérature pour leur action sur chacun de ces deux axes : augmenter l'efficacité énergétique des cellules en favorisant la phosphorylation oxydative, et réduire leur niveau de stress oxydoréductif. La partie suivante s'attache à présenter les molécules sélectionnées.

2.3.2 L'acide lipoïque

L'alpha-acide lipoïque (α-LA, Figure 2.8) est un acide gras à huit carbones comportant un pont disulfure. C'est une drogue métabolique simple déjà utilisée largement dans le cadre du traitement du diabète et des neuropathies qui lui sont liées.

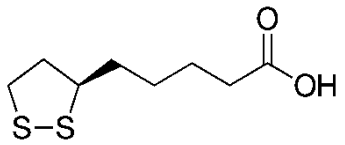

Figure 2.8 Structure de l'α-acide lipoïque

Depuis la fin des années 1990, de nombreuses études cliniques ont montré les bénéfices de son utilisation pour les maladies métaboliques (Akbari et al., 2018; Ziegler et al., 1995). Au-delà du diabète, l'intérêt grandissant pour cet acide gras se traduit par une explosion du nombre d'études utilisant l'α-LA dans des domaines aussi variés que les maladies neurodégénératives, cardiaques, métaboliques, immunitaires… Une étude réalisée en 2014 recense un total 29 brevets déposés, pour la seule période de 2011 à 2014, concernant des thérapies utilisant l'acide lipoïque seul ou en combinaison avec d'autres molécules (Koufaki, 2014).

Son potentiel thérapeutique repose sur sa multiplicité d'action. Du point de vue moléculaire, la présence d'un pont disulfure confère à l'α-LA ses propriétés antioxydantes : il agit en chélatant les ions métalliques, en régénérant la forme réduite d'antioxydants tels que la vitamine C, E ou la glutathionne, et en piégeant les espèces réactives de l'oxygène (Biewenga, Haenen, & Bast, 1997; Moura, de Andrade, dos Santos, & Goulart, 2015).

Synthétisé naturellement par notre organisme et présent en quantités faibles dans notre alimentation, son rôle premier est celui de cofacteur et stabilisateur de nombreuses enzymes mitochondriales (Rochette et al., 2013). Il est essentiel au bon fonctionnement du cycle TCA et à la croissance cellulaire (Solmonson & DeBerardinis, 2018). En particulier, il active indirectement la PDH (Korotchkina, Sidhu, & Patel, 2004). Il inhibe l'enzyme PDHK1 et l'empêche de phosphoryler la PDH : comme décrit en Figure 2.4, la PDH demeure active lorsqu'elle n'est pas phosphorylée et elle permet d'adresser le pyruvate vers le cycle TCA.

Du point de vue de la régulation du métabolisme, l'α-LA diminue les niveaux d'activation des voies de signalisation NF-kB (Ying, Kampfrath, Sun, Parthasarathy, & Rajagopalan, 2011) et PI3K/Akt (Ying, Xie, Chen, Yi, & Rajagopalan, 2015) dont nous avons déjà parlé pour leurs rôles dans la prolifération et la survie cellulaire ainsi que dans la régulation du métabolisme. Enfin, via ces mêmes voies de signalisation, l'α-LA participe à la modulation de la synthèse de cytokines inflammatoires : c'est pour cette raison qu'il est aussi décrit comme un anti-inflammatoire (Serhiyenko, Serhiyenko, & Suslik, 2018).

À notre connaissance, cette drogue n'a été testée sur la lignée cellulaire CHO que lors d'une étude sur la toxicité du plomb, loin des conditions « normales » de culture cellulaire (Gurer, Ozgunes, Oztezcan, & Ercal, 1999). La plage étendue de concentrations de travail trouvées dans la littérature pour les cellules de mammifère (de quelques micros à quelques millimoles pour les plus fréquentes) ne nous permet pas d'identifier une concentration optimale candidate. Nous pouvons cependant nous appuyer sur le fait que le profil métabolique des CHO, du point de vue du carbone, est semblable à celui des cellules tumorales. Des résultats expérimentaux confirment l'action métabolique de l'α-LA sur des cellules cancéreuses. C'est par exemple le cas des études réalisées par l'équipe du Dr. Schwartz. En combinant l'α-LA, qui oriente le métabolisme vers une production d'énergie mitochondriale, à un inhibiteur de la synthèse mitochondriale d'ATP comme la Metformine, le dérèglement subséquent de l'approvisionnement énergétique des cellules tumorales se traduit par une nette baisse de croissance confirmée *in vitro*, *in vivo* et *in silico* (da Veiga Moreira et al., 2019; Schwartz et al., 2010; Schwartz, Buhler, Icard, Lincet, & Steyaert, 2014).

Sans chercher à causer la mort cellulaire comme c'est le cas pour les tumeurs, nous voulons reproduire l'effet observé de l'acide lipoïque sur le flux glycolytique chez la lignée CHO. Après une nécessaire étape d'adaptation des procédures expérimentales pour notre lignée, on s'attend à ce que cette drogue oriente le pyruvate vers le cycle de Krebs à l'intérieur de la mitochondrie et aide à la régulation du stress oxydatif.

2.3.3 Le dichloroacétate

Le dichloroacétate de sodium (DCA, Figure 2.9) est une autre drogue ayant pour cible l'enzyme PDHK. Il s'agit d'un sel issu de l'acide dichloroacétique, dérivé halogéné de l'acide acétique portant deux atomes de chlore. Comme l'acide lipoïque, en empêchant la PDHK de phosphoryler la PDH, il permet d'orienter le flux glycolytique vers la mitochondrie. Il a d'abord été étudié en clinique pour traiter l'acidose lactique, condition pouvant être due à des facteurs génétiques ou aux effets secondaires de certaines drogues et qui se traduit par une accumulation d'acide lactique dans le sang (Stacpoole et al., 1988). Malgré certains problèmes d'adaptation métabolique pouvant survenir avec une administration sur le long terme (James & Stacpoole, 2016), le dichloroacétate entraîne une diminution de la quantité d'acide lactique dans le sang qui permet d'améliorer le pronostic des patients concernés. Il s'agit d'une molécule non brevetable, peu coûteuse, utilisée en médecine humaine depuis trente ans et dont les effets secondaires sont connus (Chu et al., 2015; James & Stacpoole, 2016).

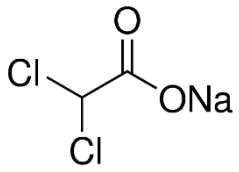

Figure 2.9 Structure du dichloroacétate de sodium

Sa capacité à moduler le métabolisme vers une utilisation mitochondriale du pyruvate et son mécanisme d'action par inhibition de PDHK ont été montrés dans de nombreux modèles *in vitro* : sur des cellules souches embryonnaires (A. S. Rodrigues et al., 2015), des cellules de neuroblastome (Niewisch et al., 2012), des cellules de cancer de la prostate (Cao et al., 2008), … En 2006, Bonnet et ses collaborateurs établissent un rapport de causalité entre hypertension artérielle pulmonaire, production accrue de ROS et activation de la voie HIF. L'emploi de dichloroacétate permet, chez le rat comme chez l'humain, de diminuer ces effets *in vitro* en rétablissant un fonctionnement mitochondrial normal et en aidant à la catalyse de l'élimination des ROS (Bonnet et al., 2006).

En comparaison avec le pouvoir réducteur et les nombreuses cibles de l'α-LA parmi les enzymes du cycle TCA, le mécanisme d'action du DCA semble donc être ciblé plus étroitement sur la PDHK. Cette drogue a de plus déjà été utilisée sur une lignée CHO productrice d'anticorps pour diminuer l'effet Warburg. L'étude publiée en 2018 par Buchsteiner et al. montre qu'une concentration de 5 mM de DCA dans un milieu de culture standard pour CHO a pour effet de diminuer la production de lactate. En mode cuvée alimentée (avec ajouts de nutriments en cours de

culture) l'équipe a été capable d'augmenter la durée de vie des cellules CHO en supplémentant le milieu de base et les ajouts avec du DCA, augmentant ainsi les titres finaux obtenus en anticorps (Buchsteiner et al., 2018). Ces résultats encourageants nous poussent à vouloir utiliser le dichloroacétate comme contrôle d'inhibition de la PDHK, pour comparer son effet métabolique à celui plus global de l'acide lipoïque; compte tenu que ces deux drogues ciblent un effet similaire.

2.3.4 Le bleu de méthylène

Le bleu de méthylène (MB, Figure 2.10) ou chlorure de méthylthioninium est un sel organique de synthèse utilisé comme colorant, antibactérien ou comme médicament. Il fait partie de la liste des médicaments essentiels de l'Organisation Mondiale de la Santé (20^{e} édition datée d'août 2017, consultée en avril 2019) et est indiqué en injections intraveineuses pour les cas de méthémoglobinémie. À cause d'une déficience en NADPH-méthémoglobine réductase, les globules rouges sont porteurs de la forme oxydée de l'ion fer, Fe^{3+} au lieu de Fe^{2+}. En résulte une affinité accrue pour l'oxygène qui empêche les globules rouges de libérer l'oxygène dans les tissus (Darling & Roughton, 1942). Le bleu de méthylène agit comme un accepteur d'électrons pour la NADPH-méthémoglobine réductase et lui permet d'être réactivée. Effet notable, à hautes concentrations le bleu de méthylène a au contraire un effet oxydatif qui peut aggraver l'oxydation des hémoglobines (Boylston & Beer, 2002).

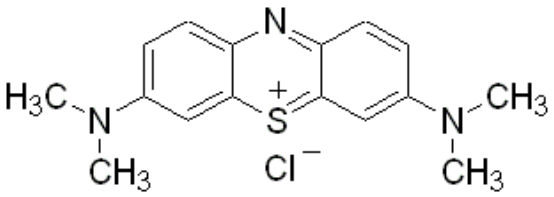

Figure 2.10 Structure du bleu de méthylène

Ce phénomène souligne deux points importants : le fait que le MB est une drogue déjà approuvée, et sa forte réactivité ou propension à agir comme échangeur d'électrons dans de nombreuses réactions biologiques. De fait, on trouve dans la littérature de nombreux exemples d'utilisations du MB : il agit sur les niveaux de ROS, d'oxyde nitrique la balance NAD(P)/NAD(P)H, … et de nombreuses autres espèces dont les propriétés d'oxydoréduction impactent la fonction ou la signalisation cellulaire.

Plusieurs études démontrent en particulier que cette réactivité a un impact positif sur l'activité mitochondriale. Le MB est capable d'accepter des électrons de la plupart des navette électroniques utilisées dans la mitochondrie : NADH, NADPH et $FADH_2$ (Wen et al., 2011). La Figure 2.11 montre le chemin alternatif créé par le MB. Il contourne les complexes I à III de la chaîne de

transport des électrons dans la mitochondrie pour transférer les électrons directement du cytochrome c et alimenter les complexes IV et V (Yang et al., 2017). Des expériences réalisées sur des mitochondries isolées et des cultures cellulaires montrent qu'il en résulte une augmentation de l'activité du cytochrome c de 30% et une augmentation de la consommation d'oxygène de 37 à 70% (Atamna et al., 2008). Un deuxième avantage de cette voie alternative est de réduire la quantité de ROS produits par les mitochondries fortement sollicitées en diminuant la pression exercée sur les trois premiers complexes membranaires mitochondriaux (Poteet et al., 2012; Wen et al., 2011; Yang et al., 2017).

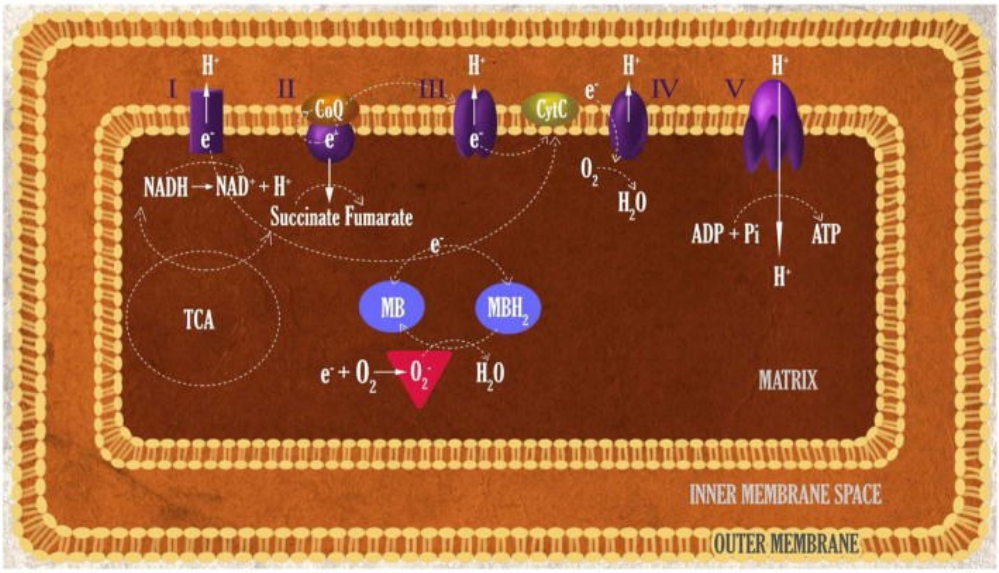

Figure 2.11 Mécanisme de transfert d'électron alternatif par le bleu de méthylène dans la chaîne de transport des électrons à la membrane mitochondriale. Le bleu de méthylène (MB) contourne les complexes I à III pour transférer les électrons directement au cytochrome c (CytC), augmentant la consommation d'oxygène et l'activité des complexes IV et V. Tiré de (Yang et al., 2017)

Les effets protecteurs et activateurs du bleu de méthylène sur l'activité mitochondriale sont étudiés principalement dans le cadre de maladies neurodégénératives, principalement au niveau préclinique. L'équipe de Wen et al. montre dans des cultures cellulaires d'une lignée neuronale de souris une diminution significative du taux d'acidification du milieu (principalement dû à la production d'acide lactique) et une augmentation du taux de consommation d'oxygène en présence de MB à des doses de quelques micromoles par litre (Wen et al., 2011). Ils démontrent de plus que le MB a des effets neuroprotecteurs après des tests de provocation de stress oxydatif, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Des résultats similaires sont démontrés par plusieurs équipes avec des

concentrations de travail entre 0,1 nM et 10 µM, avec une diminution de la viabilité au-delà de ces doses (Oz, Lorke, Hasan, & Petroianu, 2011; Poteet et al., 2012). Des expériences menées dans d'autres domaines montrent que ces conclusions ne sont pas spécifiques aux lignées neuronales : elles sont confirmées sur des lignées de fibroblastes humains atteints de progéria, une maladie génétique rare du vieillissement pathologique (Xiong et al., 2016), ou encore sur des cellules cardiaques de rats diabétiques (Duicu et al., 2017).

Le bleu de méthylène est enfin connu pour ses propriétés photodynamiques. En thérapie contre le cancer, on parle de photosensibilisation : excité sous lumière rouge (550-650 nm), il génère de grandes quantités de ROS jusqu'à provoquer la mort cellulaire par apoptose (Chen et al., 2008). Nous l'avons vu, le bleu de méthylène non irradié n'est pas toxique pour les cellules à faible dose. Un tel traitement permet de sensibiliser toutes les cellules avec du MB puis d'illuminer et de tuer seulement les cellules cancéreuses. Mieux, des technologies brevetées s'intéressent à des nanoparticules chargées de bleu de méthylène afin de pouvoir cibler spécifiquement les cellules cancéreuses (S. Kim, Kwon, & Lee, 2018).

Dans notre cas, la réactivité augmentée du bleu de méthylène en présence de lumière peut s'avérer problématique. En effet, l'exposition lumineuse n'est pas toujours contrôlée en culture ou lors des différents tests réalisés. Cependant, les incubateurs du laboratoire dans lesquels les cellules sont cultivées ne laissent passer aucune lumière et nous minimiserons le temps passé en dehors des incubateurs afin de diminuer l'impact de la photosensibilité du bleu de méthylène. Il sera utilisé pour ses propriétés de diminution du stress oxydatif et d'augmentation de l'activité mitochondriale.

CHAPITRE 3 DÉMARCHE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT

Nous avons vu que les cellules de la lignée CHO présentent une régulation métabolique particulière qui, similairement aux cellules cancéreuses, les conduit à privilégier la glycolyse plutôt que la respiration mitochondriale. Ce phénomène appelé effet Warburg peut être expliqué par une plus forte production d'intermédiaires réactionnels qui confère un avantage prolifératif aux cellules. Cependant, il en découle une efficacité diminuée au niveau énergétique – la quantité d'ATP produite par molécule de glucose consommée est sévèrement diminuée lorsque la voie glycolytique est privilégiée – et une accumulation de lactate qui peut affecter négativement la culture.

La lignée CHO est très majoritairement utilisée dans le cadre de la production industrielle de protéines recombinantes : le but final n'est pas la production de biomasse mais bien la biosynthèse de molécules complexes, procédé cellulaire gourmand en énergie. Notre hypothèse principale est donc qu'en réorientant le flux glycolytique vers la mitochondrie et en diminuant l'effet Warburg, il sera possible de gagner en efficacité énergétique, de diminuer l'accumulation de lactate dans le milieu et d'améliorer la production.

Pour cela, nous avons choisi de tester plusieurs drogues connues, déjà utilisées dans le domaine préclinique ou clinique et peu chères. Une telle stratégie est facile à transposer à n'importe quel procédé industriel, tant du point de vue logistique (simple ajout d'un composé peu coûteux au milieu de culture déjà utilisé) que réglementaire (drogues non toxiques et connues des instances de régulation). Nous testerons deux drogues agissant sur l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie, dirigeant le flux de la glycolyse vers le cycle de Krebs : l'α-acide lipoïque et le dichloroacétate de sodium. L'α-acide lipoïque possède de plus des propriétés antioxydantes qui peuvent aider à diminuer les signaux de stress cellulaire. Le bleu de méthylène, troisième drogue que nous testerons, agit comme échangeur d'électrons : il joue directement sur l'état de stress de la mitochondrie en contournant une partie de la chaîne de transfert des électrons et en diminuant la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène.

Les cibles des drogues choisies sont résumées en Figure 3.1 : on voit que leur action séparée ou combinée devrait permettre de diminuer l'effet Warburg en culture en orientant le flux glycolytique vers la mitochondrie et en libérant celle-ci d'une partie du stress provoqué par l'activité de la chaîne de transport des électrons.

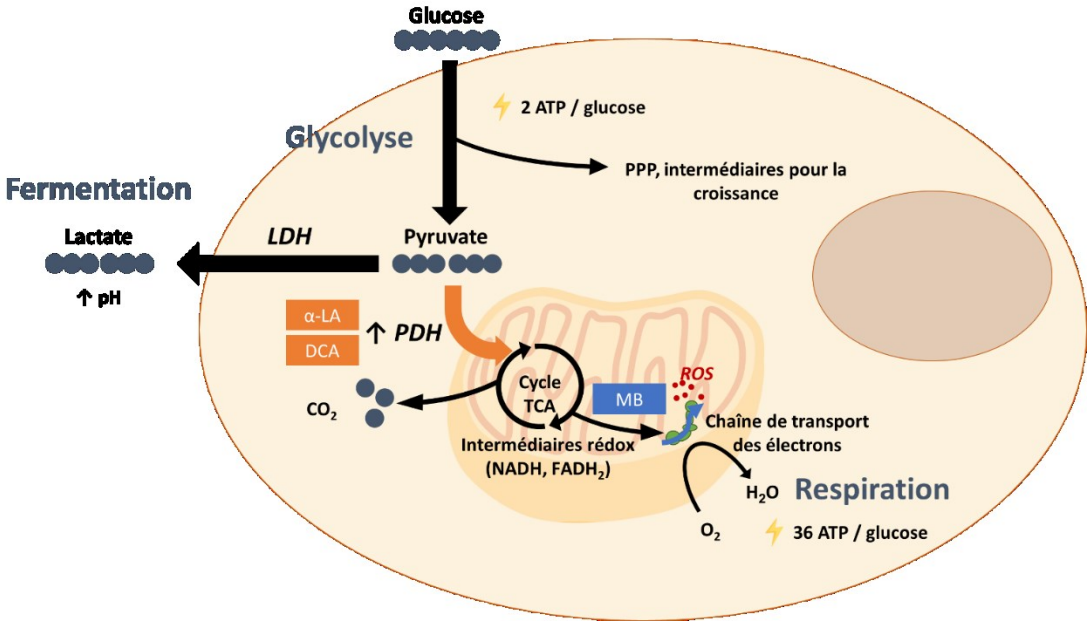

Figure 3.1. Cibles métaboliques des drogues choisies au sein des voies principales de production de l'énergie des cellules de mammifères comme la lignée CHO. L'acide lipoïque (α-LA) et le dichloroacétate (DCA) orientent le pyruvate, carrefour entre les voies fermentative et respiratoire, vers la mitochondrie. Le bleu de méthylène (MB) soulage la chaîne de transport des électrons d'une partie de son fonctionnement et réduit le niveau de stress mitochondrial.

L'objectif général de ce projet est de trouver une combinaison simple de drogues permettant de réguler le métabolisme de cellules CHO productrices d'anticorps monoclonaux, de manière à réduire l'effet Warburg et favoriser la production. Nous l'avons divisé en trois objectifs spécifiques :

Objectif spécifique n°1

Déterminer les concentrations optimales des différentes drogues pour la lignée CHO choisie, c'est-à-dire les concentrations où l'effet des drogues est le plus fort sans affecter la viabilité cellulaire.

Objectif spécifique n°2

Développer des méthodes expérimentales permettant de monitorer les voies métaboliques fermentatives et respiratoires des cellules CHO en culture.

Objectif spécifique n°3

Démontrer l'effet de chaque drogue et de combinaisons choisies sur l'effet Warburg et leur impact sur la production d'anticorps.

La suite de ce mémoire est divisée en trois chapitres. Le Chapitre 4 présente le manuscrit « *Lipoic acid and methylene blue reduce the Warburg effect and enhance monoclonal antibody production in CHO cells* », soumis à la revue *Biotechnology and Bioengineering*. Le Chapitre 5 discute en détails les résultats obtenus en se référant aux objectifs spécifiques définis ci-dessus. Enfin, le Chapitre 6 comporte la conclusion et les recommandations de travaux futurs envisagés pour poursuivre la démarche proposée dans ce mémoire.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1: LIPOIC ACID AND METHYLENE BLUE REDUCE THE WARBURG EFFECT AND ENHANCE MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION IN CHO CELLS

4.1 Présentation de l'article

Cet article, présenté à la revue *Biotechnology and Bioengineering*, résume l'essentiel du travail effectué au cours notre étude. La section de méthodologie présente les protocoles expérimentaux développés pour déterminer les concentrations optimales pour les drogues (objectif 1) et les biomarqueurs choisis pour suivre l'effet Warburg (objectif 2). L'analyse des résultats et la discussion proposée ensuite permettent de conclure quant à l'effet de ces drogues sur l'effet Warburg et sur la productivité (objectif 3).

4.2 En-tête de l'article

Léa Montégut[1], Pablo Martínez-Basilio[1], Jorgelindo da Veiga Moreira[1], Laurent Schwartz[2], Mario Jolicœur[1*]

[1] Research Laboratory in Applied Metabolic Engineering, Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, Centre-Ville Station, Montréal, Québec, H3C 3A7 Canada

[2] Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Avenue Victoria 75003 Paris, France

[*] Corresponding author:
Prof. Mario Jolicoeur
E-mail address: mario.jolicoeur@polymtl.ca
http://orcid.org/0000-0002-0875-7265
Tel.: +1-514-340-4711 x4525 / Fax: +1-514-340-4159

Short running title: Reduction of Warburg effect in a CHO cell line

Grant numbers: NSERC Discovery Grant #RGPIN-2019-05050

4.3 Abstract

The Warburg effect, a hallmark of cancer, has recently been identified as a metabolic limitation of Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, the primary platform for the production of monoclonal antibodies (mAb). Metabolic engineering approaches, including genetic modifications and feeding strategies, have been attempted to impose the metabolic prevalence of respiration over aerobic glycolysis. Their main objective lies in decreasing lactate production while improving energy efficiency. Although yielding promising increases in productivity, such strategies require optimization steps that are specific to each cell line, aside from genetic stability issues. We propose to apply drugs used for the metabolic therapy of cancer, and known to target the Warburg effect, on CHO cells. The use of the pyruvate dehydrogenase activator α-lipoic acid allowed to replenish the Krebs cycle through increased anaplerosis but resulted in mitochondrial saturation. The electron shuttle function of a second drug, methylene blue, enhanced the mitochondrial capacity. It pulled on anaplerotic pathways while reducing stress signals and resulted in a 24 % increase of the maximum mAb production. Finally, the combination of both drugs proved to be promising for stimulating Krebs cycle activity and mitochondrial respiration. Therefore, drugs used in metabolic therapy are valuable candidates to improve CHO cell productivity.

Keywords: Warburg effect; Chinese Hamster Ovary cells; metabolic engineering; monoclonal antibodies; metabolic therapy.

4.4 Introduction

Chinese Hamster Ovary (CHO) cells are considered to be the primary platform for the production of monoclonal antibodies (mAb) and other complex biopharmaceuticals (Walsh, 2018). Research pertaining to improving cell viability, mAb quality, productivity and reproducibility, is still increasing on this topic (Kelley, 2009). Indeed, studies seeking to identify metabolic factors that are limiting cell productivity are only now surfacing (Stolfa et al., 2018). A particular phenotype called the *Warburg effect* is gaining attention since most CHO cell lines exhibit this highly glycolytic metabolism despite the presence of oxygen (i.e. aerobic glycolysis) (Ghorbaniaghdam, Henry, & Jolicoeur, 2014; Zagari, Jordan, Stettler, Broly, & Wurm, 2013). Due to the Warburg effect, over 75% of pyruvate, the glycolytic end-product, has been reported to be converted into

lactate (Young, 2013). With such an important carbon flux lost as lactate, the Warburg effect phenomenon clearly limits mAb production (Ahn & Antoniewicz, 2011; Gagnon et al., 2011). The regulation mechanisms underlying aerobic glycolysis are still poorly understood but they are known to be involved in the limitation of pyruvate progression to the tricarboxylic acid (TCA) cycle and in energetic and redox balances (Hartley, Walker, Chung, & Morten, 2018; Luo, Vijayasankaran, et al., 2012).

For the past 30 years, numerous studies have looked at reducing lactate production, aiming to improve culture performances. Restriction of glucose uptake (Gagnon et al., 2011; Glacken, Fleischaker, & Sinskey, 1986; Hayter et al., 1993) or its replacement (Altamirano, Paredes, Cairo, & Godia, 2000; D. Y. Kim et al., 2013; Kuwae, Ohda, Tamashima, Miki, & Kobayashi, 2005), were found to be conducive for increasing productivity, but hindered cellular growth and prompted doubts on the capacity of mAb glycosylation in such starved cells (Fan et al., 2015; Villacrés, Tayi, Lattová, Perreault, & Butler, 2015). Genetic strategies were also tested to control the expression of endogenous or recombinant enzymes for restricting glucose uptake (Le et al., 2013; Wlaschin & Hu, 2007), preventing lactate secretion (S. H. Kim & Lee, 2007) or directly enhancing TCA cycle fluxes (Chong et al., 2010; Fogolin, Wagner, Etcheverrigaray, & Kratje, 2004; Gupta et al., 2017; Toussaint, Henry, & Durocher, 2016). However, genetic modifications are sensitive to genome variability and instability, giving varying results among cell lines (Wilkens & Gerdtzen, 2015).

An alternate strategy to limit the Warburg effect consists of adding biochemical effectors to manipulate specific enzyme activity. For instance, copper ion, a cofactor of many enzymes known to act on mitochondrial targets such as cytochrome c (Ishida, Andreux, Poitry-Yamate, Auwerx, & Hanahan, 2013) was confirmed to lead to lactate reuptake, TCA activation and increased productivity in CHOs (Luo, Zhang, et al., 2012; Qian et al., 2011; Yuk et al., 2015). More recently, dichloroacetate (DCA), an effector of PDH-kinase (PDHK), was tested in fed-batch CHO cultures. By down-regulating PDHK, this drug is known to increase the activity of PDH, an enzyme in charge of the entry of pyruvate in the mitochondria (Michelakis, Webster, & Mackey, 2008; Niewisch et al., 2012). DCA showed to enhance CHO cell viability as well as mAb production with time (Buchsteiner, Quek, Gray, & Nielsen, 2018). With only few such studies published to date, to the best of our knowledge, this is a promising approach that is emerging.

Although the aerobic glycolysis phenotype has been identified in cancer cells since the 1920's (Warburg, Wind, & Negelein, 1927), it is only since 2011 that Otto Warburg's definition of deregulated cellular energetics was included as part of the "hallmarks of cancer" (Hanahan & Weinberg, 2011). This novel approach led to studies on the metabolic therapy of cancer at pre-clinical and clinical levels, testing drugs known to modulate the activity of enzymes that can maximize mitochondrial fluxes (da Veiga Moreira et al., 2019; Deshmukh, Deshpande, Arfuso, Newsholme, & Dharmarajan, 2016; Gorrini, Harris, & Mak, 2013; Michelakis et al., 2010; Schwartz, Buhler, Icard, Lincet, & Steyaert, 2014). In this work, metabolic similarities of CHOs with cancer cells guided the selection of potential drug candidates, among which α-lipoic acid (α-LA), acting at the glycolysis/TCA interface, and methylene blue (MB), enhancing respiratory pathways, were tested. α-LA promotes the entry of pyruvate in the mitochondria by PDHK inactivation (Korotchkina, Sidhu, & Patel, 2004), and interacts with many other TCA enzymes as well as acting as an anti-oxidant (Bingham, Stuart, & Zachar, 2014; da Veiga Moreira et al., 2019). Effects of α-LA were compared to those of DCA, a compound reported to have similar effects in CHOs (Buchsteiner et al., 2018). MB, a synthetic dye first prepared by Heinrich Caro in 1876, showed to promote respiration in cancer cells (Barron, 1930), neurons (Atamna et al., 2008; Poteet et al., 2012) and heart cells (Duicu et al., 2017). It increases the mitochondrial activity by stimulating the redox exchanges at the mitochondrial membrane (Atamna et al., 2008; Yang et al., 2017), thus stimulating proton turnover rate. Our results confirm strategies that limit the Warburg effect and increase mAb production.

4.5 Materials and methods

4.5.1 Cell line and medium

The recombinant CHO-DXB11 cell line stably producing the EG2-hFc chimeric monoclonal antibody (Durocher & Butler, 2009) was kindly provided by Dr. Yves Durocher from the National Research Council (Montreal, Quebec, Canada). Cells were cultured in SFM4CHO serum-free medium (HyClone, ref. SH305480.2) supplemented with 4 mM glutamine (Gibco, ref. 25030164) and 0.05 mg/mL dextran sulfate (Sigma, ref. D8906). Cells were passaged thrice weekly until reproducible growth curves were achieved, before being put in batch cultures and submitted to drug treatments.

4.5.2 Culture and drug treatments

All cultures were seeded at 2.0×10^5 cells/mL and grown in batch mode, in a humidified incubator at 37°C and 5 % CO_2 under gentle agitation (120 rpm). Drugs were added at inoculation (t = 0 h) and cultures were monitored for up to 120 h or until the viability dropped below 90 %. Methylene blue (MB) (Laboratoire Mat, ref. BS0110) and sodium dichloroacetate (DCA) (Sigma, ref. 347795) were dissolved directly in the medium. Due to a poor water solubility, alpha-lipoic acid (α-LA) (Sigma, ref. T1395) was dissolved in ethanol and further diluted in culture medium, with a final ethanol concentration ≤ 0.1 %. The condition with 0.1 % ethanol alone (i.e. control + vehicle) in culture medium was tested to assess the influence of the vehicle on cell metabolism. All supplemented media were sterilized by filtration through a 0.22 µm filter prior to inoculation.

For drugs concentration studies, cells were cultured in six-wells non-tissue culture treated plates with a final working volume of 3.3 mL and three replicates per condition were prepared. The effect of α- LA was assessed at 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM and 500 µM; while MB was used at 10 nM, 100 nM, 500 nM, 1 µM and 10 µM. These concentration ranges were based on those found in literature for α- LA (Kafara, Icard, Guillamin, Schwartz, & Lincet, 2015; Kleinkauf-Rocha et al., 2013; Schwartz et al., 2010) and MB (Atamna et al., 2008; Oz, Lorke, Hasan, & Petroianu, 2011). Then, in-depth metabolic studies were performed in 250 mL shake flasks at a working volume of 60 mL. DCA was assessed as a positive control, at a concentration of 5 mM as suggested in a recent study on CHOs (Buchsteiner et al., 2018). All cultures were performed in triplicate except for the control, which was replicated in parallel to each experiment (n = 7).

4.5.3 Cell count and extracellular metabolites measurements

Cell count and viability were assessed with a hemocytometer according to the trypan blue exclusion method. Volumes of 0.2 mL (6-well plates) or 0.5 mL (shake flasks) were taken every 24 h. 50 µL were used for cell counting and the remaining volume was centrifuged at 200 *g* for five minutes. Supernatants were frozen (-80°C) for further analysis: concentrations of glucose, lactate, glutamine and glutamate in the supernatant were assessed with an enzyme-based biochemistry analyzer (YSI 2700 Select, YSI Life Sciences Inc.).

4.5.4 Respirometry assays

Measurements of cells specific oxygen consumption rates (q_{O2}) were performed as described previously (Lamboursain, St-Onge, & Jolicoeur, 2002). Briefly, 3 mL of cell suspension was taken daily from each shake flask, counted and put in a 10 mL dissolved gas analysis glass syringe (Hamilton, ref. 81620). If necessary, a larger volume was harvested, centrifuged and resuspended in 3 mL to reach a required minimum of 3.0×10^6 cells. The syringe was added a small cross-shaped stirring bar and immersed in a 37°C water bath, then sealed hermetically by using the oxygen probe as a plunger to remove the gas phase. Dissolved oxygen concentration was recorded for at least five minutes after the establishment of a steady consumption rate; the final O_2 concentration always exceeding 40 % air saturation. The cell suspension was then re-oxygenated and a second measurement was performed, ~10 minutes after the addition of the ATP-synthase inhibitor oligomycin A (Sigma, ref. 75351) to a final concentration of 1 µM, to discriminate the respective contributions of oxidative phosphorylation (OxPhos) and mitochondrial proton leak to the global cell respiration. Finally, a second cell count was performed after the complete assay to account for eventual growth and mortality.

4.5.5 Flow cytometry analysis of mitochondrial membrane potential and ROS production

For each fluorescent dye, samples for 5×10^5 live cells were taken daily from each flask and centrifuged 5 min at 200 *g*. Cells were resuspended in 300 µL of culture medium containing 5 µM of MitoSOX (ROS; Invitrogen, ref. M36008) or 10 µg/mL of Rhodamine123 (membrane potential; Invitrogen, ref. R302), incubated in the dark for 30 min, then washed once or twice, respectively, for 15 min in 300 µL of phosphate-buffered saline (PBS). FACS measurements were performed on 20,000 cells (FACS Canto II, BD). Both MitoSOX and Rhodamine123 were excited at 488 nm, and emissions were collected at 585 ± 21 nm and 530 ± 15 nm, respectively. Data analysis was performed using the FlowJo software (Tree Star Inc.).

4.5.6 ELISA quantification of mAb production

The chimeric EG2-hFc monoclonal antibody (mAb) titers were determined by “sandwich” enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A 96-well high-bind microplate (Corning, ref. 3369) was incubated overnight with goat anti-human Fc-specific antibodies (Sigma, ref. I2136)

diluted 1:30,000 in PBS. Wells were washed three times with PBS containing 0.05% Tween 20 (Sigma, ref. P1379) and blocked for 1 h with a solution of 1 % bovine serum albumin (BSA, Sigma, ref. A7030) in PBS. Extracellular medium samples were diluted 1:500 to 1:10,000 in the PBS-BSA solution, depending on the day of culture. The plate was washed and loaded with the diluted samples or human IgG whole molecule standards (Cederlane, ref. 009-000-003). After 1 h, the plate was washed and incubated for 1 h with peroxidase-conjugated goat anti-human Fc-specific antibodies (Sigma, ref. A0170). After washing, the plate was revealed with TMB substrate (Sigma, ref. T0440) and incubated for 20 min in the dark. Absorbance was read at 630 nm four times in the span of ten minutes and the slopes of optical density variations were compared to the standards by linear regression to determine the concentration in each well.

4.5.7 Statistical analysis

Data are presented as mean ± standard error of the mean (n = 3, except for control n = 7). Ordinary one-way or two-way (for time-dependent variables) analyses of variance (ANOVA) were performed. Values of $p < 0.05$ were considered significant and the notations of * ($p < 0.05$), ** ($p \leq 0.01$) and *** ($p \leq 0.001$) were used for the comparison versus the control group.

4.6 Results

4.6.1 Concentration response studies for α-LA and MB

The threshold concentrations of each drug, above which CHO-DXB11 cells growth and viability are significantly affected, were first determined in 6-well plates cultures. In the case of adding α- LA (Figure 4.1A), cells viability was maintained for 120 h in all cultures except for concentrations of 100 µM and above, which were stopped at 96 h when cells viability reached 90 % (> 95 % for the other cultures). Indeed, α-LA at 10 µM and 20 µM did not show to affect cell specific growth rates (average $\mu = 0.039 \pm 0.002$ h^{-1}) nor viability compared to the control culture. Non-significant decreases of growth rates were observed at 50 µM ($\mu = 0.037 \pm 0.002$ h^{-1}, $p = 0.52$) and at 100 µM ($\mu = 0.033 \pm 0.003$ h^{-1}, $p = 0.08$). The deleterious effects of high concentrations in α-LA were confirmed with strongly impaired growth and viability at 200 µM ($\mu = 0.029 \pm 0.002$ h^{-1}, $p = 0.008$) and at 500 µM ($\mu = 0.014 \pm 0.002$ h^{-1}, $p < 0.001$). From these results, 20 µM was selected as the highest concentration of α-LA that does not result in a detectable

effect on cell growth, and 100 µM as the highest concentration that does not cause a significant decrease of cell viability.

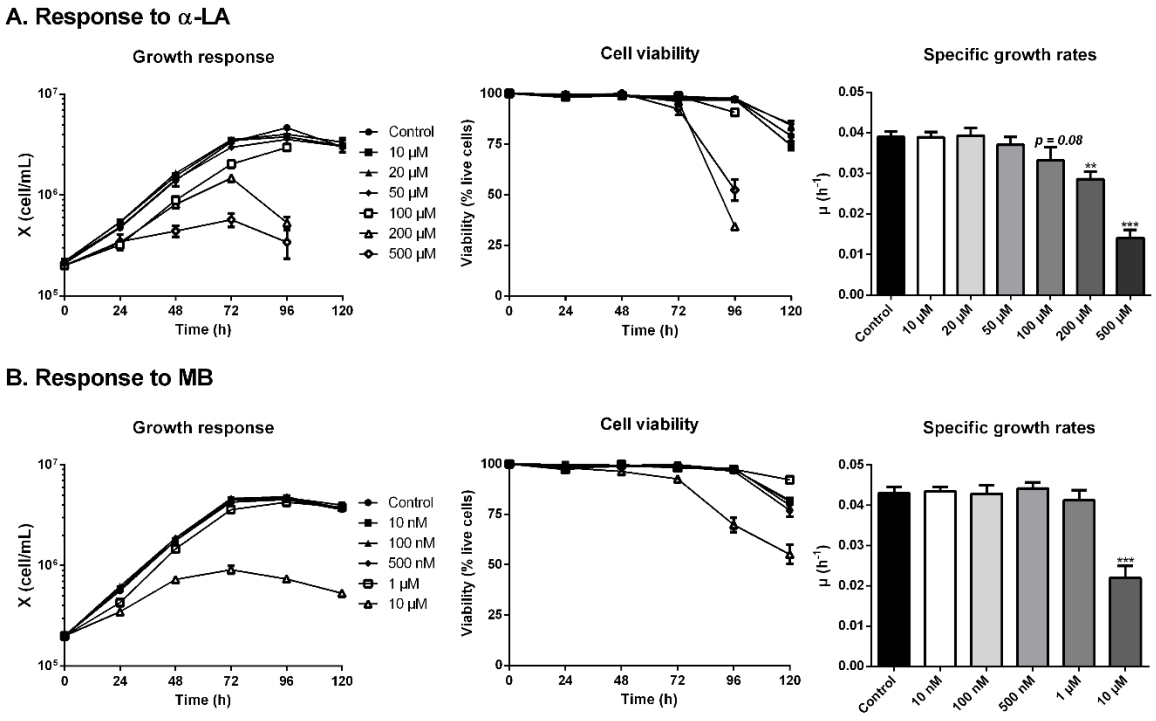

Figure 4.1. Growth and viability responses of CHO cells to various doses of α-lipoic acid (A-LA) and methylene blue (MB). A-LA was tested at 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µm, 200 µM and 500 µm (A) and MB was tested at 10 nM, 100 nM, 500 nM, 1 µM and 10 µM. Growth and viability curves are presented as means ± SEM (n=3). Specific growth rates were calculated by linear regression during the exponential growth phase, from 0 to 72 h. Statistical significance was determined by one-way ANOVA versus the control culture.

The addition of MB showed no growth inhibition until 500 nM, with cultures at 10 nM, 100 nM and 500 nM behaving similarly to the control (average $\mu = 0.043 \pm 0.002$ h^{-1}, Figure 4.1B). At 1 µM, a minor decrease of the cells specific growth rate was observed ($\mu = 0.041 \pm 0.003$ h^{-1}, $p = 0.56$). Of interest, this effect was accompanied with a maintained viability at the end of the culture, with 92 ± 1 % at 120 h when treated with 1 µM MB compared to 77 ± 3 % for the control culture. However, the cells growth rate was significantly reduced at 10 µM ($\mu = 0.022 \pm 0.003$ h^{-1}, $p < 0.001$). Therefore, and following the same criterion as for α-LA, a MB concentration of 1 µM was used in the remaining of this study.

4.6.2 α-LA and MB have distinct significant metabolic effects

The effect of the drugs on cell metabolism was then characterized in shake flask cultures. Drugs were assayed alone as well as combined, and compared to three controls: non-treated (control), treated only with the vehicle used for α-LA administration (0.1 % ethanol, control + vehicle) and treated with a known PDH activator (DCA 5 mM). As inferred by our previous observations, similar cell growth and viability behaviors were observed in all cultures (Figure 4.2A), with a specific growth rate of $\mu = 0.040 \pm 0.002$ h^{-1} and viability higher than 95 % until 96 h, except for 100 µM α-LA where cells growth was affected ($\mu = 0.033 \pm 0.002$ h^{-1}, $p = 0.01$, Figure 4.2A-3). The positive impact of MB on viability was confirmed, with levels of 84 ± 1 % for 1 µM MB and 82 ± 3 % when combined with 20 µM A-LA at 120 h, compared to 73 ± 4 % for the control (Figure 4.2A-2).

Aerobic glycolysis

Cells glycolytic metabolism was analyzed by comparing glucose consumption to lactate production (Figure 4.2B). Glucose specific uptake rate (q_{GLC}) and lactate specific production rate (q_{LAC}) were determined in two distinct metabolic phases, taking into account a metabolic shift observed at 48 h. The first phase was calculated from 0-48 h during the exponential growth phase, where both glucose consumption and lactate production fluxes stayed at high levels, with $q_{GLC} = 0.22 \pm 0.01$ µmol/10^6cells/h and $q_{LAC} = 0.36 \pm 0.02$ µmol/10^6cells/h for the control group (Figure 4.6, Supplementary material). The second phase, i.e. late growth phase (48-120 h), was characterized by lower fluxes, with a decrease of 79 % for q_{GLC} and 90 % for q_{LAC} in the control culture. Similar trends were observed in all conditions (Figure 4.6). The $Y_{LAC/GLC}$ yield ($- q_{LAC}/q_{GLC}$) shows that in all conditions most of the uptake glucose undergoes aerobic glycolysis during exponential growth, while this phenomenon is reduced by half during the late growth phase (Figure 4.2B-3). No significant differences were found when cells were treated with drug vehicle (0.1 % ethanol) alone, 20 µM α-LA or its positive control 5 mM DCA. However, 100 µM α-LA resulted in a reduced contribution of aerobic glycolysis, especially during the late growth phase ($Y_{LAC/GLC} = 0.51 \pm 0.01$ mol/mol vs. 0.84 ± 0.05 mol/mol for the control). At 1 µM, MB showed to decrease $Y_{LAC/GLC}$ both alone and in combination with 20 µM α-LA for the first 48 h, with -19 % and -23 % versus the control, respectively, and to be similar to the control thereafter.

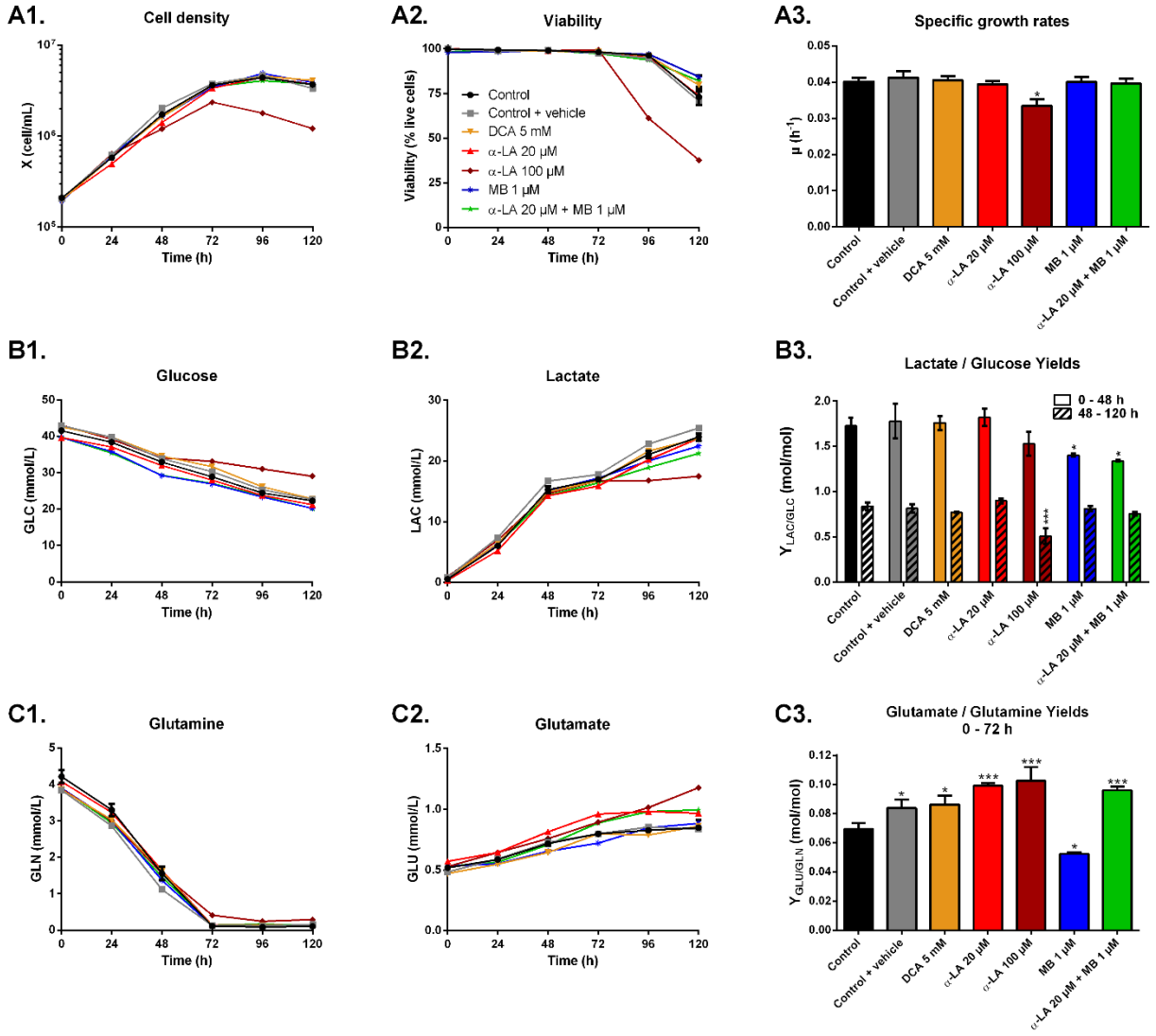

Figure 4.2. Metabolic responses after drug administration. All drugs were added to the culture medium prior to inoculation, with the following conditions: control, 0.1% ethanol (control + vehicle), 5 mM DCA, 20 µM α-LA, 100 µM α-LA, 1 µM MB and 20 µM A-LA combined with 1 µM MB. (A) Cellular growth, viability and specific growth rates were compared to the control. (B) The glucose (GLC) consumption and lactate (LAC) production rates were compared by calculating their ratio (YLAC/GLC). This yield was taken from 0 to 48 h (exponential growth phase) and from 48 to 120 h (late phase), then used to quantify the glycolytic fluxes. (C) Glutamine (GLN) consumption rates were compared to glutamate (GLU) production rates before glutamine depletion (0 - 72 h), the resulting yield (YGLU/GLN) quantifies the share of glutamine directed to anaplerosis.

Glutaminolysis

Before glutamine depletion, observed at ~72 h in all conditions, all treatments showed strong effects on the glutaminolysis pathway, evaluated from the $Y_{GLU/GLN}$ yield (- q_{GLU}/q_{GLN}) at 0-72 h (Figure 4.2C). Glutaminolysis refers to the efficient use of glutamine, second carbon and nitrogen source, incorporated in the TCA cycle. Cells treated with 5 mM DCA showed a 24 % increase of $Y_{GLU/GLN}$, and thus a decreased glutaminolysis phenomenon. However, significant $Y_{GLU/GLN}$ increases were observed under 20 µM and 100 µM α-LA, with + 43 % and + 48 % respectively (Figure 4.2C-3). It was also observed that supplementing the culture with the drug vehicle (0.1 % ethanol) alone caused a slight increase of + 21 % in $Y_{GLU/GLN,}$ compared to control. Interestingly, the addition of MB at 1 µM showed to favor glutaminolysis with - 24 % measured for $Y_{GLU/GLN}$. Finally, when used in combination with MB, the effect of α-LA was predominant with a + 38 % increase in $Y_{GLU/GLN}$ (Figure 4.2C- 3). Therefore, α-LA and DCA, both drugs known to activate the pyruvate dehydrogenase (PDH) and thus stimulate pyruvate entry into mitochondria, showed to decrease the entry of glutamine in the TCA cycle, while MB showed to increase glutaminolytic anaplerosis.

4.6.3 Drug combination promotes cells OxPhos

The cell specific oxygen consumption rate (q_{O2}) observed for the control culture at 24 h, with $q_{O2} = 0.22 \pm 0.02$ µmolO_2/10^6cells/h, was similar to previous data obtained with the same cell line (Robitaille, Chen, & Jolicoeur, 2015). While being maintained during exponential growth phase, q_{O2} then constantly and strongly decreased (Figure 4.3A). Such trend was observed in both respiration and leak components of the global q_{O2} (Figure 4.3B and C). The use of 5 mM DCA allowed to increase q_{O2} and $q_{O2,resp}$ by up to 27 % and 38 % at 24 h, respectively, compared to control. However, this effect was only maintained for the growth phase, then q_{O2} values decreased to control level. A concentration of 100 µM α-LA did not initially increase q_{O2} but, unlike DCA, it kept the respiration level constant until 120 h (Figure 4.3A), with an approximate 1:1 ratio between respiration and leak (Figure 4.3B and C). No such effect was observed with α-LA at 20 µM or MB at 1 µM, although their combination allowed to partially maintain cell respiration to the end of the culture. At 120 h, combined α-LA and MB led to a $q_{O2,resp}$ value 5.6 times higher than the control (Figure 4.3B), with a $q_{O2,leak}$ equal to that of control (Figure 4.3C). Of interest, the combination of the two drugs also showed to perturb the distribution between leak and respiration at 24 h since,

although total q_{O2} remained unchanged, the leak accounted for 70 % of global q_{O2} instead of 50 % for the control (Figure 4.3C).

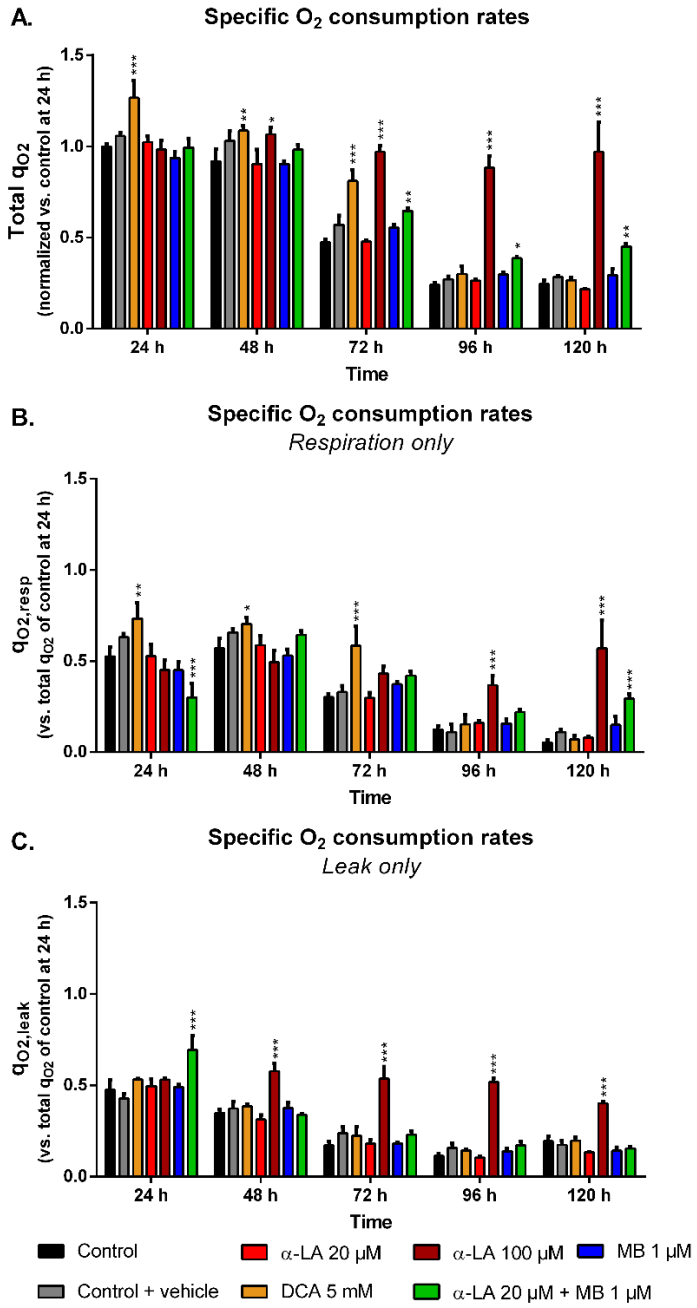

Figure 4.3. Impact of the various treatments on oxygen consumption. Specific oxygen consumption rates (q_{O2}) were measured for the different treatments with and without the ATP-synthase inhibitor oligomycin A (1 µM) in order to determine the total q_{O2} (A), its share due to leak $q_{O2,leak}$ (C) and the remaining share due to mitochondrial respiration $q_{O2,resp}$ (B). All values were normalized to the q_{O2} of their control at 24 h to allow for comparison.

4.6.4 Drugs affect mitochondrial membrane potential and oxidative stress level

The mitochondrial activity was assessed by FACS following two different markers: the mitochondrial membrane potential (MMP), stained by Rhodamine123, and the reactive oxygen species (ROS) generation at the membrane, stained by MitoSOX. We chose the MMP and ROS values of control at 24 h as references for all conditions and compared their evolution to these designated references. The MMP of the control increased with time up to 3-fold after the exponential growth phase (Figure 4.4A), a trend opposed to that of cell respiration. The addition of 0.1 % ethanol (control + vehicle) resulted in a greater but maintained MMP at the end of the culture. Pronounced increased of MMP were observed in both cultures treated with DCA at 5 mM and α-LA at 100 µM, with respective increases of 9.8 and 9.1 times the reference, measured at 120 h. In contrast, 20 µM α-LA culture maintained a low MMP, under 80% of that of the reference. Finally, the addition of MB did not affect MMP, except when combined to 20 µM α-LA where an initial burst was observed at 3.2 times the reference level, while remaining at control level until the end of the culture.

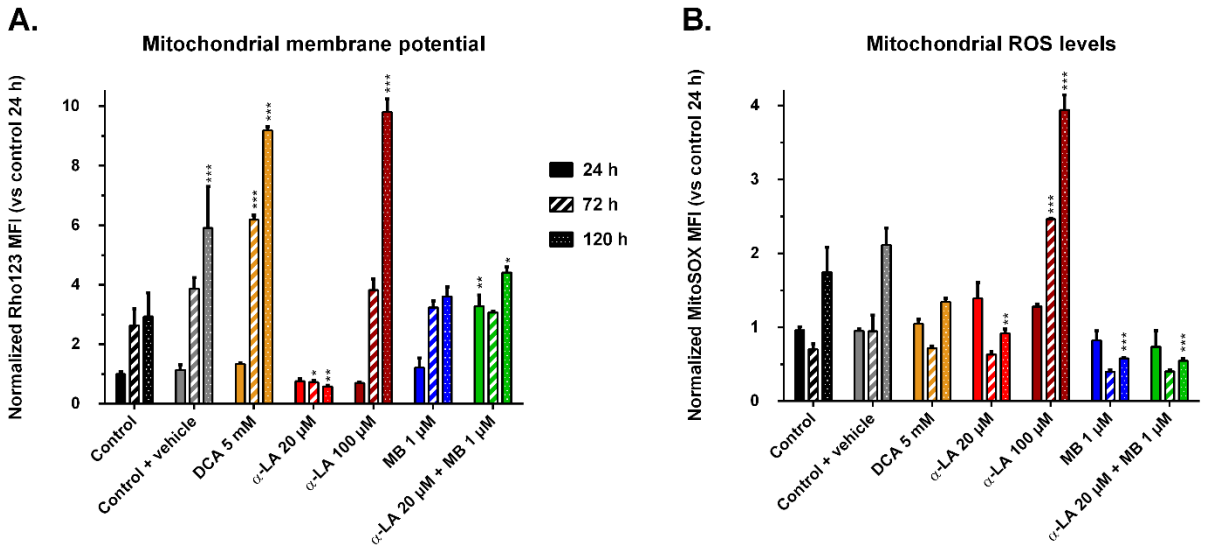

Figure 4.4. Mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species (ROS) levels induced by the drugs. Mean fluorescence intensity (MFI) was measured by FACS after staining with Rhodamine123 (A) for the mitochondrial membrane potential, and with MitoSOX (B) for the levels of superoxide ions located at the mitochondria. All values are presented as means ± SEM with arbitrary units (normalized versus the MFI of the control at 24 h).

When functioning normally, the electron transport chain (ETC) generates ROS, among which superoxide ions can be stained by the MitoSOX fluorescent dye. The control, drugs vehicle and 5 mM DCA (to a lesser extent) conditions showed similar trends, with stable levels at 24 and 72 h, and 1.5 to 2-fold increase at 120 h (Figure 4.4B). In agreement with their high mortality levels, cells treated with 100 µM of α-LA excessively generated mitochondrial ROS. Finally, at 120 h, instead of the doubling observed for the control, 20 µM α-LA, 1 µM MB and their combination showed decreasing ROS levels with respectively 0.9, 0.6 and 0.5 times the reference value (Figure 4.4B).

4.6.5 MB significantly increases the final monoclonal antibody titer

Maximum mAb titers were reached at 96 h and decreased afterwards (Figure 4.5A), although not exactly following viability trends (Figure 4.1). A similar maximum value of 49 ± 3 mg/L was measured for the control, the 20 µM α-LA and 5 mM DCA conditions. The addition of 0.1 % ethanol (control + vehicle) resulted in a final production reduction of 20 % (Figure 4.5B). The use of 100 µM α-LA decreased the maximal titer by 67 %, and it was not the result of the presence of ethanol alone ($p < 0.001$, one-way ANOVA vs. control + vehicle). Notably, the addition of MB at 1 µM stimulated the mAb production (+24 ± 5 %, $p = 0.0013$). A positive but non-significant increase (+7 ± 3 %, $p = 0.25$) was also detected when MB was combined to 20 µM α-LA.

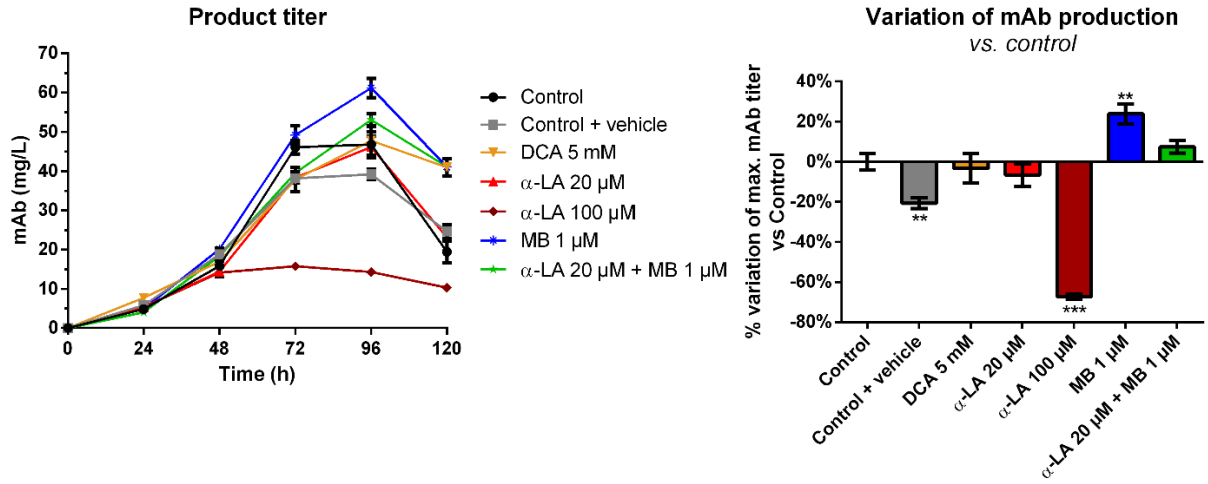

Figure 4.5. Monoclonal antibody (mAb) production and variation of the maximum mAb titer in the extracellular medium for the various drug treatments versus control. (A) Product titer was determined by ELISA and (B) its effect on mAb production is presented as the percentage of variation versus control.

4.7 Discussion

4.7.1 Up-regulation of pyruvate dehydrogenase can lead to OxPhos saturation

Two of the three drugs tested (i.e. α-LA and DCA) target the PDH enzyme, which converts pyruvate to mitochondrial acetyl-oenzyme A (AcCoA) rather than to extracellular lactate. However, the expected decrease of $Y_{LAC/GLC}$ has only been observed under 100 µM α-LA while it was not significant at 20 µM α-LA nor 5 mM DCA (Figure 4.2B). At 20 µM α-LA, the increase of q_{LAC} was counterbalanced by a slight (but not significant) increase of q_{GLC} (Figure 4.6). Although both specific rates increased under 100 µM α-LA, the increase was higher for q_{GLC} than for q_{LAC}, which explains a lower $Y_{LAC/GLC}$. With no significant effect on q_{LAC} or q_{GLC}, our results with DCA differ from Buchsteiner et al. (2018), which may underly some cell line differences. However, both drugs (DCA and α-LA alone or in combination with MB) reduced glutaminolysis (Figure 4.2C), the main anaplerotic pathway in CHO cells (Popp et al., 2016; Zielke, Zielke, & Ozand, 1984), a result mostly due to an increased q_{GLU} (Figure 4.6). Martínez et al. (2013) report that CHO cells maintain constant TCA fluxes by reducing glutaminolysis when other anaplerotic fluxes are activated during the glycolysis/OxPhos switch. These results suggest that α-LA and DCA-treated cells may increase their $Y_{GLU/GLN}$ ratio in order to compensate for an increased anaplerosis. Indeed, α-LA is known to activate multiple entry-points enzymes to the TCA cycle (Solmonson & DeBerardinis, 2018). A similar conclusion was drawn by Zagari et al. (2013) who used a model of restricted mitochondrial oxidative capacity to explain the codependency of glutamine and lactate metabolisms.

Evaluating the drugs effect on mitochondrial activity homeostasis requires looking at respiratory data. In our work, the enhanced TCA activity from 5 mM DCA was confirmed by an increased total q_{O2} during exponential growth (0-72 h, Figure 4.3). However, these increased TCA fluxes resulted, at 120 h, in a mitochondrial imbalance with protons accumulation at the membrane (Rho123, Figure 4.4A) and a reduction of cellular respiration (Figure 4.3B). These results agree with the lower ATP concentrations at 5 mM DCA which were previously reported by Buchsteiner et al. (2018). At 100 µM α-LA, the stimulation of TCA cycle activity resulted in a maintained oxygen consumption rate from 0 to 120 h. However, as for our positive DCA control, a significant protons accumulation was observed at the mitochondrial membrane. This mitochondrial saturation at 100 µM α-LA coincided with increased levels of mitochondrial ROS (Figure 4.4), and proton

leak flux (Figure 4.3C), indicating extreme levels of stress coherent with the observed decrease in cell viability. Also from using Rhodamine123 staining, Hinterkörner et al. (2007) proposed aerobic glycolysis as a mitochondrial pressure relief mechanism, which can be triggered from a high mitochondrial membrane potential. Interestingly, the addition of 20 µM α-LA did not alter the respiration and proton leak rate profiles, while maintaining low mitochondrial membrane potential and ROS levels. The mitochondrial activity and redox balance are strongly dependent on α-LA. It does not only have antioxidant properties but it also acts as cofactor of many mitochondrial enzymes in addition to its action on PDH (Rochette et al., 2013). For instance, the regulation of complex I production of superoxide anion through its interaction with 2-oxoglutarate dehydrogenase (Solmonson & DeBerardinis, 2018) can account in part for the restriction in ROS production (Figure 4.4). To sum up, α-LA is efficient to manage TCA replenishment and positively regulate the mitochondrial function, but at high concentration such as 100 µM and above, significant changes in mitochondrial metabolism induce damageable stress levels.

4.7.2 Methylene blue enhances the mitochondrial capacity

MB at 1 µM clearly enhanced mitochondrial capacity, a conclusion supported by a coherent set of coordinated effects including lower lactate yield (i.e. more glycolytic flux to TCA cycle), higher glutaminolysis (i.e. more glutamate flux to TCA cycle), control level q_{O2} and mitochondrial membrane potential, and lower ROS level. MB acts as an electron shuttle bypassing complexes I to III of the ETC thus decreasing ROS production (Wen et al., 2011; Yang et al., 2017). High levels of mitochondrial ROS are associated to high proton leak rates in order to dampen ROS production, thus decreasing ATP synthesis (Brookes, 2005). From these results, we hypothesize that 1 µM MB induces an oxidoreductive "sink" at ETC that pulls on the various anaplerotic pathways to feed the TCA cycle, explaining decreased lactate and glutamate secretion rates (Figure 4.6). Such enhanced mitochondrial activity can account for the observed increase in mAb production (Figure 4.5). Interestingly, coupling α-LA to MB combines the effects of each drug, with a reduced aerobic glycolysis and low ROS levels. The signs of healthy mitochondria are confirmed by the significantly higher q_{O2} at the end of the culture (Figure 4.3), although it only translated into a 7 ± 3 % increase in mAb production.

4.8 Conclusion

Our results provide further evidences on the use of metabolic approaches to overcome Warburg effect-related limitations on mAb production by CHO cells. By up-regulating PDH, the α-lipoic acid (α-LA) drug proved efficient at redirecting anaplerotic fluxes towards mitochondria thus increasing TCA activity. However, α-LA above 100 µM disturbs the tightly regulated redox status at the ETC, inducing important stress signals, while 20 µM maintains a minimal stress level. Of interest, the use of methylene blue (MB) at 1 µM showed promising results with increased mitochondrial activity under minimal stress level, and increased mAb production. Although the combination of MB and α-LA led to a less pronounced increase of mAb production than using MB only, it improved cellular respiration. We believe both drugs can be beneficial for industrial fed-batch cultures by coordinating actions of *pushing* on pyruvate entry into mitochondria (α-LA) and *pulling* on anaplerotic pathways feeding TCA cycle while maintaining low ROS level (MB).

4.9 Aknowledgements

This project was funded by the NSERC Discovery Grant to M. Jolicoeur #RGPIN-2019-05050.

4.10 References

Ahn, W. S., & Antoniewicz, M. R. (2011). Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metab Eng, 13*(5), 598-609. doi:10.1016/j.ymben.2011.07.002

Altamirano, C., Paredes, C., Cairo, J. J., & Godia, F. (2000). Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnol Prog, 16*(1), 69-75. doi:10.1021/bp990124j

Atamna, H., Nguyen, A., Schultz, C., Boyle, K., Newberry, J., Kato, H., & Ames, B. N. (2008). Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways. *Faseb j, 22*(3), 703-712. doi:10.1096/fj.07-9610com

Barron, E. S. G. (1930). The catalytic effect of methylene blue on the oxygen consumption of tumors and normal tissues. *The Journal of Experimental Medicine, 52*(3), 447-456. doi:10.1084/jem.52.3.447

Bingham, P. M., Stuart, S. D., & Zachar, Z. (2014). Lipoic acid and lipoic acid analogs in cancer metabolism and chemotherapy. *Expert Rev Clin Pharmacol, 7*(6), 837-846. doi:10.1586/17512433.2014.966816

Brookes, P. S. (2005). Mitochondrial H+ leak and ROS generation: An odd couple. *Free Radical Biology and Medicine, 38*(1), 12-23. doi:https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.016

Buchsteiner, M., Quek, L. E., Gray, P., & Nielsen, L. K. (2018). Improving culture performance and antibody production in CHO cell culture processes by reducing the Warburg effect. *Biotechnol Bioeng, 115*(9), 2315-2327. doi:10.1002/bit.26724

Chong, W. P. K., Reddy, S. G., Yusufi, F. N. K., Lee, D.-Y., Wong, N. S. C., Heng, C. K., . . . Ho, Y. S. (2010). Metabolomics-driven approach for the improvement of Chinese hamster ovary cell growth: Overexpression of malate dehydrogenase II. *J Biotechnol, 147*(2), 116-121. doi:https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.03.018

da Veiga Moreira, J., Hamraz, M., Abolhassani, M., Schwartz, L., Jolicoeur, M., & Peres, S. (2019). Metabolic therapies inhibit tumor growth in vivo and in silico. *Sci Rep, 9*(1), 3153. doi:10.1038/s41598-019-39109-1

Deshmukh, A., Deshpande, K., Arfuso, F., Newsholme, P., & Dharmarajan, A. (2016). Cancer stem cell metabolism: a potential target for cancer therapy. *Mol Cancer, 15*(1), 69. doi:10.1186/s12943-016-0555-x

Duicu, O. M., Privistirescu, A., Wolf, A., Petrus, A., Danila, M. D., Ratiu, C. D., . . . Sturza, A. (2017). Methylene blue improves mitochondrial respiration and decreases oxidative stress in a substrate-dependent manner in diabetic rat hearts. *Can J Physiol Pharmacol, 95*(11), 1376-1382. doi:10.1139/cjpp-2017-0074

Durocher, Y., & Butler, M. (2009). Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology, 20*(6), 700-707. doi:https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.10.008

Fan, Y., Jimenez Del Val, I., Muller, C., Wagtberg Sen, J., Rasmussen, S. K., Kontoravdi, C., . . . Andersen, M. R. (2015). Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture

affects antibody production and glycosylation. *Biotechnol Bioeng, 112*(3), 521-535. doi:10.1002/bit.25450

Fogolin, M. B., Wagner, R., Etcheverrigaray, M., & Kratje, R. (2004). Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *J Biotechnol, 109*(1-2), 179-191. doi:10.1016/j.jbiotec.2003.10.035

Gagnon, M., Hiller, G., Luan, Y. T., Kittredge, A., DeFelice, J., & Drapeau, D. (2011). High-end pH-controlled delivery of glucose effectively suppresses lactate accumulation in CHO fed-batch cultures. *Biotechnol Bioeng, 108*(6), 1328-1337. doi:10.1002/bit.23072

Ghorbaniaghdam, A., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2014). An in-silico study of the regulation of CHO cells glycolysis. *J Theor Biol, 357*, 112-122. doi:10.1016/j.jtbi.2014.04.035

Glacken, M. W., Fleischaker, R. J., & Sinskey, A. J. (1986). Reduction of waste product excretion via nutrient control: Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnol Bioeng, 28*(9), 1376-1389. doi:10.1002/bit.260280912

Gorrini, C., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov, 12*(12), 931-947. doi:10.1038/nrd4002

Gupta, S. K., Srivastava, S. K., Sharma, A., Nalage, V. H., Salvi, D., Kushwaha, H., . . . Shukla, P. (2017). Metabolic engineering of CHO cells for the development of a robust protein production platform. *PLoS One, 12*(8), e0181455. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5538670/pdf/pone.0181455.pdf

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell, 144*(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

Hartley, F., Walker, T., Chung, V., & Morten, K. (2018). Mechanisms driving the lactate switch in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng, 115*(8), 1890-1903. doi:10.1002/bit.26603

Hayter, P. M., Curling, E. M., Gould, M. L., Baines, A. J., Jenkins, N., Salmon, I., . . . Bull, A. T. (1993). The effect of the dilution rate on CHO cell physiology and recombinant interferon-gamma production in glucose-limited chemostat culture. *Biotechnol Bioeng, 42*(9), 1077-1085. doi:10.1002/bit.260420909

Hinterkörner, G., Brugger, G., Müller, D., Hesse, F., Kunert, R., Katinger, H., & Borth, N. (2007). Improvement of the energy metabolism of recombinant CHO cells by cell sorting for reduced mitochondrial membrane potential. *J Biotechnol, 129*(4), 651-657. doi:https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.02.002

Ishida, S., Andreux, P., Poitry-Yamate, C., Auwerx, J., & Hanahan, D. (2013). Bioavailable copper modulates oxidative phosphorylation and growth of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A, 110*(48), 19507-19512. doi:10.1073/pnas.1318431110

Kafara, P., Icard, P., Guillamin, M., Schwartz, L., & Lincet, H. (2015). Lipoic acid decreases Mcl-1, Bcl-xL and up regulates Bim on ovarian carcinoma cells leading to cell death. *J Ovarian Res, 8*, 36. doi:10.1186/s13048-015-0165-z

Kelley, B. (2009). Industrialization of mAb production technology: the bioprocessing industry at a crossroads. *MAbs, 1*(5), 443-452. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2759494/pdf/mabs0105_0443.pdf

Kim, D. Y., Chaudhry, M. A., Kennard, M. L., Jardon, M. A., Braasch, K., Dionne, B., . . . Piret, J. M. (2013). Fed-batch CHO cell t-PA production and feed glutamine replacement to reduce ammonia production. *Biotechnol Prog, 29*(1), 165-175. doi:10.1002/btpr.1658

Kim, S. H., & Lee, G. M. (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. doi:10.1007/s00253-006-0654-5

Kleinkauf-Rocha, J., Bobermin, L. D., Machado Pde, M., Goncalves, C. A., Gottfried, C., & Quincozes-Santos, A. (2013). Lipoic acid increases glutamate uptake, glutamine synthetase activity and glutathione content in C6 astrocyte cell line. *Int J Dev Neurosci, 31*(3), 165-170. doi:10.1016/j.ijdevneu.2012.12.006

Korotchkina, L. G., Sidhu, S., & Patel, M. S. (2004). R-lipoic acid inhibits mammalian pyruvate dehydrogenase kinase. *Free Radic Res, 38*(10), 1083-1092. doi:10.1080/10715760400004168

Kuwae, S., Ohda, T., Tamashima, H., Miki, H., & Kobayashi, K. (2005). Development of a fed-batch culture process for enhanced production of recombinant human antithrombin by Chinese hamster ovary cells. *J Biosci Bioeng, 100*(5), 502-510. doi:10.1263/jbb.100.502

Lamboursain, L., St-Onge, F., & Jolicoeur, M. (2002). A lab-built respirometer for plant and animal cell culture. *Biotechnol Prog, 18*(6), 1377-1386. doi:10.1021/bp015511j

Le, H., Vishwanathan, N., Kantardjieff, A., Doo, I., Srienc, M., Zheng, X., . . . Hu, W.-S. (2013). Dynamic gene expression for metabolic engineering of mammalian cells in culture. *Metabolic Engineering, 20*, 212-220. doi:https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.09.004

Luo, J., Vijayasankaran, N., Autsen, J., Santuray, R., Hudson, T., Amanullah, A., & Li, F. (2012). Comparative metabolite analysis to understand lactate metabolism shift in Chinese hamster ovary cell culture process. *Biotechnol Bioeng, 109*(1), 146-156. doi:10.1002/bit.23291

Luo, J., Zhang, J., Ren, D., Tsai, W. L., Li, F., Amanullah, A., & Hudson, T. (2012). Probing of C-terminal lysine variation in a recombinant monoclonal antibody production using Chinese hamster ovary cells with chemically defined media. *Biotechnol Bioeng, 109*(9), 2306-2315. doi:10.1002/bit.24510

Martínez, V. S., Dietmair, S., Quek, L.-E., Hodson, M. P., Gray, P., & Nielsen, L. K. (2013). Flux balance analysis of CHO cells before and after a metabolic switch from lactate production to consumption. *Biotechnology and Bioengineering, 110*(2), 660-666. doi:10.1002/bit.24728

Michelakis, E. D., Sutendra, G., Dromparis, P., Webster, L., Haromy, A., Niven, E., . . . Petruk, K. C. (2010). Metabolic Modulation of Glioblastoma with Dichloroacetate. *Science Translational Medicine, 2*(31), 31ra34-31ra34. doi:10.1126/scitranslmed.3000677

Michelakis, E. D., Webster, L., & Mackey, J. R. (2008). Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br J Cancer, 99*(7), 989-994. doi:10.1038/sj.bjc.6604554

Niewisch, M. R., Kuci, Z., Wolburg, H., Sautter, M., Krampen, L., Deubzer, B., . . . Bruchelt, G. (2012). Influence of dichloroacetate (DCA) on lactate production and oxygen consumption in neuroblastoma cells: is DCA a suitable drug for neuroblastoma therapy? *Cell Physiol Biochem, 29*(3-4), 373-380. doi:10.1159/000338492

Oz, M., Lorke, D. E., Hasan, M., & Petroianu, G. A. (2011). Cellular and molecular actions of Methylene Blue in the nervous system. *Med Res Rev, 31*(1), 93-117. doi:10.1002/med.20177

Popp, O., Müller, D., Didzus, K., Paul, W., Lipsmeier, F., Kirchner, F., . . . Beaucamp, N. (2016). A hybrid approach identifies metabolic signatures of high-producers for chinese hamster ovary clone selection and process optimization. *Biotechnology and Bioengineering, 113*(9), 2005-2019. doi:10.1002/bit.25958

Poteet, E., Winters, A., Yan, L. J., Shufelt, K., Green, K. N., Simpkins, J. W., . . . Yang, S. H. (2012). Neuroprotective actions of methylene blue and its derivatives. *PLoS One, 7*(10), e48279. doi:10.1371/journal.pone.0048279

Qian, Y., Khattak, S. F., Xing, Z., He, A., Kayne, P. S., Qian, N. X., . . . Li, Z. J. (2011). Cell culture and gene transcription effects of copper sulfate on Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Prog, 27*(4), 1190-1194. doi:10.1002/btpr.630

Robitaille, J., Chen, J., & Jolicoeur, M. (2015). A Single Dynamic Metabolic Model Can Describe mAb Producing CHO Cell Batch and Fed-Batch Cultures on Different Culture Media. *PLoS One, 10*(9), e0136815. doi:10.1371/journal.pone.0136815

Rochette, L., Ghibu, S., Richard, C., Zeller, M., Cottin, Y., & Vergely, C. (2013). Direct and indirect antioxidant properties of alpha-lipoic acid and therapeutic potential. *Mol Nutr Food Res, 57*(1), 114-125. doi:10.1002/mnfr.201200608

Schwartz, L., Abolhassani, M., Guais, A., Sanders, E., Steyaert, J. M., Campion, F., & Israel, M. (2010). A combination of alpha lipoic acid and calcium hydroxycitrate is efficient against mouse cancer models: preliminary results. *Oncol Rep, 23*(5), 1407-1416. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20372858

Schwartz, L., Buhler, L., Icard, P., Lincet, H., & Steyaert, J. M. (2014). Metabolic treatment of cancer: intermediate results of a prospective case series. *Anticancer Res, 34*(2), 973-980. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24511042

Solmonson, A., & DeBerardinis, R. J. (2018). Lipoic acid metabolism and mitochondrial redox regulation. *J Biol Chem, 293*(20), 7522-7530. doi:10.1074/jbc.TM117.000259

Stolfa, G., Smonskey, M. T., Boniface, R., Hachmann, A.-B., Gulde, P., Joshi, A. D., . . . Campbell, A. (2018). CHO-Omics Review: The Impact of Current and Emerging Technologies on Chinese Hamster Ovary Based Bioproduction. *Biotechnology Journal, 13*(3), 1700227. doi:10.1002/biot.201700227

Toussaint, C., Henry, O., & Durocher, Y. (2016). Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures. *J Biotechnol, 217*, 122-131. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.11.010

Villacrés, C., Tayi, V. S., Lattová, E., Perreault, H., & Butler, M. (2015). Low glucose depletes glycan precursors, reduces site occupancy and galactosylation of a monoclonal antibody in CHO cell culture. *Biotechnology Journal, 10*(7), 1051-1066. doi:10.1002/biot.201400662

Walsh, G. (2018). Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat Biotechnol, 36*(12), 1136-1145. doi:10.1038/nbt.4305

Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of general physiology, 8*(6), 519-530. doi:10.1085/jgp.8.6.519

Wen, Y., Li, W., Poteet, E. C., Xie, L., Tan, C., Yan, L. J., . . . Yang, S. H. (2011). Alternative mitochondrial electron transfer as a novel strategy for neuroprotection. *J Biol Chem, 286*(18), 16504-16515. doi:10.1074/jbc.M110.208447

Wilkens, C. A., & Gerdtzen, Z. P. (2015). Comparative metabolic analysis of CHO cell clones obtained through cell engineering, for IgG productivity, growth and cell longevity. *PLoS One, 10*(3), e0119053. doi:10.1371/journal.pone.0119053

Wlaschin, K. F., & Hu, W.-S. (2007). Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport. *J Biotechnol, 131*(2), 168-176. doi:https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.06.006

Yang, S. H., Li, W., Sumien, N., Forster, M., Simpkins, J. W., & Liu, R. (2017). Alternative mitochondrial electron transfer for the treatment of neurodegenerative diseases and cancers: Methylene blue connects the dots. *Prog Neurobiol, 157*, 273-291. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.10.005

Young, J. D. (2013). Metabolic flux rewiring in mammalian cell cultures. *Current Opinion in Biotechnology, 24*(6), 1108-1115. doi:10.1016/j.copbio.2013.04.016

Yuk, I. H., Russell, S., Tang, Y., Hsu, W. T., Mauger, J. B., Aulakh, R. P., . . . Joly, J. C. (2015). Effects of copper on CHO cells: cellular requirements and product quality considerations. *Biotechnol Prog, 31*(1), 226-238. doi:10.1002/btpr.2004

Zagari, F., Jordan, M., Stettler, M., Broly, H., & Wurm, F. M. (2013). Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. *N Biotechnol, 30*(2), 238-245. doi:10.1016/j.nbt.2012.05.021

Zielke, H. R., Zielke, C. L., & Ozand, P. T. (1984). *Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells.* Paper presented at the Federation proceedings.

4.11 Supplementary Materials

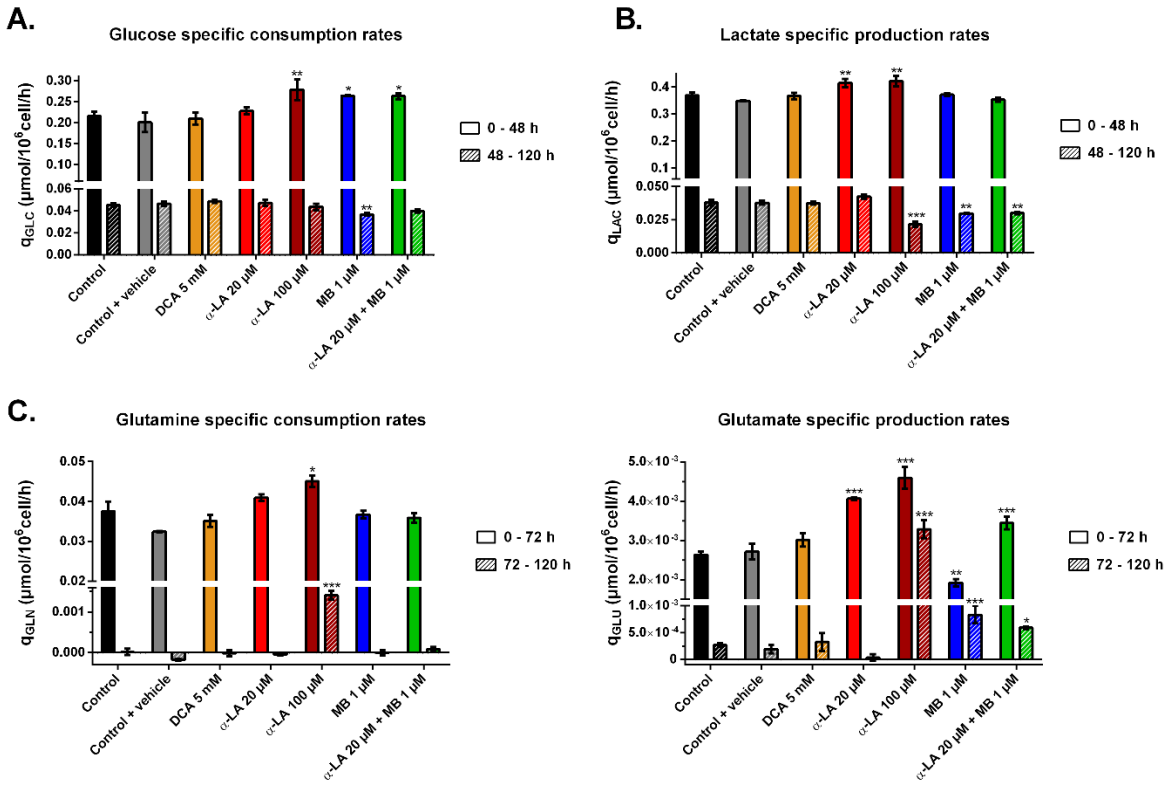

Figure 4.6. Specific consumption and production rates of glucose (A), lactate (B), glutamine (C) and glutamate (D) measured in the extracellular medium for the various drug treatments. Glycolytic specific rates q_{GLC} and q_{LAC} were calculated on 0-48 h and 48-120 h based on the metabolic shift observed at 48 h. Glutaminolytic rates q_{GLN} and q_{GLU} were calculated before (0-72 h) and after (72-120 h) glutamine depletion. All conditions were statistically compared to the control by one-way ANOVA.

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif général de la recherche présentée dans ce mémoire était d'améliorer les performances de production des cellules CHO en modulant leur métabolisme. Nous avons identifié l'effet Warburg, ou glycolyse aérobie, comme facteur limitant la productivité et testé deux drogues candidates pour rétablir la production mitochondriale d'énergie, soit l'acide lipoïque et le bleu de méthylène. Afin de tester leur efficacité, un ensemble cohérent de traits métaboliques ont été mesurée au cours de cultures en mode cuvée. Les résultats obtenus dans l'article présenté au chapitre précédent sont discutés en détails dans cette section.

5.1 Développement d'une méthode de test des drogues métaboliques

5.1.1 Adapter la dose à chaque lignée : une étape simple mais cruciale

Notre revue de littérature a permis de relever des écarts importants dans les concentrations de drogues utilisées pour différentes lignées et avec des objectifs différents (étude du métabolisme, mort cellulaire, préservation, …). Pour l'acide lipoïque utilisé *in vitro* avec des cellules de mammifères, nous avons trouvé des concentrations allant de quelques micromoles par litre (Schwartz et al., 2010) à plusieurs millimoles par litre (Mark, Chen, Steliou, Perrine, & Faller, 2003). De même, les concentrations étudiées pour le bleu de méthylène s'étendent de quelques nanomoles par litre (Xiong et al., 2016) à plusieurs millimoles par litre (Poteet et al., 2012).

Même avec des cellules similaires, comme les CHO-K1 utilisées par Buchsteiner et al. (2018) et les CHO-DXB11 que nous avons soumises à la même concentration de 5 mM DCA, des différences notables de comportement sont apparues. Plusieurs éléments de la réponse métabolique obtenus dans l'article de Buchsteiner et al., en particulier la réduction du taux spécifique de production de lactate, n'ont pas été retrouvés lorsque nous avons répété la mesure sur notre lignée (Figure 4.6 et Figure 4.2). Une telle observation souligne d'autant plus l'effet de la lignée cellulaire (i.e. variabilité génétique inter-lignées) sur l'activité effective des drogues. Ce résultat appelle à une optimisation systématique des doses sur chaque lignée avant de lancer une recherche ou un bioprocédé industriel.

L'intérêt majeur d'une approche par supplémentation de drogues dans le cadre de la production industrielle est sa facilité d'adaptation à tout type de procédé. Dans notre étude dose-réponse, nous nous sommes limités à l'échelle de laboratoire, soit en plaques 6-puits de faibles volumes de culture (~ 3 mL). Malgré la simplicité du dispositif, toutes les tendances observées pour la croissance et pour la viabilité ont été confirmées par la suite en culture à moyenne échelle en flacons agités de 60 mL de culture (Figure 4.1). Cette méthode semble donc fiable pour mesurer le critère que nous avons choisi, soit la concentration en drogue la plus forte qui n'affecte ni la croissance ni la viabilité cellulaire. Simple, peu coûteuse et reproductible, une telle étape d'optimisation représente un investissement de temps et de ressources minimes par rapport aux gains potentiels en productivité attendus.

5.1.2 Biomarqueurs métaboliques de l'effet Warburg

L'originalité de notre démarche réside dans le fait qu'elle combine des paramètres mesurés de manière classique dans le suivi métabolique des cultures de cellules de mammifères (croissance, viabilité, concentrations en métabolites extracellulaires clés et respiration) avec des marqueurs de l'activité mitochondriale à l'échelle de chaque cellule.

L'activité globale de la voie de la glycolyse peut être estimée par la mesure des taux spécifiques de consommation du glucose (q_{GLC}) et de production du lactate (q_{LAC}), ainsi qu'en caractérisant la répartition de ces deux flux par le ratio métabolique $Y_{LAC/GLC}$. Par contre, la nature même du cycle TCA rend l'estimation des flux mis en jeu plus complexe : chaque intermédiaire est directement produit et consommé lorsque le cycle tourne. Même si l'on connaît la concentration d'un métabolite intermédiaire dans le temps, sa concentration sera constante si ses taux de production et de consommation sont égaux. Deux approches sont souvent proposées pour contourner ce problème. Dans le cas de cultures en bioréacteurs, il est possible de facilement mesurer le taux de consommation d'oxygène, et de le considérer comme représentatif de l'activité mitochondriale (Handlogten et al., 2018; Huang et al., 2010). Avec une attention particulière, cette approche peut être mise en place pour des cultures à l'échelle du laboratoire : on peut utiliser des appareils dédiés (e.g. Seahorse Inc., OroBoros Inc., …), des tests en microplaques avec des marqueurs fluorescents de l'oxygène (Dmitriev & Papkovsky, 2015) ou encore une méthode manuelle mise au point par notre laboratoire (Lamboursain, St-Onge, & Jolicoeur, 2002). Dans tous les cas, cette première approche repose sur un seul indicateur pour quantifier l'activité de tout une organelle et fonction.

La deuxième approche très répandue utilise la connaissance précise que nous avons du métabolisme des cellules CHO pour prendre en compte les principales réactions dans un modèle mathématique en régime statique (Martínez et al., 2013; Templeton et al., 2013) ou dynamique (Ahn & Antoniewicz, 2011; Ghorbaniaghdam, Chen, Henry, & Jolicoeur, 2014; Robitaille et al., 2015). Ces méthodes puissantes permettent, en mesurant les concentrations de nombreux métabolites intra et extracellulaires, d'estimer les flux de chaque réaction tant intra qu'extracellulaire. Il ne faut cependant pas oublier qu'ils reposent sur des hypothèses simplificatrices : un choix limité des réactions prises en compte dans le modèle face à l'échelle du génome, résolution numérique des équations différentielles (i.e. bilans sur chacune des espèces), choix d'une solution parmi plusieurs minima locaux lors de l'optimisation des paramètres car ces systèmes sont largement sous-déterminés et ne peuvent mener à une solution unique, …

Notre approche vient donc en complément des méthodes existantes de modélisation. Plutôt que de vouloir résoudre chaque flux métabolique, nous avons choisi d'étudier dans le détail les marqueurs biologiques directs de l'activité mitochondriale.

À l'échelle de la culture, nous avons utilisé les méthodes classiques de mesure de croissance, de viabilité et de concentrations en glucose, lactate, glutamine et glutamate. Celles-ci nous donnent des informations globales sur la santé des cellules et sur l'activité des voies de la glycolyse et de la glutaminolyse qui alimentent également le cycle TCA. Elles sont à mettre en relation avec la mesure de la consommation d'oxygène, que nous avons affinée en séparant les composantes de la respiration et de fuite mitochondriale (oxydation non phosphorylative) grâce à l'oligomycine A, antibiotique qui inhibe la respiration en se liant à l'ATP-synthase (Criddle, Packer, & Shieh, 1977; Hong & Pedersen, 2008). Ainsi, nous obtenons un marqueur macroscopique de l'activité, de l'efficacité de la chaîne de transport des électrons et de la bonne condition de la membrane mitochondriale.

L'indicateur final de performance de nos cultures est bien entendu la production d'anticorps. En mode cuvée, pour une même quantité initiale de milieu de culture, nous avons choisi de comparer les titres maximaux obtenus après 5 jours de culture. On observe à la Figure 4.5 que les concentrations mesurées au bout de 120 h sont légèrement moins élevées que celles mesurées à 96 h. Ce résultat n'a pas été observé précédemment avec la même lignée (Robitaille et al., 2015). Il pourrait s'expliquer par un biais de mesure causé par le dépôt des échantillons du cinquième jour

en dernier sur la plaque d'ELISA (donc un temps de contact plus court avec l'anticorps de capture avant rinçage), ce qui serait vérifiable en utilisant une autre méthode de dosage comme la chromatographie liquide suivie de spectrométrie de masse (HPLC-MS) disponible dans notre laboratoire. Il se peut aussi que lors des manipulations, à partir d'une concentration élevée, les mAbs aient formé des agrégats qui diminuent artificiellement la concentration mesurée. Même si les concentrations auxquelles nous travaillons sont relativement faibles par rapport à celles de l'industrie, les phénomènes d'agrégation sont fréquents et dépendent de nombreux facteurs dont la composition du milieu qui varie beaucoup en fin de culture (Cromwell, Hilario, & Jacobson, 2006).

À l'échelle de la cellule, nous avons mesuré par cytométrie de flux deux marqueurs fluorescents de l'activité mitochondriale. Le premier est la Rhodamine123 qui donne accès au potentiel membranaire mitochondrial : sa fluorescence reflète le gradient de protons accumulés dans l'espace intermembranaire suite aux réactions redox ayant lieu à la membrane mitochondriale, alimentées par les NADH et $FADH_2$ générés par le cycle TCA. Le deuxième, MitoSOX, cible les ions superoxydes formés à la mitochondrie. Ces ROS sont le signe normal de l'activité mitochondriale mais, à hautes concentrations, ils constituent un signal de stress et sont dangereux pour la cellule (Brookes, 2005; Puleston, 2015; S. Zhang et al., 2015). Ils nous donnent ainsi un indicateur du niveau de stress mitochondrial relatif à son niveau d'activité.

Pris individuellement, les marqueurs choisis ne donnent pas de réponse absolue quant à l'état métabolique des cellules. Par exemple, un potentiel membranaire mitochondrial élevé peut être le signe d'une activité mitochondriale accrue (Puleston, 2015; Zagari et al., 2013) ou bien de l'accumulation de protons lorsque la mitochondrie est surchargée (Brookes, 2005; Hinterkörner et al., 2007). C'est en combinant les effets significatifs mesurés sur chaque indicateur que nous avons pu mettre en place, nous allons le voir, un raisonnement cohérent pour expliquer l'effet des traitements.

En définitive, en croisant les marqueurs métaboliques à l'échelle de la culture et de la cellule, nous pouvons avancer des hypothèses cohérentes pour expliquer nos observations et proposer des stratégies visant à diminuer l'effet Warburg afin d'augmenter la production en culture. Cette approche est complémentaire d'une approche par mesure des concentrations en métabolites et modélisation car elle s'appuie sur des indicateurs biologiques découlant du comportement métabolique de la cellule.

5.2 Stimuler le cycle TCA ne suffit pas pour abolir l'effet Warburg

5.2.1 L'acide lipoïque supporte l'activité du cycle TCA

Les mécanismes d'action proposés pour l'α-LA (Korotchkina et al., 2004; Schwartz et al., 2010; Shay, Moreau, Smith, Smith, & Hagen, 2009) et le DCA (Niewisch et al., 2012; Ana Sofia Rodrigues et al., 2015; Stacpoole et al., 1988) décrivent une activation de la PDH, orientant le pyruvate vers le cycle TCA. On s'attend donc à ce que la proportion du pyruvate transformé en lactate diminue. Pour estimer cette proportion, on calcule le ratio du taux spécifique de consommation du glucose par rapport au taux spécifique de production du lactate, soit le rendement glycolytique $Y_{LAC/GLC}$. Dans le cas idéal ou l'ensemble du glucose est transformé en pyruvate et qu'il en est la seule source (voie glycolytique parfaitement linéaire), on obtient un maximum de 2 moles de pyruvate par mole de glucose, soit un $Y_{LAC/GLC}$ maximal de 2 mol/mol lorsque tout le pyruvate est transformé en lactate par la LDH.

Une diminution de la production de lactate est ainsi observée par l'équipe de Buchsteiner et al. (2018) en soumettant une lignée CHO-K1 à 5 mM DCA. Cependant, nos données ne montrent aucune différence significative sur $Y_{LAC/GLC}$ lorsqu'on traite la lignée CHO-DXB11 avec 5 mM DCA ou 20 µM α-LA. Il faut employer une dose élevée de 100 µM α-LA pour observer l'effet attendu de diminution du rendement $Y_{LAC/GLC}$ (Figure 4.2), effet significatif de 48 h à 120 h. Même si elle n'aboutit pas toujours à la production de plus de lactate, la voie de la glycolyse apparaît stimulée chez les cellules traitées par α-LA. En effet une consommation de glucose accrue en début de culture pour des doses de 20 µM et 100 µM mène dans les deux cas à une augmentation de la production spécifique de lactate de 0 à 48 h (Figure 4.6). De manière générale, les mesures du glucose et du lactate extracellulaires nous indiquent que, s'il est possible de diminuer le $Y_{LAC/GLC}$ et la quantité de lactate extracellulaire avec 100 µM α-LA, un tel effet n'est pas observé à 20 µM α-LA et à 5 mM DCA.

Pour autant, en mesurant de la même manière le rendement de la glutaminolyse $Y_{GLU/GLN}$, on trouve un indice indirect soutenant l'hypothèse d'une participation accrue de la glycolyse à l'approvisionnement du cycle TCA. En effet, lorsque les cellules sont traitées avec 5 mM DCA, 20 µM α-LA et 100 µM α-LA, on constate une augmentation respective de 24 %, 43 % et 48 % de

$Y_{GLU/GLN}$ (Figure 4.2), soit de la part de la glutamine non utilisée pour alimenter le cycle TCA et ressortant sous forme de glutamate extracellulaire.

La glutaminolyse est décrite comme la voie anaplérotique principale chez CHO (Popp et al., 2016; Quek, Dietmair, Kromer, & Nielsen, 2010; Zielke, Zielke, & Ozand, 1984). La glutamine importée dans la cellule est transformée en glutamate, qui est à son tour déversé dans le cycle TCA sous forme d'α-KT. Plusieurs études établissent des liens entre cette voie métabolique, la glycolyse et la production de lactate. Si le cycle TCA est déjà suffisamment approvisionné par le pyruvate, il a été démontré que les CHOs pouvaient compenser par une diminution de la glutaminolyse pour maintenir une activité globale du cycle TCA constante (Martínez et al., 2013; Zagari et al., 2013). La Figure 5.1,extraite de l'article de Martínez et al., montre les différences entre des cellules fortement productrices de lactate (en bleu) et d'autres qui au contraire assimilent le lactate, le transforment en pyruvate et l'adressent à la mitochondrie (en rouge). Elle permet de visualiser l'équilibre qui s'établit entre les différents flux métaboliques pour aboutir à une activité constante du cycle TCA. Zagari et al. (2013) expliquent ce comportement par la limitation de la capacité oxydative mitochondriale.

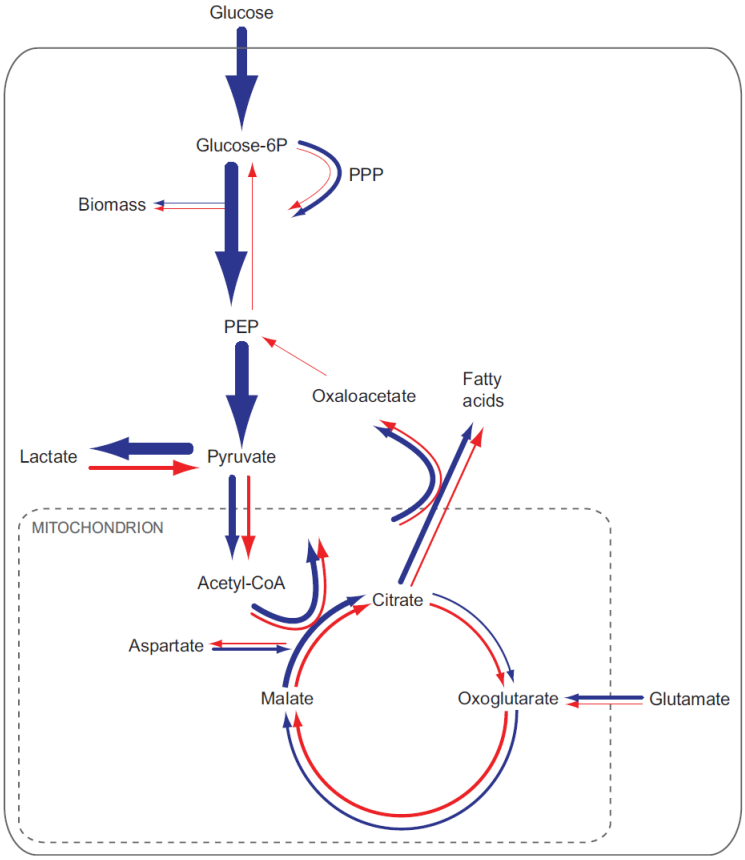

Figure 5.1. Changements métaboliques majeurs entre les cellules productrices (bleu) et les cellules consommatrices (rouge) de lactate. L'épaisseur des flèches indique l'importance relative des flux métaboliques dans chacun des états métaboliques. Tiré de (Martínez et al., 2013).

La diminution de la glutaminolyse observée lorsque nous avons traité les CHO-DXB11 par des activateurs de la PDH concorde avec ces résultats. Elle nous oriente vers l'hypothèse selon laquelle les drogues provoquent une augmentation de l'approvisionnement du cycle TCA par la glycolyse ou d'autres voies anaplérotiques, compensée via la diminution de la glutaminolyse en raison de la limitation de la capacité mitochondriale. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons utilisé les marqueurs d'activité mitochondriale présentés précédemment.

5.2.2 Limitations de la capacité mitochondriale

Nos données de respirométrie nous donnent accès, au niveau macroscopique, à l'activité de phosphorylation oxydative (OxPhos) de la mitochondrie, en séparant la composante $q_{O2,resp}$,

participant à la production d'ATP, de la composante $q_{O2,leak}$, issue de la fuite des protons et électrons à la membrane, évaluée grâce à l'inhibiteur d'ATP-synthase Oligomycine A (Figure 4.3). On complète ce portrait de l'activité OxPhos par la mesure du potentiel membranaire mitochondrial (Rhodamine123) et de la production de ROS (MitoSOX) grâce à la cytométrie de flux (Figure 4.4).

Dans le cas du DCA, l'augmentation, pendant la phase de croissance, des taux de consommation spécifiques d'O_2 (surtout la part respiratoire $q_{O2,resp}$) va dans le sens d'une activité mitochondriale accrue. Cependant, cette augmentation n'est pas maintenue : après 72 h les cultures DCA retombent aux niveaux bas de respiration observés dans le contrôle. La diminution finale d'activité respiratoire est concomitante à une augmentation anormale du potentiel membranaire mitochondrial (Figure 4.4), signe d'une accumulation de protons dans l'espace intermembranaire qui ne sont pas utilisés pour soutenir la régénération de l'ATP. L'activation de l'enzyme PDH par le DCA ne semble ainsi pas suffire à stimuler durablement la production énergétique mitochondriale. De la même manière, Buchsteiner et al. (2018) observent une légère diminution de la production d'ATP en présence de DCA et concluent que la drogue ne suffit pas à augmenter la capacité de phosphorylation oxydative des CHOs.

En utilisant l'acide lipoïque à haute dose (100 µM) qui nous a permis de diminuer la production spécifique de lactate, on arrive à obtenir un effet significatif sur les taux de respiration spécifiques. Ceux-ci sont maintenus globalement constants jusqu'à la fin de la culture, contrairement au contrôle dont le $q_{O2,resp}$ est réduit d'un facteur 10 entre 24 h et 120 h. Cependant, cette augmentation artificielle de la respiration se fait au prix de signaux de stress importants et coordonnés. L'accumulation de protons à la membrane mitochondriale est similaire en amplitude à celle obtenue avec le DCA (Figure 4.4) et elle s'accompagne d'une fuite mitochondriale importante (Figure 4.3), d'une explosion des ROS (Figure 4.4) et d'une forte mortalité cellulaire (Figure 4.2).

On propose d'attribuer un tel ensemble de signaux à une surcharge mitochondriale. En effet, un potentiel membranaire mitochondrial élevé est associé à de hauts niveaux de production de ROS nocifs pour la cellule (Korshunov, Skulachev, & Starkov, 1997; Suski et al., 2012). La fuite mitochondriale peut alors être vue comme un mécanisme de soupape de décompression : lorsque la capacité mitochondriale est saturée, une partie du potentiel membranaire doit être dégagée sans produire d'ATP pour éviter les dommages oxydatifs (Brookes, 2005; Cadenas, 2018). Ainsi, Hinterkörner et al. (2007) vont jusqu'à considérer un potentiel mitochondrial élevé comme

l'indicateur d'un possible défaut mitochondrial qui entraîne la glycolyse aérobie. Ils utilisent de hauts niveaux de fluorescence de la Rhodamine123 comme crible pour différencier les lignées CHO fortement glycolytiques (Hinterkörner et al., 2007). Dans notre cas, les cultures traitées par 100 µM d'α-LA présentent à la fois les signes d'une chaîne de transport des électrons très stimulée (respiration accrue, potentiel mitochondrial élevé) et d'un fort stress mitochondrial (fuite importante, production de ROS). La stimulation artificielle du cycle TCA engendre un signal de stress qui a des répercussions négatives sur la performance globale de la culture : diminution du taux de croissance, augmentation de la mortalité cellulaire (Figure 4.2) et baisse de la production d'anticorps (Figure 4.5).

En utilisant une concentration d'α-LA de 20 µM, on observe des effets radicalement différents. À une concentration modérée, l'α-LA réduit le potentiel mitochondrial et empêche la production excessive de ROS en fin de culture (Figure 4.4), sans pour autant affecter la respiration (Figure 4.3). La croissance (Figure 4.2) et la production de mAbs (Figure 4.5) n'étant pas non plus perturbées, il ne semble pas que la réduction de son potentiel membranaire empêche la mitochondrie de produire assez d'énergie pour subvenir aux besoins de la cellule.

Ce fonctionnement « apaisé » de la mitochondrie semble être le résultat d'une action coordonnée de régulation d'α-LA sur plusieurs plans. Les propriétés antioxydantes largement documentées d'α-LA (Biewenga et al., 1997; Rochette et al., 2013; Shay et al., 2009) expliquent la diminution globale des signaux de stress oxydatif (Figure 4.4). Outre la PDH, α-LA agit sur de nombreuses cibles en tant que cofacteur enzymatique, en particulier sur les complexes de la famille des *2-ketoacid dehydrogenase* (Mayr, Feichtinger, Tort, Ribes, & Sperl, 2014; Solmonson & DeBerardinis, 2018). Ces enzymes interagissent avec la chaîne de transport des électrons, avec par exemple la 2-oxoglutarate capable de se lier au complexe I (Fukushima, Decker, Anderson, & Spivey, 1989) et d'en diminuer la production de ROS. Enfin, comme le montre la Figure 5.2, elles alimentent le cycle TCA à partir de voies métaboliques annexes (Solmonson & DeBerardinis, 2018). Si la glycolyse et la glutaminolyse sont habituellement les deux voies anaplérotiques prépondérantes chez CHO, il n'est pas exclu que la supplémentation d'acide lipoïque active le cycle TCA non seulement via la PDH, mais aussi via d'autres enzymes de cette famille, expliquant l'effet non systématique sur le rendement $Y_{LAC/GLC}$.

Le résultat de cette régulation multiple de la mitochondrie est que, tout en sollicitant moins la glutaminolyse pour alimenter le cycle TCA, les cultures traitées par 20 µM α-LA sont capables de garantir des niveaux d'OxPhos (Figure 4.3) et de production (Figure 4.5) similaires au contrôle tout en diminuant les signaux de stress mitochondriaux.

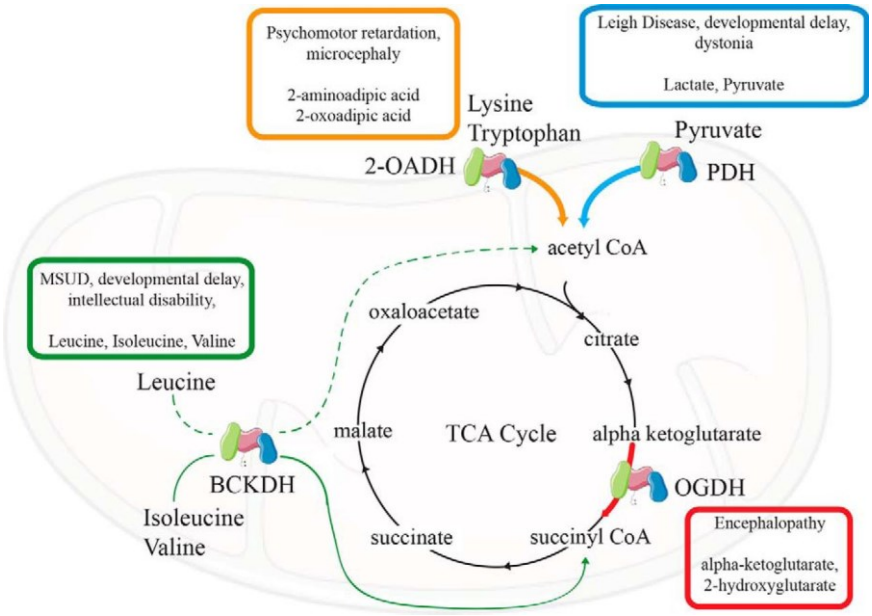

Figure 5.2. Lien entre les 2-ketoacid dehydrogenases mitochondriales et le cycle TCA. Les enzymes 2-OADH (2-oxoadipate dehydrogenase), BCKDH (branched-chain ketoacid dehydrogenase), OGDH (α-ketoglutarate dehydrogenase) et PDH (pyruvate dehydrogenase) contribuent à diverses voies métaboliques dont les produits peuvent alimenter le cycle TCA. Tiré de (Solmonson & DeBerardinis, 2018)

On en conclut que l'acide lipoïque a un effet de régulation globale de la mitochondrie et qu'il provoque bien l'activation du cycle TCA en l'approvisionnant via une ou plusieurs voies autres que la glutaminolyse. L'analyse de nos données expérimentales, conçues pour capturer un effet sur la production de lactate, n'a pas pu nous permettre de différencier la contribution exacte de chacune de ces voies et appelle à des analyses futures complémentaires. Pour autant, il est clair que l'activation artificielle de la production d'intermédiaires redox dans le cycle TCA ne suffit pas à engendrer un taux de régénération accru d'ATP à la membrane mitochondriale. On voit apparaître un phénomène de saturation mitochondriale à partir de 100 µM d'α-LA qui cause un déséquilibre mitochondrial et génère des signaux forts de stress cellulaire.

5.2.3 Mode d'administration de l'acide lipoïque

La condition « Contrôle + véhicule » a été ajoutée à nos expériences pour vérifier que l'éthanol, ajouté pour solubiliser l'acide lipoïque, ne perturbait pas le métabolisme en soi. La concentration utilisée de 0,1 % correspond à la concentration maximale d'éthanol utilisée, résultant de l'ajout d'acide lipoïque à 100 µM. Plusieurs facteurs suggèrent une métabolisation de l'éthanol, dont en particulier une diminution significative de la glutaminolyse (Figure 4.2) et un clair effet négatif sur la production (Figure 4.5). Le véhicule choisi peut donc être considéré comme un facteur pouvant conférer un biais à nos résultats. L'analyse statistique de la différence entre les conditions « véhicule seul » et « véhicule + acide lipoïque » a permis de vérifier que les effets observés avec les drogues étaient significativement différents de ceux de l'éthanol seul. Cependant, si la dissolution dans l'éthanol était nécessaire à plusieurs centaines de micromoles par litre, à des concentrations plus faibles de quelques dizaines de micromoles par litre, il est possible de dissoudre directement l'acide lipoïque dans le milieu de culture. Une utilisation de l'acide lipoïque à plus faibles concentrations, en multipliant les ajouts en cours de culture par exemple, permettrait à la fois d'éviter les problèmes liés à la métabolisation de l'éthanol et de diminuer le stress cellulaire lié à l'ajout de drogues au moment de l'inoculation.

Dans le cas où la solubilisation serait trop contraignante industriellement aux concentrations optimales de la lignée de travail, il serait envisageable d'utiliser des dérivés de l'acide lipoïque modifiés pour résoudre les problèmes de solubilité et de stabilité. Plusieurs brevets ont été déposés en ce sens, listés dans une revue récente (Koufaki, 2014). La plupart des brevets déclarent des effets métaboliques identiques à l'acide lipoïque pour une administration facilitée : utiliser de telles formulations semble séduisant dans le cadre la préparation industrielle du milieu de culture, mais une vérification préalable de leur effet demeure indispensable.

5.3 Le bleu de méthylène libère la capacité mitochondriale

5.3.1 Activation des voies anaplérotiques

Lors de l'ajout de MB à 1 µM, le premier effet constaté en début de culture est celui d'une augmentation de la quantité de pyruvate adressée à la mitochondrie, que l'on observe à la fois par une augmentation du taux de consommation spécifique du glucose q_{GLC} (Figure 4.6) et une diminution du rendement $Y_{LAC/GLC}$ (Figure 4.2). Il s'accompagne d'une stimulation claire de la

voie de la glutaminolyse, démontrée par une diminution significative de la part de glutamine ressortant sous forme de glutamate ($Y_{GLU/GLN,}$ Figure 4.2).

Contrairement à l'α-LA et au DCA, le MB permet l'activation *simultanée* des deux voies anaplérotiques principales. Nous avons proposé dans la section précédente qu'une limitation de la capacité mitochondriale était à l'origine du recours exclusif à l'une ou l'autre de ces deux voies. Leur activation simultanée pourrait donc être le signe d'un accroissement de la capacité mitochondriale, comme « appel d'air » qui tirerait les flux anaplérotiques vers la mitochondrie. C'est ce qui est suggéré par un ensemble d'études qui démontrent une respiration mitochondriale plus importante après ajout *in vitro* de MB (Atamna et al., 2008; Barron, 1930; Duicu et al., 2017; Poteet et al., 2012).

Lorsqu'on combine le MB à 20 µM α-LA, les effets respectifs des deux drogues se superposent. On conserve l'effet du MB sur la glycolyse avec une diminution de $Y_{LAC/GLC}$ (Figure 4.2) et un influx de glucose accru (Figure 4.6), mais on diminue aussi fortement la glutaminolyse, avec un $Y_{GLU/GLN}$ similaire à celui observé avec 20 µM d'α-LA seul (Figure 4.2). Partant de l'observation du rendement glycolytique et des hypothèses proposées pour l'action d'α-LA, il semble que la stimulation des autres voies anaplérotiques et la régulation mitochondriale par α-LA suffise à combler la capacité mitochondriale dans ce cas.

5.3.2 Un fonctionnement mitochondrial accru qui soutient la production

Pour confirmer l'hypothèse d'accroissement de la capacité mitochondriale par le MB, nous avons utilisé les données expérimentales touchant directement à la phosphorylation oxydative.

Au niveau de la consommation d'oxygène, le MB donne des profils similaires à ceux du contrôle, tant pour la part respiratoire que pour la part de fuite mitochondriale (Figure 4.3). Ce profil respiratoire s'accompagne d'un potentiel membranaire mitochondrial similaire au contrôle (Figure 4.4A) mais avec une production de ROS significativement diminuée en fin de culture (Figure 4.4B). En combinaison avec 20 µM α-LA, les modifications métaboliques provoquent une légère augmentation du potentiel mitochondrial, principalement en début de culture (Figure 4.4), sans pour autant causer de production de ROS. La combinaison des deux drogues permet de pomper plus de protons dans l'espace intermembranaire mais, contrairement au DCA et à l'α-LA 100 µM, des niveaux significativement plus bas de ROS sont maintenus (Figure 4.4B). Ce potentiel accru

sans signaux de stress se traduit par une restauration partielle de la capacité respiratoire en fin de culture, avec un $q_{O2,resp}$ 5,6 fois plus élevé que celui du contrôle à 120 h, pour un niveau de $q_{O2,leak}$ légèrement plus faible (Figure 4.3).

Ces résultats de diminution du stress mitochondrial vont dans le sens du mode de fonctionnement proposé par Young et al. pour le MB (2017). Le MB agit comme un transporteur alternatif d'électrons entre les complexes I et III de la chaîne de transport des électrons, principaux responsables de la génération de ROS comme l'ion superoxyde à la membrane mitochondriale (Brookes, 2005; Cadenas, 2018; Murphy, 2009). Ainsi, la drogue alimente artificiellement le complexe IV (cytochrome *c* oxydase, responsable de la consommation d'O_2) tout en maintenant l'acheminement des protons à travers la membrane par les complexes I et IV (Figure 2.11), expliquant nos observations d'un potentiel maintenu pour une faible production de ROS.

Les marqueurs moléculaires de l'activité mitochondriale et l'activation simultanée de la glycolyse et de la glutaminolyse vont dans le sens d'une meilleure production d'énergie par la mitochondrie en présence de 1 µM MB. La mitochondrie, réactivée et non saturée, appelle et peut donc soutenir l'apport supplémentaire en NADH des réactions anaplérotiques. L'amélioration global du fonctionnement énergétique se traduit directement sur la production en anticorps, avec un titre final augmenté de 24 % par rapport au contrôle sans MB.

En combinaison avec l'α-LA, l'augmentation de la production est moins marquée (autour de 7 %). Cependant, la plupart des effets métaboliques positifs, et plus particulièrement le rétablissement de la respiration, sont notés après la phase de croissance. En mode cuvée, ce moment correspond à celui de la fin de la culture car les nutriments disponibles dans le milieu sont épuisés. Il y aurait donc un intérêt particulier à observer si la stimulation mitochondriale observée avec le MB ou sa combinaison avec α-LA conduit à un accroissement de la productivité en mode cuvée alimentée, lorsqu'on évite l'épuisement des nutriments et permet une phase de production prolongée après la phase de croissance.

CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

En conclusion de ce mémoire, partant du constat que l'effet Warburg est un facteur limitant clé dans les bioprocédés industriels basés sur CHO, nous avons proposé une stratégie de supplémentation du milieu par des drogues simples, peu coûteuses et déjà approuvées dans un contexte humain, pour moduler le métabolisme des cellules et en stimuler la production d'anticorps monoclonaux. Cette stratégie de thérapie métabolique appliquée aux cellules CHO est novatrice, avec peu d'articles déjà publiés en ce sens, au meilleur de notre connaissance.

En suivant un ensemble d'indicateurs micro et macroscopiques de l'activité métabolique des cellules en culture, et appuyés par un corpus de littérature important issu tant du domaine des bioprocédés que de celui du cancer, nous avons pu avancer des hypothèses crédibles pour expliquer l'effet de l'acide lipoïque, du bleu de méthylène et de leur combinaison sur nos cultures. L'acide lipoïque semble « pousser » sur les flux anaplérotiques vers le cycle TCA, au risque de surcharger la mitochondrie par une trop forte production d'intermédiaires réactionnels. Le bleu de méthylène, en augmentant la capacité mitochondriale, « tire », lui, sur les différentes voies anaplérotiques, augmentant la production d'anticorps en mode cuvée. En combinant les deux drogues, nous avons obtenu des effets prometteurs, avec une capacité respiratoire accrue par rapport au contrôle en fin de culture.

Plusieurs aspects de ce projet appellent à poursuivre dans cette voie. Nous avons pu caractériser l'état de la mitochondrie sous l'effet de chaque drogue, mais il reste à comprendre plus précisément quelles voies anaplérotiques elles activent ou inactivent. Une analyse métabolique approfondie complèterait cet aspect de notre étude. On pourrait en particulier suivre les concentrations d'autres acides aminés participant à l'alimentation du cycle TCA, les ratios de concentrations entre ATP et ADP (représentatifs de l'état énergétique de la cellule), entre NAD et NADH ou NADP et NADPH (représentatifs de son état oxydo-réductif), de l'ammonium issu de la glutaminolyse, ou d'autres intermédiaires intracellulaires clés. Ces données pourraient ensuite être intégrées dans un modèle dynamique du métabolisme, une compétence du laboratoire. Cette double approche permettrait de gagner en puissance, nos indicateurs phénotypiques étant parfaitement intégrables à un tel modèle métabolique pour améliorer sa fiabilité et sa prédictivité.

Étant donné que l'amélioration des performances de production et l'augmentation de la respiration cellulaire ont eu lieu principalement en fin de phase de croissance, il semblerait particulièrement intéressant de poursuivre les expériences en mode cuvée alimentée. En maintenant la culture en phase de production sur le long terme, on s'abstient de la demande énergétique élevée de la phase de croissance, ce qui nous permet distinguer les effets des drogues sur la seule production de protéines. On pourrait aussi mieux comprendre si la limitation énergétique est le facteur clé entravant la productivité, ou bien si l'augmentation de la production observée grâce aux drogues est due à d'autres changements métaboliques comme la diminution du stress mitochondrial ou le meilleur approvisionnement de certaines voies anaboliques.

Notre travail s'est limité à l'étude d'une lignée cellulaire particulière, avec un seul milieu de culture et selon le mode de culture cuvée. Nous avons souligné la variabilité de l'effet des drogues en fonction des lignées utilisées et des conditions de culture, avec l'exemple du dichloroacétate dont les résultats dans notre étude différaient sur certains points de ceux obtenus en 2018 par l'équipe de Buchsteiner et ses collaborateurs. Il serait donc naturel de confirmer par la suite l'effet des drogues sur d'autres lignées cellulaires (CHO ou autres), dans d'autres milieux de culture et à plus grande échelle. En effet, pour se rapprocher des problématiques industrielles réelles, il reste à démontrer que les effets des drogues s'additionnent aux stratégies d'optimisation déjà employées dans les procédés industriels. Une augmentation de la production de 24 % comme celle que nous avons observée avec le bleu de méthylène, si elle est transposée à des lignées hautement productrices cultivées dans des milieux industriels optimisés, est un gain loin d'être négligeable à grande échelle.

Enfin, dans un contexte biopharmaceutique, il est indispensable de vérifier que la qualité des produits demeure inaltérée. L'ajout des drogues influence la consommation des sources de carbones et les niveaux de stress des cellules productrices, ce qui peut modifier en aval la maturation des protéines. Dans le cadre d'un développement de la technologie au niveau industriel, il faudrait vérifier que les protéines produites sont conformes aux standards exigés, par exemple en comparant leurs profils de glycosylation avec ceux des produits obtenus sans drogues ou en testant directement leur activité biologique. La vérification de ces critères, associée au fait que les drogues choisies sont déjà reconnues comme non dangereuses pour l'humain, serait un premier pas encourageant pour l'approbation dans le domaine pharmaceutique et donnerait à nos travaux une portée plus large, les rapprochant des défis industriels qui ont motivé notre démarche.

RÉFÉRENCES

Ahn, W. S., & Antoniewicz, M. R. (2011). Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metab Eng, 13*(5), 598-609. doi:10.1016/j.ymben.2011.07.002

Ahn, W. S., & Antoniewicz, M. R. (2013). Parallel labeling experiments with [1,2-13C]glucose and [U-13C]glutamine provide new insights into CHO cell metabolism. *Metabolic Engineering, 15*, 34-47. doi:https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.10.001

Akbari, M., Ostadmohammadi, V., Lankarani, K. B., Tabrizi, R., Kolahdooz, F., Khatibi, S. R., & Asemi, Z. (2018). The effects of alpha-lipoic acid supplementation on glucose control and lipid profiles among patients with metabolic diseases: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Metabolism, 87*, 56-69. doi:10.1016/j.metabol.2018.07.002

Altamirano, C., Cairo, J. J., & Godia, F. (2001). Decoupling cell growth and product formation in Chinese hamster ovary cells through metabolic control. *Biotechnol Bioeng, 76*(4), 351-360.

Altamirano, C., Paredes, C., Cairo, J. J., & Godia, F. (2000). Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnol Prog, 16*(1), 69-75. doi:10.1021/bp990124j

Arigony, A. L., de Oliveira, I. M., Machado, M., Bordin, D. L., Bergter, L., Pra, D., & Henriques, J. A. (2013). The influence of micronutrients in cell culture: a reflection on viability and genomic stability. *Biomed Res Int, 2013*, 597282. doi:10.1155/2013/597282

Atamna, H., Nguyen, A., Schultz, C., Boyle, K., Newberry, J., Kato, H., & Ames, B. N. (2008). Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways. *Faseb j, 22*(3), 703-712. doi:10.1096/fj.07-9610com

Barron, E. S. G. (1930). The catalytic effect of methylene blue on the oxygen consumption of tumors and normal tissues. *The Journal of Experimental Medicine, 52*(3), 447-456. doi:10.1084/jem.52.3.447

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2012). Biochemistry/Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer; with Gregory J. Gatto, Jr. In: New York: WH Freeman.

Biewenga, G. P., Haenen, G. R. M. M., & Bast, A. (1997). The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology: The Vascular System, 29*(3), 315-331. doi:https://doi.org/10.1016/S0306-3623(96)00474-0

Bollati-Fogolin, M., Forno, G., Nimtz, M., Conradt, H. S., Etcheverrigaray, M., & Kratje, R. (2005). Temperature reduction in cultures of hGM-CSF-expressing CHO cells: effect on productivity and product quality. *Biotechnol Prog, 21*(1), 17-21. doi:10.1021/bp049825t

Bonnet, S., Michelakis, E. D., Porter, C. J., Andrade-Navarro, M. A., Thebaud, B., Bonnet, S., . . . Archer, S. L. (2006). An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1alpha-Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation, 113*(22), 2630-2641. doi:10.1161/circulationaha.105.609008

Borth, N., Strutzenberger, K., Donalies, U., Kunert, R., & Katinger, H. (1996). Comparison of the production of a human monoclonal antibody against HIV-1 by heterohybridoma cells and recombinant CHO cells: A flow cytometric study. *Cytotechnology, 22*(1-3), 129-138. doi:10.1007/bf00353932

Bosco, D., Fava, A., Plastino, M., Montalcini, T., & Pujia, A. (2011). Possible implications of insulin resistance and glucose metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine, 15*(9), 1807-1821. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01318.x

Boylston, M., & Beer, D. (2002). Methemoglobinemia: a case study. *Crit Care Nurse, 22*(4), 50-55.

Brookes, P. S. (2005). Mitochondrial H+ leak and ROS generation: An odd couple. *Free Radical Biology and Medicine, 38*(1), 12-23. doi:https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.016

Brooks, G. A. (2002). Lactate shuttles in nature. *Biochem Soc Trans, 30*(2), 258-264. doi:10.1042/

Buchsteiner, M., Quek, L. E., Gray, P., & Nielsen, L. K. (2018). Improving culture performance and antibody production in CHO cell culture processes by reducing the Warburg effect. *Biotechnol Bioeng, 115*(9), 2315-2327. doi:10.1002/bit.26724

Cadenas, S. (2018). Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1859*(9), 940-950. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2018.05.019

Cairns, R. A., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer, 11*, 85. doi:10.1038/nrc2981

Cao, W., Yacoub, S., Shiverick, K. T., Namiki, K., Sakai, Y., Porvasnik, S., . . . Rosser, C. J. (2008). Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation. *Prostate, 68*(11), 1223-1231. doi:10.1002/pros.20788

Carter, M., & Shieh, J. (2015). Chapter 14 - Cell Culture Techniques. In M. Carter & J. Shieh (Eds.), *Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition)* (pp. 295-310). San Diego: Academic Press.

Chaderjian, W. B., Chin, E. T., Harris, R. J., & Etcheverry, T. M. (2005). Effect of Copper Sulfate on Performance of a Serum-Free CHO Cell Culture Process and the Level of Free Thiol in the Recombinant Antibody Expressed. *Biotechnology Progress, 21*(2), 550-553. doi:10.1021/bp0497029

Chen, Y., Zheng, W., Li, Y., Zhong, J., Ji, J., & Shen, P. (2008). Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. *Cancer Sci, 99*(10), 2019-2027. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00910.x

Chong, W. P. K., Reddy, S. G., Yusufi, F. N. K., Lee, D.-Y., Wong, N. S. C., Heng, C. K., . . . Ho, Y. S. (2010). Metabolomics-driven approach for the improvement of Chinese hamster ovary cell growth: Overexpression of malate dehydrogenase II. *J Biotechnol, 147*(2), 116-121. doi:https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.03.018

Chong, W. P. K., Thng, S. H., Hiu, A. P., Lee, D.-Y., Chan, E. C. Y., & Ho, Y. S. (2012). LC-MS-based metabolic characterization of high monoclonal antibody-producing Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering, 109*(12), 3103-3111. doi:10.1002/bit.24580

Chu, Q. S., Sangha, R., Spratlin, J., Vos, L. J., Mackey, J. R., McEwan, A. J., . . . Michelakis, E. D. (2015). A phase I open-labeled, single-arm, dose-escalation, study of dichloroacetate (DCA) in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs, 33*(3), 603-610. doi:10.1007/s10637-015-0221-y

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. doi:10.1023/A:1022301528118

Crabtree, H. G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J, 23*(3), 536-545.

Criddle, R. S., Packer, L., & Shieh, P. (1977). Oligomycin-dependent ionophoric protein subunit of mitochondrial adenosinetriphosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 74*(10), 4306-4310. doi:10.1073/pnas.74.10.4306

Cromwell, M. E. M., Hilario, E., & Jacobson, F. (2006). Protein aggregation and bioprocessing. *The AAPS Journal, 8*(3), E572-E579. doi:10.1208/aapsj080366

da Veiga Moreira, J., Hamraz, M., Abolhassani, M., Schwartz, L., Jolicoeur, M., & Peres, S. (2019). Metabolic therapies inhibit tumor growth in vivo and in silico. *Sci Rep, 9*(1), 3153. doi:10.1038/s41598-019-39109-1

Darling, R., & Roughton, F. (1942). The effect of methemoglobin on the equilibrium between oxygen and hemoglobin. *American Journal of Physiology-Legacy Content, 137*(1), 56-68. doi:10.1152/ajplegacy.1942.137.1.56

de Alteriis, E., Carteni, F., Parascandola, P., Serpa, J., & Mazzoleni, S. (2018). Revisiting the Crabtree/Warburg effect in a dynamic perspective: a fitness advantage against sugar-induced cell death. *Cell Cycle, 17*(6), 688-701. doi:10.1080/15384101.2018.1442622

De Deken, R. H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J Gen Microbiol, 44*(2), 149-156. doi:10.1099/00221287-44-2-149

Dean, J., & Reddy, P. (2013). Metabolic analysis of antibody producing CHO cells in fed-batch production. *Biotechnol Bioeng, 110*(6), 1735-1747. doi:10.1002/bit.24826

DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science advances, 2*(5), e1600200-e1600200. doi:10.1126/sciadv.1600200

Deshmukh, A., Deshpande, K., Arfuso, F., Newsholme, P., & Dharmarajan, A. (2016). Cancer stem cell metabolism: a potential target for cancer therapy. *Mol Cancer, 15*(1), 69. doi:10.1186/s12943-016-0555-x

Diebold, L., & Chandel, N. S. (2016). Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells. *Free Radic Biol Med, 100*, 86-93. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.198

Divakaruni, A. S., & Brand, M. D. (2011). The Regulation and Physiology of Mitochondrial Proton Leak. *Physiology, 26*(3), 192-205. doi:10.1152/physiol.00046.2010

Dmitriev, R. I., & Papkovsky, D. B. (2015). Intracellular probes for imaging oxygen concentration: how good are they? *Methods and Applications in Fluorescence, 3*(3), 034001. doi:10.1088/2050-6120/3/3/034001

Duicu, O. M., Privistirescu, A., Wolf, A., Petrus, A., Danila, M. D., Ratiu, C. D., . . . Sturza, A. (2017). Methylene blue improves mitochondrial respiration and decreases oxidative stress in a substrate-dependent manner in diabetic rat hearts. *Can J Physiol Pharmacol, 95*(11), 1376-1382. doi:10.1139/cjpp-2017-0074

Duval, D., Demangel, C., Miossec, S., & Geahel, I. (1992). Role of metabolic waste products in the control of cell proliferation and antibody production by mouse hybridoma cells. *Hybridoma, 11*(3), 311-322. doi:10.1089/hyb.1992.11.311

Eagle, H., Oyama, V. I., Levy, M., Horton, C. L., & Fleischman, R. (1956). The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. *J Biol Chem, 218*(2), 607-616.

Ecker, D. M., Jones, S. D., & Levine, H. L. (2015). The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs, 7*(1), 9-14. doi:10.4161/19420862.2015.989042

Edros, R., McDonnell, S., & Al-Rubeai, M. (2014). The relationship between mTOR signalling pathway and recombinant antibody productivity in CHO cell lines. *BMC Biotechnology, 14*(1), 15. doi:10.1186/1472-6750-14-15

Evans, J. M. M., Donnelly, L. A., Emslie-Smith, A. M., Alessi, D. R., & Morris, A. D. (2005). Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ, 330*(7503), 1304-1305. doi:10.1136/bmj.38415.708634.F7

Fan, Y., Jimenez Del Val, I., Muller, C., Wagtberg Sen, J., Rasmussen, S. K., Kontoravdi, C., . . . Andersen, M. R. (2015). Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation. *Biotechnol Bioeng, 112*(3), 521-535. doi:10.1002/bit.25450

Fernandez-Martell, A., Johari, Y. B., & James, D. C. (2018). Metabolic phenotyping of CHO cells varying in cellular biomass accumulation and maintenance during fed-batch culture. *Biotechnol Bioeng, 115*(3), 645-660. doi:10.1002/bit.26485

Fischer, S., Handrick, R., & Otte, K. (2015). The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnology Advances, 33*(8), 1878-1896. doi:https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.015

Fogal, V., Richardson, A. D., Karmali, P. P., Scheffler, I. E., Smith, J. W., & Ruoslahti, E. (2010). Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation. *Mol Cell Biol, 30*(6), 1303-1318. doi:10.1128/mcb.01101-09

Fogolin, M. B., Wagner, R., Etcheverrigaray, M., & Kratje, R. (2004). Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *J Biotechnol, 109*(1-2), 179-191. doi:10.1016/j.jbiotec.2003.10.035

Frazier, H. N., Ghoweri, A. O., Anderson, K. L., Lin, R.-L., Porter, N. M., & Thibault, O. (2019). Broadening the definition of brain insulin resistance in aging and Alzheimer's disease. *Experimental Neurology, 313*, 79-87. doi:https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.12.007

Freund, N. W., & Croughan, M. S. (2018). A Simple Method to Reduce both Lactic Acid and Ammonium Production in Industrial Animal Cell Culture. *International journal of molecular sciences, 19*(2), 385. doi:10.3390/ijms19020385

Fukushima, T., Decker, R. V., Anderson, W. M., & Spivey, H. O. (1989). Substrate channeling of NADH and binding of dehydrogenases to complex I. *J Biol Chem, 264*(28), 16483-16488.

Gaetke, L. M., & Chow, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology, 189*(1), 147-163. doi:https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00159-8

Gagnon, M., Hiller, G., Luan, Y. T., Kittredge, A., DeFelice, J., & Drapeau, D. (2011). High-end pH-controlled delivery of glucose effectively suppresses lactate accumulation in CHO fed-batch cultures. *Biotechnol Bioeng, 108*(6), 1328-1337. doi:10.1002/bit.23072

Ghorbaniaghdam, A., Chen, J., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2014). Analyzing clonal variation of monoclonal antibody-producing CHO cell lines using an in silico metabolomic platform. *PLoS One, 9*(3), e90832. doi:10.1371/journal.pone.0090832

Ghorbaniaghdam, A., Henry, O., & Jolicoeur, M. (2014). An in-silico study of the regulation of CHO cells glycolysis. *J Theor Biol, 357*, 112-122. doi:10.1016/j.jtbi.2014.04.035

Glacken, M. W., Fleischaker, R. J., & Sinskey, A. J. (1986). Reduction of waste product excretion via nutrient control: Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnol Bioeng, 28*(9), 1376-1389. doi:10.1002/bit.260280912

Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., . . . Riggs, A. D. (1979). Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A, 76*(1), 106-110. doi:10.1073/pnas.76.1.106

Gorrini, C., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov, 12*(12), 931-947. doi:10.1038/nrd4002

Goyal, M. S., Vlassenko, A. G., Blazey, T. M., Su, Y., Couture, L. E., Durbin, T. J., . . . Raichle, M. E. (2017). Loss of Brain Aerobic Glycolysis in Normal Human Aging. *Cell Metabolism, 26*(2), 353-360.e353. doi:https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.07.010

Gupta, S. K., Srivastava, S. K., Sharma, A., Nalage, V. H., Salvi, D., Kushwaha, H., . . . Shukla, P. (2017). Metabolic engineering of CHO cells for the development of a robust protein production platform. *PLoS One, 12*(8), e0181455.

Gurer, H., Ozgunes, H., Oztezcan, S., & Ercal, N. (1999). Antioxidant role of α-lipoic acid in lead toxicity. *Free Radical Biology and Medicine, 27*(1), 75-81. doi:https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00036-2

Ha, T. K., & Lee, G. M. (2014). Effect of glutamine substitution by TCA cycle intermediates on the production and sialylation of Fc-fusion protein in Chinese hamster ovary cell culture. *Journal of Biotechnology, 180*, 23-29. doi:https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.04.002

Handlogten, M. W., Lee-O'Brien, A., Roy, G., Levitskaya, S. V., Venkat, R., Singh, S., & Ahuja, S. (2018). Intracellular response to process optimization and impact on productivity and

product aggregates for a high-titer CHO cell process. *Biotechnology and Bioengineering, 115*(1), 126-138. doi:10.1002/bit.26460

Hartley, F., Walker, T., Chung, V., & Morten, K. (2018). Mechanisms driving the lactate switch in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng, 115*(8), 1890-1903. doi:10.1002/bit.26603

Harvey, R. D. (2017). Science of Biosimilars. *J Oncol Pract, 13*(9_suppl), 17s-23s. doi:10.1200/jop.2017.026062

Hashimoto, T., Hussien, R., Oommen, S., Gohil, K., & Brooks, G. A. (2007). Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *Faseb j, 21*(10), 2602-2612. doi:10.1096/fj.07-8174com

Hayter, P. M., Curling, E. M., Gould, M. L., Baines, A. J., Jenkins, N., Salmon, I., . . . Bull, A. T. (1993). The effect of the dilution rate on CHO cell physiology and recombinant interferon-gamma production in glucose-limited chemostat culture. *Biotechnol Bioeng, 42*(9), 1077-1085. doi:10.1002/bit.260420909

Hefzi, H., Ang, K. S., Hanscho, M., Bordbar, A., Ruckerbauer, D., Lakshmanan, M., . . . Lewis, N. E. (2016). A Consensus Genome-scale Reconstruction of Chinese Hamster Ovary Cell Metabolism. *Cell Syst, 3*(5), 434-443 e438. doi:10.1016/j.cels.2016.10.020

Hinterkörner, G., Brugger, G., Müller, D., Hesse, F., Kunert, R., Katinger, H., & Borth, N. (2007). Improvement of the energy metabolism of recombinant CHO cells by cell sorting for reduced mitochondrial membrane potential. *J Biotechnol, 129*(4), 651-657. doi:https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.02.002

Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R. L., Atwood, C. S., . . . Smith, M. A. (2001). Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci, 21*(9), 3017-3023.

Hong, S., & Pedersen, P. L. (2008). ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 72*(4), 590-641. doi:10.1128/MMBR.00016-08

Huang, Y.-M., Hu, W., Rustandi, E., Chang, K., Yusuf-Makagiansar, H., & Ryll, T. (2010). Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnology Progress, 26*(5), 1400-1410. doi:10.1002/btpr.436

Ishida, S., Andreux, P., Poitry-Yamate, C., Auwerx, J., & Hanahan, D. (2013). Bioavailable copper modulates oxidative phosphorylation and growth of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A, 110*(48), 19507-19512. doi:10.1073/pnas.1318431110

James, M. O., & Stacpoole, P. W. (2016). Pharmacogenetic considerations with dichloroacetate dosing. *Pharmacogenomics, 17*(7), 743-753. doi:10.2217/pgs-2015-0012

Jin, L., Alesi, G. N., & Kang, S. (2016). Glutaminolysis as a target for cancer therapy. *Oncogene, 35*(28), 3619-3625. doi:10.1038/onc.2015.447

Kaschak, T., Boyd, D., Lu, F., Derfus, G., Kluck, B., Nogal, B., . . . Yan, B. (2011). Characterization of the basic charge variants of a human IgG1: effect of copper concentration in cell culture media. *MAbs, 3*(6), 577-583. doi:10.4161/mabs.3.6.17959

Kaufman, R. J., & Malhotra, J. D. (2014). Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1843*(10), 2233-2239.

Kelly, P. S., Alarcon Miguez, A., Alves, C., & Barron, N. (2018). From media to mitochondria–rewiring cellular energy metabolism of Chinese hamster ovary cells for the enhanced production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Chemical Engineering, 22*, 71-80. doi:https://doi.org/10.1016/j.coche.2018.08.009

Kim, D. Y., Chaudhry, M. A., Kennard, M. L., Jardon, M. A., Braasch, K., Dionne, B., . . . Piret, J. M. (2013). Fed-batch CHO cell t-PA production and feed glutamine replacement to reduce ammonia production. *Biotechnol Prog, 29*(1), 165-175. doi:10.1002/btpr.1658

Kim, J. Y., Kim, Y. G., & Lee, G. M. (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol, 93*(3), 917-930. doi:10.1007/s00253-011-3758-5

Kim, S., Kwon, I. C., & Lee, S. (2018).

Kim, S. H., & Lee, G. M. (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. doi:10.1007/s00253-006-0654-5

Kishishita, S., Katayama, S., Kodaira, K., Takagi, Y., Matsuda, H., Okamoto, H., . . . Aoyagi, H. (2015). Optimization of chemically defined feed media for monoclonal antibody production in Chinese hamster ovary cells. *J Biosci Bioeng, 120*(1), 78-84. doi:10.1016/j.jbiosc.2014.11.022

Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature, 256*(5517), 495-497. doi:10.1038/256495a0

Korotchkina, L. G., Sidhu, S., & Patel, M. S. (2004). R-lipoic acid inhibits mammalian pyruvate dehydrogenase kinase. *Free Radic Res, 38*(10), 1083-1092. doi:10.1080/10715760400004168

Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., & Starkov, A. A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Letters, 416*(1), 15-18. doi:https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01159-9

Koufaki, M. (2014). Therapeutic applications of lipoic acid: a patent review (2011 – 2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents, 24*(9), 993-1005. doi:10.1517/13543776.2014.937425

Kuwae, S., Ohda, T., Tamashima, H., Miki, H., & Kobayashi, K. (2005). Development of a fed-batch culture process for enhanced production of recombinant human antithrombin by Chinese hamster ovary cells. *J Biosci Bioeng, 100*(5), 502-510. doi:10.1263/jbb.100.502

Lamboursain, L., St-Onge, F., & Jolicoeur, M. (2002). A lab-built respirometer for plant and animal cell culture. *Biotechnol Prog, 18*(6), 1377-1386. doi:10.1021/bp015511j

Landauer, K. (2014). Designing media for animal cell culture: CHO cells, the industrial standard. *Methods Mol Biol, 1104*, 89-103. doi:10.1007/978-1-62703-733-4_7

Lao, M. S., & Toth, D. (1997). Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol Prog, 13*(5), 688-691. doi:10.1021/bp9602360

Le, A., Cooper, C. R., Gouw, A. M., Dinavahi, R., Maitra, A., Deck, L. M., . . . Dang, C. V. (2010). Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 107*(5), 2037-2042. doi:10.1073/pnas.0914433107

Le, H., Vishwanathan, N., Kantardjieff, A., Doo, I., Srienc, M., Zheng, X., . . . Hu, W.-S. (2013). Dynamic gene expression for metabolic engineering of mammalian cells in culture. *Metabolic Engineering, 20*, 212-220. doi:https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.09.004

Lee, M., & Yoon, J.-H. (2015). Metabolic interplay between glycolysis and mitochondrial oxidation: The reverse Warburg effect and its therapeutic implication. *World journal of biological chemistry, 6*(3), 148-161. doi:10.4331/wjbc.v6.i3.148

Lewis, N. E., Liu, X., Li, Y., Nagarajan, H., Yerganian, G., O'Brien, E., . . . Palsson, B. O. (2013). Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the Cricetulus griseus draft genome. *Nature Biotechnology, 31*, 759. doi:10.1038/nbt.2624

https://www.nature.com/articles/nbt.2624#supplementary-information

Li, M. J., Li, Q., Sun, M., & Liu, L. Q. (2017). Comparative effectiveness and acceptability of the FDA-licensed proton pump inhibitors for erosive esophagitis: A PRISMA-compliant network meta-analysis. *Medicine (Baltimore), 96*(39), e8120. doi:10.1097/md.0000000000008120

Linseman, D. A. (2009). Targeting oxidative stress for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal, 11*(3), 421-424. doi:10.1089/ars.2008.2236

Liu, C.-H., & Chen, L.-H. (2007a). Enhanced recombinant M-CSF production in CHO cells by glycerol addition: model and validation. *Cytotechnology, 54*(2), 89-96. doi:10.1007/s10616-007-9078-z

Liu, C.-H., & Chen, L.-H. (2007b). Promotion of recombinant macrophage colony stimulating factor production by dimethyl sulfoxide addition in Chinese hamster ovary cells. *J Biosci Bioeng, 103*(1), 45-49. doi:https://doi.org/10.1263/jbb.103.45

Liu, C.-H., Chu, I. M., & Hwang, S.-M. (2001). Enhanced expression of various exogenous genes in recombinant Chinese hamster ovary cells in presence of dimethyl sulfoxide. *Biotechnology Letters, 23*(20), 1641-1645. doi:10.1023/A:1012466112116

Luo, J., Vijayasankaran, N., Autsen, J., Santuray, R., Hudson, T., Amanullah, A., & Li, F. (2012). Comparative metabolite analysis to understand lactate metabolism shift in Chinese hamster ovary cell culture process. *Biotechnol Bioeng, 109*(1), 146-156. doi:10.1002/bit.23291

Luo, J., Zhang, J., Ren, D., Tsai, W. L., Li, F., Amanullah, A., & Hudson, T. (2012). Probing of C-terminal lysine variation in a recombinant monoclonal antibody production using Chinese hamster ovary cells with chemically defined media. *Biotechnol Bioeng, 109*(9), 2306-2315. doi:10.1002/bit.24510

Ma, N., Ellet, J., Okediadi, C., Hermes, P., McCormick, E., & Casnocha, S. (2009). A single nutrient feed supports both chemically defined NS0 and CHO fed-batch processes: Improved productivity and lactate metabolism. *Biotechnol Prog, 25*(5), 1353-1363. doi:10.1002/btpr.238

Mark, K. v. d., Chen, J. S., Steliou, K., Perrine, S. P., & Faller, D. V. (2003). α-Lipoic acid induces p27Kip-dependent cell cycle arrest in non-transformed cell lines and apoptosis in tumor cell lines. *Journal of Cellular Physiology, 194*(3), 325-340. doi:10.1002/jcp.10205

Martínez, V. S., Dietmair, S., Quek, L.-E., Hodson, M. P., Gray, P., & Nielsen, L. K. (2013). Flux balance analysis of CHO cells before and after a metabolic switch from lactate production to consumption. *Biotechnology and Bioengineering, 110*(2), 660-666. doi:10.1002/bit.24728

Mayr, J. A., Feichtinger, R. G., Tort, F., Ribes, A., & Sperl, W. (2014). Lipoic acid biosynthesis defects. *J Inherit Metab Dis, 37*(4), 553-563. doi:10.1007/s10545-014-9705-8

McKeehan, W. L. (1982). Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation. *Cell Biol Int Rep, 6*(7), 635-650.

McMurray-Beaulieu, V., Hisiger, S., Durand, C., Perrier, M., & Jolicoeur, M. (2009). Na-butyrate sustains energetic states of metabolism and t-PA productivity of CHO cells. *J Biosci Bioeng, 108*(2), 160-167. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.03.001

Mimura, Y., Lund, J., Church, S., Dong, S., Li, J., Goodall, M., & Jefferis, R. (2001). Butyrate increases production of human chimeric IgG in CHO-K1 cells whilst maintaining function and glycoform profile. *J Immunol Methods, 247*(1-2), 205-216.

Moura, F. A., de Andrade, K. Q., dos Santos, J. C., & Goulart, M. O. (2015). Lipoic Acid: its antioxidant and anti-inflammatory role and clinical applications. *Curr Top Med Chem, 15*(5), 458-483. doi:10.2174/1568026615666150114161358

Moyer, A. J. (1945). USA Patent No.: U. S. P. Office.

Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J, 417*(1), 1-13. doi:10.1042/bj20081386

Nargund, S., Qiu, J., & Goudar, C. T. (2015). Elucidating the role of copper in CHO cell energy metabolism using (13)C metabolic flux analysis. *Biotechnol Prog, 31*(5), 1179-1186. doi:10.1002/btpr.2131

Nathan, D. M., Buse, J. B., Davidson, M. B., Ferrannini, E., Holman, R. R., Sherwin, R., & Zinman, B. (2009). Medical Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy. *A consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes, 32*(1), 193-203. doi:10.2337/dc08-9025

Nicolae, A., Wahrheit, J., Bahnemann, J., Zeng, A.-P., & Heinzle, 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 systems biology, 8*, 50-50. doi:10.1186/1752-0509-8-50

Niewisch, M. R., Kuci, Z., Wolburg, H., Sautter, M., Krampen, L., Deubzer, B., . . . Bruchelt, G. (2012). Influence of dichloroacetate (DCA) on lactate production and oxygen consumption in neuroblastoma cells: is DCA a suitable drug for neuroblastoma therapy? *Cell Physiol Biochem, 29*(3-4), 373-380. doi:10.1159/000338492

Oh, S. K., Vig, P., Chua, F., Teo, W. K., & Yap, M. G. (1993). Substantial overproduction of antibodies by applying osmotic pressure and sodium butyrate. *Biotechnol Bioeng, 42*(5), 601-610. doi:10.1002/bit.260420508

Orellana, C. A., Marcellin, E., Schulz, B. L., Nouwens, A. S., Gray, P. P., & Nielsen, L. K. (2015). High-antibody-producing Chinese hamster ovary cells up-regulate intracellular protein transport and glutathione synthesis. *J Proteome Res, 14*(2), 609-618. doi:10.1021/pr501027c

Oz, M., Lorke, D. E., Hasan, M., & Petroianu, G. A. (2011). Cellular and molecular actions of Methylene Blue in the nervous system. *Med Res Rev, 31*(1), 93-117. doi:10.1002/med.20177

Ozturk, S. S., & Palsson, B. O. (1991). Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 1. Analysis of data from controlled batch reactors. *Biotechnol Prog, 7*(6), 471-480. doi:10.1021/bp00012a001

Palermo, D. P., DeGraaf, M. E., Marotti, K. R., Rehberg, E., & Post, L. E. (1991). Production of analytical quantities of recombinant proteins in Chinese hamster ovary cells using sodium butyrate to elevate gene expression. *J Biotechnol, 19*(1), 35-47.

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. *J Biotechnol, 81*(2), 129-140. doi:https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00282-0

Patel, M. S., Nemeria, N. S., Furey, W., & Jordan, F. (2014). The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation. *The Journal of biological chemistry, 289*(24), 16615-16623. doi:10.1074/jbc.R114.563148

Pereira, S., Kildegaard, H. F., & Andersen, M. R. (2018). Impact of CHO Metabolism on Cell Growth and Protein Production: An Overview of Toxic and Inhibiting Metabolites and Nutrients. *Biotechnology Journal, 13*(3), 1700499. doi:10.1002/biot.201700499

Popp, O., Müller, D., Didzus, K., Paul, W., Lipsmeier, F., Kirchner, F., . . . Beaucamp, N. (2016). A hybrid approach identifies metabolic signatures of high-producers for chinese hamster ovary clone selection and process optimization. *Biotechnology and Bioengineering, 113*(9), 2005-2019. doi:10.1002/bit.25958

Porporato, P. E., Dhup, S., Dadhich, R. K., Copetti, T., & Sonveaux, P. (2011). Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol, 2*, 49. doi:10.3389/fphar.2011.00049

Porporato, P. E., Payen, V. L., Perez-Escuredo, J., De Saedeleer, C. J., Danhier, P., Copetti, T., . . . Sonveaux, P. (2014). A mitochondrial switch promotes tumor metastasis. *Cell Rep, 8*(3), 754-766. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.043

Poteet, E., Winters, A., Yan, L. J., Shufelt, K., Green, K. N., Simpkins, J. W., . . . Yang, S. H. (2012). Neuroprotective actions of methylene blue and its derivatives. *PLoS One, 7*(10), e48279. doi:10.1371/journal.pone.0048279

Puck, T. T., Cieciura, S. J., & Robinson, A. (1958). Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med, 108*(6), 945-956.

Puleston, D. (2015). Detection of Mitochondrial Mass, Damage, and Reactive Oxygen Species by Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc, 2015*(9), pdb prot086298. doi:10.1101/pdb.prot086298

Qian, Y., Khattak, S. F., Xing, Z., He, A., Kayne, P. S., Qian, N. X., . . . Li, Z. J. (2011). Cell culture and gene transcription effects of copper sulfate on Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Prog, 27*(4), 1190-1194. doi:10.1002/btpr.630

Quek, L. E., Dietmair, S., Kromer, J. O., & Nielsen, L. K. (2010). Metabolic flux analysis in mammalian cell culture. *Metab Eng, 12*(2), 161-171. doi:10.1016/j.ymben.2009.09.002

Rader, R. A., & Langer, E. S. (2018). Fifteen years of progress: biopharmaceutical industry survey results. *BIOPHARM INTERNATIONAL, 31*(7), 10-+.

Robitaille, J., Chen, J., & Jolicoeur, M. (2015). A Single Dynamic Metabolic Model Can Describe mAb Producing CHO Cell Batch and Fed-Batch Cultures on Different Culture Media. *PLoS One, 10*(9), e0136815. doi:10.1371/journal.pone.0136815

Rochette, L., Ghibu, S., Richard, C., Zeller, M., Cottin, Y., & Vergely, C. (2013). Direct and indirect antioxidant properties of alpha-lipoic acid and therapeutic potential. *Mol Nutr Food Res, 57*(1), 114-125. doi:10.1002/mnfr.201200608

Rodrigues, A. S., Correia, M., Gomes, A., Pereira, S. L., Perestrelo, T., Sousa, M. I., & Ramalho-Santos, J. (2015). Dichloroacetate, the Pyruvate Dehydrogenase Complex and the Modulation of mESC Pluripotency. *PLoS One, 10*(7), e0131663-e0131663. doi:10.1371/journal.pone.0131663

Rodrigues, A. S., Correia, M., Gomes, A., Pereira, S. L., Perestrelo, T., Sousa, M. I., & Ramalho-Santos, J. (2015). Dichloroacetate, the Pyruvate Dehydrogenase Complex and the Modulation of mESC Pluripotency. *PLoS One, 10*(7), e0131663. doi:10.1371/journal.pone.0131663

Rodriguez, J., Spearman, M., Huzel, N., & Butler, M. (2005). Enhanced production of monomeric interferon-beta by CHO cells through the control of culture conditions. *Biotechnol Prog, 21*(1), 22-30. doi:10.1021/bp049807b

San-Millán, I., & Brooks, G. A. (2017). Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis, 38*(2), 119-133. doi:10.1093/carcin/bgw127

Santos, M. L. d., Quintilio, W., Manieri, T. M., Tsuruta, L. R., & Moro, A. M. (2018). Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 54*.

Schwartz, L., Abolhassani, M., Guais, A., Sanders, E., Steyaert, J. M., Campion, F., & Israel, M. (2010). A combination of alpha lipoic acid and calcium hydroxycitrate is efficient against mouse cancer models: preliminary results. *Oncol Rep, 23*(5), 1407-1416.

Schwartz, L., Buhler, L., Icard, P., Lincet, H., & Steyaert, J. M. (2014). Metabolic treatment of cancer: intermediate results of a prospective case series. *Anticancer Res, 34*(2), 973-980.

Serhiyenko, V., Serhiyenko, L., & Suslik, G. (2018). Alpha-lipoic acid: mechanisms of action and beneficial effects in the prevention and treatment of diabetic complications. *MOJ Public Health, 7*(4), 174-178. doi:10.15406/mojph.2018.07.00224

Shay, K. P., Moreau, R. F., Smith, E. J., Smith, A. R., & Hagen, T. M. (2009). Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta, 1790*(10), 1149-1160. doi:10.1016/j.bbagen.2009.07.026

Shuler, M. L., Kargi, F., & DeLisa, M. (2017). Bioprocess engineering basic concepts.

Solmonson, A., & DeBerardinis, R. J. (2018). Lipoic acid metabolism and mitochondrial redox regulation. *J Biol Chem, 293*(20), 7522-7530. doi:10.1074/jbc.TM117.000259

Stacpoole, P. W., Lorenz, A. C., Thomas, R. G., & Harman, E. M. (1988). Dichloroacetate in the treatment of lactic acidosis. *Ann Intern Med, 108*(1), 58-63. doi:10.7326/0003-4819-108-1-58

Stolfa, G., Smonskey, M. T., Boniface, R., Hachmann, A.-B., Gulde, P., Joshi, A. D., . . . Campbell, A. (2018). CHO-Omics Review: The Impact of Current and Emerging Technologies on Chinese Hamster Ovary Based Bioproduction. *Biotechnology Journal, 13*(3), 1700227. doi:10.1002/biot.201700227

Subramaniam, S. R., & Chesselet, M. F. (2013). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol, 106-107*, 17-32. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.04.004

Sung, Y. H., Song, Y. J., Lim, S. W., Chung, J. Y., & Lee, G. M. (2004). Effect of sodium butyrate on the production, heterogeneity and biological activity of human thrombopoietin by recombinant Chinese hamster ovary cells. *J Biotechnol, 112*(3), 323-335. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.05.003

Suski, J. M., Lebiedzinska, M., Bonora, M., Pinton, P., Duszynski, J., & Wieckowski, M. R. (2012). Relation Between Mitochondrial Membrane Potential and ROS Formation. In C. M. Palmeira & A. J. Moreno (Eds.), *Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols* (pp. 183-205). Totowa, NJ: Humana Press.

Tabuchi, H., & Sugiyama, T. (2013). Cooverexpression of alanine aminotransferase 1 in Chinese hamster ovary cells overexpressing taurine transporter further stimulates metabolism and enhances product yield. *Biotechnology and Bioengineering, 110*(8), 2208-2215. doi:10.1002/bit.24881

Tabuchi, H., Sugiyama, T., Tanaka, S., & Tainaka, S. (2010). Overexpression of taurine transporter in Chinese hamster ovary cells can enhance cell viability and product yield, while promoting glutamine consumption. *Biotechnology and Bioengineering, 107*(6), 998-1003. doi:10.1002/bit.22880

Templeton, N., Dean, J., Reddy, P., & Young, J. D. (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

Toussaint, C., Henry, O., & Durocher, Y. (2016). Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures. *J Biotechnol, 217*, 122-131. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.11.010

Viale, A., Corti, D., & Draetta, G. F. (2015). Tumors and mitochondrial respiration: a neglected connection. *Cancer Res, 75*(18), 3685-3686. doi:10.1158/0008-5472.Can-15-0491

Villacrés, C., Tayi, V. S., Lattová, E., Perreault, H., & Butler, M. (2015). Low glucose depletes glycan precursors, reduces site occupancy and galactosylation of a monoclonal antibody in CHO cell culture. *Biotechnology Journal, 10*(7), 1051-1066. doi:10.1002/biot.201400662

Walsh, G. (2014). Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nat Biotechnol, 32*(10), 992-1000. doi:10.1038/nbt.3040

Walsh, G. (2018). Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat Biotechnol, 36*(12), 1136-1145. doi:10.1038/nbt.4305

Wang, H., Wang, L., Zhang, Y., Wang, J., Deng, Y., & Lin, D. (2016). Inhibition of glycolytic enzyme hexokinase II (HK2) suppresses lung tumor growth. *Cancer cell international, 16*, 9-9. doi:10.1186/s12935-016-0280-y

Wang, Q., Beaumont, K. A., Otte, N. J., Font, J., Bailey, C. G., van Geldermalsen, M., . . . Holst, J. (2014). Targeting glutamine transport to suppress melanoma cell growth. *Int J Cancer, 135*(5), 1060-1071. doi:10.1002/ijc.28749

Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of general physiology, 8*(6), 519-530. doi:10.1085/jgp.8.6.519

Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W. W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., . . . Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A, 107*(19), 8788-8793. doi:10.1073/pnas.1003428107

Wen, Y., Li, W., Poteet, E. C., Xie, L., Tan, C., Yan, L. J., . . . Yang, S. H. (2011). Alternative mitochondrial electron transfer as a novel strategy for neuroprotection. *J Biol Chem, 286*(18), 16504-16515. doi:10.1074/jbc.M110.208447

Wheaton, W. W., Weinberg, S. E., Hamanaka, R. B., Soberanes, S., Sullivan, L. B., Anso, E., . . . Chandel, N. S. (2014). Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife, 3*, e02242. doi:10.7554/eLife.02242

Wilkens, C. A., & Gerdtzen, Z. P. (2015). Comparative metabolic analysis of CHO cell clones obtained through cell engineering, for IgG productivity, growth and cell longevity. *PLoS One, 10*(3), e0119053. doi:10.1371/journal.pone.0119053

Wilmore, D. W., & Shabert, J. K. (1998). Role of glutamine in immunologic responses. *Nutrition, 14*(7), 618-626. doi:https://doi.org/10.1016/S0899-9007(98)00009-4

Wlaschin, K. F., & Hu, W.-S. (2007). Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport. *J Biotechnol, 131*(2), 168-176. doi:https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.06.006

Xiong, Z. M., Choi, J. Y., Wang, K., Zhang, H., Tariq, Z., Wu, D., . . . Cao, K. (2016). Methylene blue alleviates nuclear and mitochondrial abnormalities in progeria. *Aging Cell, 15*(2), 279-290. doi:10.1111/acel.12434

Xu, X., Nagarajan, H., Lewis, N. E., Pan, S., Cai, Z., Liu, X., . . . Wang, J. (2011). The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nat Biotechnol, 29*(8), 735-741. doi:10.1038/nbt.1932

Yang, S. H., Li, W., Sumien, N., Forster, M., Simpkins, J. W., & Liu, R. (2017). Alternative mitochondrial electron transfer for the treatment of neurodegenerative diseases and cancers: Methylene blue connects the dots. *Prog Neurobiol, 157*, 273-291. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.10.005

Yin, B., Wang, Q., Chung, C.-Y., Ren, X., Bhattacharya, R., Yarema, K. J., & Betenbaugh, M. J. (2018). Butyrated ManNAc analog improves protein expression in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering, 115*(6), 1531-1541. doi:10.1002/bit.26560

Ying, Z., Kampfrath, T., Sun, Q., Parthasarathy, S., & Rajagopalan, S. (2011). Evidence that alpha-lipoic acid inhibits NF-kappaB activation independent of its antioxidant function. *Inflamm Res, 60*(3), 219-225. doi:10.1007/s00011-010-0256-7

Ying, Z., Xie, X., Chen, M., Yi, K., & Rajagopalan, S. (2015). Alpha-lipoic acid activates eNOS through activation of PI3-kinase/Akt signaling pathway. *Vascul Pharmacol, 64*, 28-35. doi:10.1016/j.vph.2014.11.004

Yoon, S. K., & Ahn, Y.-H. (2007). Application of sodium propionate to the suspension culture of Chinese hamster ovary cells for enhanced production of follicle-stimulating hormone. *Biotechnology and Bioprocess Engineering, 12*(5), 497. doi:10.1007/BF02931346

Yoon, S. K., Choi, S. L., Song, J. Y., & Lee, G. M. (2005). Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese hamster ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0 degrees C. *Biotechnol Bioeng, 89*(3), 345-356. doi:10.1002/bit.20353

Young, J. D. (2013). Metabolic flux rewiring in mammalian cell cultures. *Current Opinion in Biotechnology, 24*(6), 1108-1115. doi:10.1016/j.copbio.2013.04.016

Yuk, I. H., Russell, S., Tang, Y., Hsu, W. T., Mauger, J. B., Aulakh, R. P., . . . Joly, J. C. (2015). Effects of copper on CHO cells: cellular requirements and product quality considerations. *Biotechnol Prog, 31*(1), 226-238. doi:10.1002/btpr.2004

Yuk, I. H., Zhang, J. D., Ebeling, M., Berrera, M., Gomez, N., Werz, S., . . . Szperalski, B. (2014). Effects of copper on CHO cells: insights from gene expression analyses. *Biotechnol Prog, 30*(2), 429-442. doi:10.1002/btpr.1868

Yun, J., Mullarky, E., Lu, C., Bosch, K. N., Kavalier, A., Rivera, K., . . . Cantley, L. C. (2015). Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. *Science, 350*(6266), 1391-1396. doi:10.1126/science.aaa5004

Zagari, F., Jordan, M., Stettler, M., Broly, H., & Wurm, F. M. (2013). Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. *N Biotechnol, 30*(2), 238-245. doi:10.1016/j.nbt.2012.05.021

Zalai, D., Koczka, K., Parta, L., Wechselberger, P., Klein, T., & Herwig, C. (2015). Combining mechanistic and data-driven approaches to gain process knowledge on the control of the metabolic shift to lactate uptake in a fed-batch CHO process. *Biotechnol Prog, 31*(6), 1657-1668. doi:10.1002/btpr.2179

Zhang, S., Yang, C., Yang, Z., Zhang, D., Ma, X., Mills, G., & Liu, Z. (2015). Homeostasis of redox status derived from glucose metabolic pathway could be the key to understanding the Warburg effect. *Am J Cancer Res, 5*(4), 1265-1280.

Zhang, Y., Kwok-Shing Ng, P., Kucherlapati, M., Chen, F., Liu, Y., Tsang, Y. H., . . . Creighton, C. J. (2017). A Pan-Cancer Proteogenomic Atlas of PI3K/AKT/mTOR Pathway Alterations. *Cancer Cell, 31*(6), 820-832.e823. doi:10.1016/j.ccell.2017.04.013

Ziegler, D., Hanefeld, M., Ruhnau, K. J., Meissner, H. P., Lobisch, M., Schutte, K., & Gries, F. A. (1995). Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the anti-oxidant alpha-lipoic acid. A 3-week multicentre randomized controlled trial (ALADIN Study). *Diabetologia, 38*(12), 1425-1433.

Zielke, H. R., Zielke, C. L., & Ozand, P. T. (1984). *Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells.* Paper presented at the Federation proceedings.