

Titre: Influence de la N-glycosylation des immunoglobulines G et des
récepteurs Fc gamma sur leurs interactions

Auteur: Florian Cambay
Author:

Date: 2019

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Cambay, F. (2019). Influence de la N-glycosylation des immunoglobulines G et
des récepteurs Fc gamma sur leurs interactions [Thèse de doctorat,
Citation: Polytechnique Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/4079/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/4079/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Gregory De Crescenzo, Olivier Henry, & Yves Durocher
Advisors:

Programme: Génie chimique
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Influence de la N-glycosylation des immunoglobulines G et des récepteurs Fc
gamma sur leurs interactions**

FLORIAN CAMBAY

Département de génie chimique

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiae Doctor*

Génie chimique

Novembre 2019

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Cette thèse intitulée :

Influence de la N-glycosylation des immunoglobulines G et des récepteurs Fc gamma sur leurs interactions

présentée par **Florian CAMBAY**

en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiae Doctor*

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

Jason Robert TAVARES, président

Gregory DE CRESCENZO, membre et directeur de recherche

Olivier HENRY, membre et codirecteur de recherche

Yves DUROCHER, membre et codirecteur de recherche

Nick VIRGILIO, membre

Bruno GAILLET, membre externe

DÉDICACE

À Adeline, à Marcel et à ma famille

*"I wish it need not have happened in my time," said
Frodo.*

*"So do I," said Gandalf, "and so do all who live to
see such times. But that is not for them to decide.
All we have to decide is what to do with the time
that is given us."*

— J.R.R. Tolkien, The Fellowship of the Ring

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Grégory De Crescenzo pour m'avoir accepté au doctorat. Mais pas que !! Le doctorat c'est un début et une fin mais c'est surtout un long milieu. C'est une véritable symbiose entre le directeur et l'étudiant, un travail d'équipe. Je le remercie d'avoir été présent professionnellement et humainement, de m'avoir soutenu et surtout d'avoir eu confiance en moi. Ça fait toute la différence puisqu'il a fait de mon doctorat l'une des meilleures expériences de ma vie.

Je voudrais ensuite remercier le professeur Yves Durocher pour m'avoir accompagné durant ce doctorat, pour m'avoir donné l'occasion de travailler dans une structure à la pointe de la recherche et surtout de m'avoir donné les moyens d'aller au bout de mes objectifs. Je voudrais également le remercier d'avoir, un jour, accepté cet étudiant ingénieur pour un stage de 6 mois. Fascinant comme un simple oui peut créer bien des choses...

Je voudrais également dire merci au professeur Olivier Henry pour m'avoir accepté au doctorat. Il m'a toujours soutenu et a toujours été présent quand j'avais besoin de lui.

Je voudrais remercier chacun des membres du jury, M. Nick Virgilio, M. Bruno Gaillet et M. Éric Laurendeau pour avoir accepté d'évaluer mon travail et tout particulièrement M. Jason-Robert Tavares pour avoir accepté de présider ce jury.

Le doctorat, c'est aussi beaucoup de rencontres. Et encore plus quand on travaille dans deux laboratoires. Je voudrais commencer par remercier certaines personnes qui ont une place spéciale dans mon cœur. À Polytechnique, Karl qui a toujours une place très spéciale et qui m'a convaincu qu'un doc c'est le fun, Sam dont l'intelligence d'esprit et de cœur me fascinera toujours, le bel Éric (et sa belle, Manue) pour sa présence qui m'a beaucoup manqué, Ben (et son bel Edy) mon Ch'ti d'amour, Yuan mon compagnon de TP. Au CNRC, Christian, mon maître Jedi qui m'a accompagné et formé depuis le début et à qui je dois nombre de mes qualités au laboratoire, Gilles dit Monsieur Biomol, mon voisin de bureau qui vient du lac Saint-Jean, l'une des plus belles rencontres de mon doc (mais chut, ne lui dites pas), Roseanne et Sylvie les deux mamans du labo et enfin le tardif Denis et le matinal Louis toujours là pour m'aider et me faire sourire.

J'aimerais également remercier toutes les personnes que j'ai pu rencontrer à Polytechnique et au CNRC et qui ont participé de près ou de loin à cette magnifique expérience doctorale : à Polytechnique, Cécile/René, Catherine, Fred, Cyril, Kahina, July, Nesrine, Gwladys, Maxime, Léa,

Alexis, Pablo, Kurt, Benoît, Gwendoline, Audrey, Romane, Jimmy et Mario (merci de m'avoir appris à faire de la bière) et à tous les employés et étudiants du CNRC.

Un énorme merci à tous les amis rencontrés à Montréal et à tous les bons moments passés ensemble. Merci à Sylvanie et Guillaume et leurs petites Pauline et Alix, vous avez été comme une famille ici. Merci aux deux Guillaume pour la découverte du bloc. Un autre gros merci à Maxime mon frère du Nord et à Julien. Un merci tout spécial à Hugo, l'ami perdu, qui m'a donné le goût de Montréal et d'y rester. Je remercie aussi tous mes amis que j'ai laissé derrière moi en France.

Un immense merci à ma famille qui a fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Merci à mes parents pour leur générosité et leur abnégation, ma sœur, mes deux frères et mes grands-parents. Merci également à ma belle-famille qui est devenu chère à mon cœur et qui est d'une générosité hors du commun.

Enfin, Montréal aura été beaucoup plus qu'un doctorat. En fait, Montréal sera surtout pour moi synonyme d'UNE rencontre, celle de la femme de ma vie, Adeline. Avec elle, j'ai vécu les plus beaux moments de ma vie et j'en suis persuadé, nous en vivrons encore de bien beaux. En tout cas, dans le classement des souvenirs, notre petit $\frac{3}{4}$ de Ch'ti Marcel est au top.

•

RÉSUMÉ

L'immunothérapie regroupe l'ensemble des traitements utilisant certaines composantes du système immunitaire (p.ex. des protéines ou des cellules) d'une personne pour traiter ou prévenir des maladies. Parmi ces composantes, **les anticorps monoclonaux** (AcM), issus d'un même clone de lymphocyte B et reconnaissant le même épitope, sont les plus largement utilisés à des fins thérapeutiques pour lutter contre des maladies telles que le cancer et les maladies auto-immunes. Il s'agit d'ailleurs du groupe de molécules thérapeutiques ayant la plus forte croissance et selon les prévisions, les AcM et leurs dérivés continueront de dominer le marché des biopharmaceutiques dans les prochaines années. L'engouement pour les AcM est principalement lié à leur rôle d'agent de liaison entre la reconnaissance spécifique d'un antigène et le déclenchement de la réponse immunitaire liée à diverses fonctions effectrices. En effet, les AcM thérapeutiques sont principalement basés sur **l'immunoglobuline G1** (IgG1). Structuellement, celle-ci se compose de deux régions Fab exprimant un site de liaison spécifique à un antigène et une région Fc, portant deux sites hautement conservés de N-glycosylation et les sites d'interaction de plusieurs ligands dont **les récepteurs Fcγ** (FcγR). Le déclenchement de la réponse immunitaire via l'interaction de l'IgG avec les FcγR est le mode d'action majoritaire des AcM thérapeutiques. Ces récepteurs sont présents à la surface des cellules de l'immunité innée et permettent la neutralisation ou la destruction de pathogènes via l'activation de fonctions effectrices telles que la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Par ailleurs, **la N-glycosylation** des IgG1 est considérée comme un attribut de qualité critique puisqu'elle est susceptible d'affecter leurs propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. En particulier, la N-glycosylation des IgG1 est essentielle pour l'interaction avec les FcγR et le glycoprofil de l'IgG1 influence son affinité pour les FcγR, les fonctions effectrices et *in fine* l'efficacité thérapeutique. Les travaux présentés ici approfondissent le rôle de la N-glycosylation des IgG et des FcγR sur leurs interactions à l'aide d'une technique biophysique dont le principe de détection est basé sur la résonance des plasmons de surface (SPR).

Dans une première étude, nous avons mis en place **une approche d'immobilisation des FcγR** à la surface du **biocapteur SPR**. La SPR est la méthode biophysique la plus utilisée pour l'analyse des interactions IgG1/FcγR. Cependant, les affinités obtenues font l'objet d'une forte disparité étant donné la multiplicité de conditions opératoires comme la méthode d'immobilisation du ligand. Dans ce cas précis, il existe de nombreuses méthodes d'immobilisation mais aucune ne permet une

immobilisation à la fois stable, reproductible, rapide et peu coûteuse. Pour permettre une telle immobilisation des Fc γ R, nous nous sommes basés sur **l'interaction superhélice** qui implique deux peptides (E et K) conçus *de novo* qui se lient l'un à l'autre lorsque mis en contact. Les deux peptides interagissent avec une forte affinité, de façon spécifique, orientée et stable. Son utilisation dans notre laboratoire a déjà été reportée dans de nombreuses applications. Dans notre cas, les Fc γ R ont été étiquetés avec le peptide E pour les immobiliser de façon stable et orientée sur une surface de K, préalablement immobilisé de façon covalente à la surface du biocapteur. Nous avons pu démontrer que cette nouvelle méthode d'immobilisation des Fc γ R surpasse toutes les autres en termes de caractérisation cinétique, de temps d'analyse et de coût. De plus, la reproductibilité de l'analyse est excellente. Finalement, des études préliminaires ont montré que cette approche est adaptée à la mesure de l'impact de la N-glycosylation des IgG1 et des Fc γ R. Ces résultats concluants nous ont mené à utiliser cette méthode d'immobilisation comme base de notre étude détaillée de l'impact de la N-glycosylation des IgG1 et des Fc γ R sur leurs interactions.

Notre deuxième étude a été menée pour déterminer **l'influence de la N-glycosylation de l'IgG1 sur son interaction avec les Fc γ R**. Parmi les effets les plus étudiés, l'influence positive de l'absence de α 1,6-fucose sur l'interaction avec le Fc γ RIIIa et l'ADCC fait consensus. Cependant, les effets de certaines modifications comme la galactosylation et la sialylation restent incertains en raison de la diversité des méthodes d'évaluation de l'affinité et de l'activité biologique et parfois du manque de caractérisation des glycanes. Par ailleurs, le plus souvent, les modifications du glycanes de l'IgG ont été étudiées individuellement et leurs effets ont été déduits sur la base de résultats obtenus via seulement une méthode d'évaluation des interactions (SPR ou ELISA). Dans ce contexte, notre objectif était d'évaluer globalement l'impact de la fucosylation, de la galactosylation et de la sialylation d'une IgG1 sur son interaction avec les Fc γ R et sur l'ADCC. Pour ce faire, dix glycoformes d'IgG1 ont été générés par coexpression d'enzyme et remodelage *in vitro* puis finement caractérisés. Les analyses cinétiques réalisées par SPR ont montré que l'afucosylation de l'IgG1 mène à l'impact le plus significatif avec une augmentation drastique de l'affinité pour les Fc γ RIIIa. Puis, nous avons démontré que, indépendamment du niveau de fucosylation, la galactosylation mène à une légère augmentation de l'affinité pour les Fc γ RIIIa tandis que l'ajout de deux acides sialiques diminue légèrement cet effet positif. Finalement, les résultats d'ADCC sont une parfaite retranscription des affinités obtenues par notre essai SPR.

La dernière étude effectuée dans cette thèse est consacrée à **l'évaluation de l'influence de la N-glycosylation des FcγR** sur leurs interactions avec divers glycoformes d'IgG1 et se divise en deux volets : influence de la **macrohétérogénéité** des FcγR puis de la **microhétérogénéité** des FcγR mutés et non mutés. Des études pionnières ont suggéré que la réponse immunitaire liée à l'interaction des anticorps avec les FcγR serait modulée par le glycome spécifique de la cellule immunitaire. Faute de pouvoir étudier des FcγR naturels, la grande majorité des études s'est concentrée sur l'analyse de la macrohétérogénéité ou de la microhétérogénéité de FcγR recombinants. Là encore, des résultats divergents ont été observés. Afin d'obtenir une compréhension globale, nous avons évalué l'influence combinée des deux types d'hétérogénéité des FcγR sur leurs interactions avec plusieurs glycoformes d'IgG1. Dans un premier temps, nous avons muté les sites de N-glycosylation des FcγR afin de pouvoir définir précisément l'impact de chacun des glycanes. Les analyses cinétiques par SPR nous ont permis de démontrer que seul le FcγRIIIa possède des glycanes ayant une influence significative sur l'interaction avec les glycoformes d'IgG1. Plus précisément, nous avons démontré que la présence du glycanes à la position N162 est essentielle pour la forte affinité avec les IgG1 afucosylées tandis que le glycanes à la position N45 a une légère influence négative sur l'interaction avec les glycoformes d'IgG1. Dans un second temps, nous avons modifié la glycosylation des FcγR non mutés et des mutants de FcγRIIIa_{V158} ne possédant qu'un seul site de N-glycosylation via des inhibiteurs ou du remodelage *in vitro*. Nous avons ainsi observé que seul le glycoprofil du FcγRIIIa influence l'interaction avec les glycoformes d'IgG1. Plus précisément, nous avons montré que le FcγRIIIa a une affinité plus élevée pour les glycoformes d'IgG1 lorsque le glycanes à la position N162 possède une structure oligomannosidique.

Ces travaux apportent une contribution notable dans l'amélioration des analyses cinétiques d'interaction IgG/FcγR pour le développement rationnel d'IgG thérapeutiques. Cette étude propose un essai SPR basé sur l'immobilisation des FcγR par l'interaction superhélice capable de mesures biophysiques d'affinités en parfaite adéquation avec des essais cellulaires. Puis, au vu des difficultés que représentent l'analyse des interactions d'IgG et de formes naturelles de FcγR, notre essai SPR pourrait permettre l'évaluation de formes recombinantes de FcγR ayant des glycoprofiles similaires aux FcγR naturels provenant de différentes cellules immunitaires, dans des états sains et pathologiques. Cela permettrait d'obtenir des prévisions plus précises des résultats physiologiques des AcM thérapeutiques.

ABSTRACT

Immunotherapy refers to all treatments using certain components of the immune system (e.g. proteins or cells) to treat or prevent diseases. Among these components, **monoclonal antibodies** (mAbs), derived from the same B lymphocyte clone and recognizing the same epitope, are the most widely used as treatment for cancer and autoimmune diseases. This is the fastest growing group of therapeutic molecules and according to the forecasts, mAbs and mAb-based products will continue to dominate the biopharmaceutical market in the coming years. Such interest for mAbs is mainly related to their role as a link between the specific recognition of an antigen and the triggering of the immune response related to various effector functions. Indeed, therapeutic mAbs are mainly based on **immunoglobulin G1** (IgG1). Structurally, it consists of two Fab regions expressing an antigen-specific binding site and one Fc region, carrying two highly conserved N-glycosylation sites and the interaction sites of several ligands including the **Fcγ receptors** (FcγRs). The triggering of the immune response via the interaction of IgG with FcγR is the main mode of action of therapeutic mAbs. These receptors are present on the surface of immune cells and enable the neutralization or the destruction of pathogens through the activation of effector functions such as antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). Furthermore, **the N-glycosylation** of mAbs is considered to be a critical quality attribute since it may affect their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. In particular, the N-glycosylation of IgG1 is necessary for interaction with FcγRs and it is well-known that the IgG1 glycoprofile influences its affinity for FcγRs, effector functions and *in fine* its therapeutic efficacy. The work presented here is focused on the role of IgG1 and FcγRs N-glycosylation on their interactions using a biophysical technique whose detection is based on surface plasmon resonance (SPR).

In a first study, we implemented **an approach to immobilize FcγRs** on the **SPR biosensor surface**. The SPR is the most commonly used biophysical method for the analysis of IgG1/FcγR interactions. Nonetheless, the published studies have shown some discrepancies given the multitude of operating conditions such as the ligand immobilization method. In this specific case, there are many immobilization approaches, but none of them so far has led to a stable, reproducible, fast and low-cost immobilization. To alleviate this issue, we based our work on **the coiled-coil interactions**, i.e., the interactions occurring between two complementary *de novo* designed peptides (E and K) that heterodimerize when mixed. The coiled-coil dimerizing platform is advantageous because the E and K peptides interact with a high affinity in a specific, stable and

oriented manner. Their use as a capture system has already been reported in various applications by our laboratory. In our case, we immobilized E-tagged FcγRs in a stable and oriented manner at the surface of our SPR biosensor where the K peptide had been covalently immobilized. We demonstrated that this novel FcγR immobilization approach surpasses all other immobilization methods in terms of kinetic characterization, duration and cost. In addition, the reproducibility of the assay was shown to be excellent. Finally, our preliminary studies have demonstrated that this approach is suitable to measure the impact of IgG1 and FcγRs N-glycosylation. These results convinced us to base our detailed study on the effects of IgG1 and FcγR N-glycosylation upon their interactions with this immobilization method.

Our second study was focused on **the influence of IgG1 N-glycosylation on the IgG1 interaction with FcγRs**. Among the most studied effects, there is consensus on the positive influence of the absence of core fucose on the IgG1 interaction with FcγRIIIa and ADCC. However, the impact of several modifications such as galactosylation and sialylation remained uncertain due to the diversity of the methods used to assess affinity and biological activity as well as the lack of glycans characterization. Besides, the IgG glycan modifications were often studied separately, and their impacts were based on results obtained only through interaction measurement (SPR or ELISA). In this context, our objective was to assess the overall impact of IgG1 fucosylation, terminal galactosylation and terminal sialylation on the IgG1 interaction with FcγRs as well as ADCC. In that endeavor, ten IgG1 glycoforms were generated by enzyme coexpression combined to *in vitro* remodeling and then thoroughly characterized. Kinetic analyses performed by SPR have shown that IgG1 afucosylation leads to the most significant effect with a steep increase of the affinity for FcγRIIIa. Then, we demonstrated that, regardless of the fucosylation level, terminal galactosylation leads to a slight increase of affinity for FcγRIIIa while the addition of two sialic acids slightly reduces this positive effect. Finally, the ADCC results perfectly echoed the affinities obtained by our SPR assay.

The last study that we carried out in this thesis was devoted to **evaluating the influence of FcγRs N-glycosylation on their interactions with various IgG1 glycoforms** and consisted of two parts: the influence of FcγRs **macroheterogeneity** then the wild-type and mutated FcγRs **microheterogeneity**. Pioneering studies have hypothesized that the immune response based on the interaction of antibodies with FcγRs might be modulated by the specific glycome of the immune cells. Since FcγR natural forms was difficult to study, most of the studies focused on the analysis

of macroheterogeneity or microheterogeneity of recombinant FcγRs. Once again, conflicting results were observed. In order to obtain a global understanding, we evaluated the combined influence of the two heterogeneity types of the FcγRs on their interactions with several IgG1 glycoforms. First, we mutated the FcγR N-glycosylation sites by site-directed mutagenesis to precisely define the impact of each glycan. Kinetic analyses derived from our SPR data collection enabled us to demonstrate that only FcγRIIIa display glycans that have a significant influence on the interaction with IgG1 glycoforms. More specifically, we have demonstrated that the presence of N162 glycan is essential for the high affinity with afucosylated IgG1 while N45 glycan has a slight negative influence on the interaction with IgG1 glycoforms. In a second step, we modified the glycosylation of wild-type FcγRs and FcγRIIIa_{V158} mutants displaying only one N-glycosylation site with inhibitors or *in vitro* remodeling. We observed that only the FcγRIIIa glycoprofile influences the interaction with IgG1 glycoforms. More specifically, we demonstrated that FcγRIIIa has a higher affinity for IgG1 glycoforms when the N162 carries a high-mannose type glycan.

Altogether, this work represents an important contribution to the improvement of the kinetic analysis of IgG/FcγR interactions for the rational development of therapeutic IgGs. This study proposes a novel SPR assay based on the FcγR immobilization via coiled-coil interactions. This assay allowed us to perform biophysical affinity measurements in perfect accordance with the results from cellular assays. Then, given the difficulties of analyzing the IgG interactions with FcγR natural forms, our SPR assay could evaluate FcγRs recombinant forms with glycoprofiles similar to the FcγRs natural forms from different immune cells, in healthy and disease states. This would provide more accurate predictions of the physiological outcomes of therapeutic mAbs.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT	IX
TABLE DES MATIÈRES	XII
LISTE DES TABLEAUX.....	XVI
LISTE DES FIGURES.....	XVIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XXII
LISTE DES ANNEXES	XXVII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Les protéines recombinantes thérapeutiques	1
1.2 Les anticorps monoclonaux et les récepteurs Fcγ	2
1.3 L'influence critique de la N-glycosylation des IgG	4
1.4 Et la glycosylation des récepteurs Fcγ dans tout ça ?	6
1.5 Objectifs et structure de la thèse	7
CHAPITRE 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE	9
2.1 Les anticorps monoclonaux.....	9
2.1.1 Les anticorps dans le système immunitaire	9
2.1.2 Les anticorps monoclonaux thérapeutiques	12
2.1.3 La région Fc : site d'interaction des récepteurs Fcγ	22
2.2 La N-glycosylation des IgG et des récepteurs Fcγ	29
2.2.1 Généralités.....	29
2.2.2 Mécanisme de la N-glycosylation	33

2.2.3	La N-glycosylation des récepteurs Fc γ	35
2.2.4	La N-glycosylation des IgG	39
2.3	Modification de la N-glycosylation	41
2.3.1	Influence des paramètres de culture	42
2.3.2	Glycoingénierie par manipulation des voies de biosynthèse	45
2.3.3	Glycoingénierie <i>in vitro</i>	54
2.3.4	Analyse de la N-glycosylation	57
2.4	Influence de la N-glycosylation sur l'interaction IgG / Fc γ R	62
2.4.1	Mesure de l'interaction IgG / Fc γ R par SPR	62
2.4.2	Impact de la N-glycosylation de la région Fc de l'IgG	75
2.4.3	Impact de la N-glycosylation des récepteurs Fc γ	79
CHAPITRE 3	DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL	83
CHAPITRE 4	ARTICLE 1: IMPACT OF N-GLYCOSYLATION ON Fc γ RECEPTOR / IGG INTERACTIONS: UNRAVELLING DIFFERENCES WITH AN ENHANCED SURFACE PLASMON RESONANCE BIOSENSOR ASSAY BASED ON COILED-COIL INTERACTIONS	85
4.1	Article presentation	85
4.2	Impact of N-glycosylation on Fc γ receptor / IgG interactions: Unravelling differences with an enhanced surface plasmon resonance biosensor assay based on coiled-coil interactions	86
4.2.1	Abstract	86
4.2.2	Keywords	87
4.2.3	Introduction	87
4.2.4	Results	90
4.2.5	Discussion	107

4.2.6	Materials and Methods	113
4.2.7	Disclosure of potential conflicts of interest.....	120
4.2.8	Acknowledgement.....	120
4.2.9	Funding.....	121
4.2.10	References	121
CHAPITRE 5 ARTICLE 2: IMPACT OF IGG1 N-GLYCOSYLATION ON THEIR INTERACTION WITH FC GAMMA RECEPTORS		127
5.1	Article presentation	127
5.2	Impact of IgG1 N-glycosylation on their interaction with Fc gamma receptors	128
5.2.1	Abstract	128
5.2.2	Introduction	129
5.2.3	Results	133
5.2.4	Discussion	149
5.2.5	Materials and Methods	155
5.2.6	Acknowledgements	161
5.2.7	Author Contributions.....	161
5.2.8	Additional Information.....	161
5.2.9	References	162
CHAPITRE 6 ARTICLE 3: GLYCOSYLATION OF FCY RECEPTORS INFLUENCES THEIR INTERACTION WITH VARIOUS IGG1 GLYCOFORMS.....		168
6.1	Article presentation	168
6.2	Glycosylation of Fc γ receptors influences their interaction with various IgG1 glycoforms.....	169
6.2.1	Abstract	169
6.2.2	Keywords	170

6.2.3	Introduction	170
6.2.4	Results	173
6.2.5	Discussion	189
6.2.6	Materials and Methods	196
6.2.7	Acknowledgements	201
6.2.8	References	202
CHAPITRE 7	DISCUSSION GÉNÉRALE	206
CHAPITRE 8	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	214
BIBLIOGRAPHIE		220
ANNEXES		248

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 : Caractéristiques des isotypes d'anticorps..	12
Tableau 2-2 : Caractéristiques des sous-classes d'immunoglobuline G..	15
Tableau 2-3 : Exemples d'anticorps monoclonaux dits « superproductions » classés selon les ventes globales réalisées en 2017..	19
Tableau 2-4 : Caractéristiques des récepteurs Fcγ.	25
Tableau 2-5 : Affinité des récepteurs de la région Fc pour les différents isotypes d'anticorps.....	26
Tableau 2-6 : Les rôles et les effets de la glycosylation des glycoprotéines.....	32
Tableau 2-7 : Impact de la plateforme d'expression sur la N-glycosylation de la région Fc des IgG.	43
Tableau 2-8 : Impact des paramètres de culture et du milieu de culture sur la N-glycosylation des glycoprotéines.	46
Tableau 2-9 : Résumé des petites molécules connues modulant la N-glycosylation.....	52
Tableau 2-10 : Méthodes de séparation communément utilisées dans le profilage et la quantification de la N-glycosylation des IgG.....	59
Tableau 2-11 : Définitions des constantes cinétiques d'association et de dissociation et des constantes thermodynamiques d'association et de dissociation.....	65
Tableau 2-12 : Affinités de l'interaction IgG / FcγR mesurées par SPR.	71
Table 4-1: Apparent K_D values reported in the literature for FcγRIIIa-IgG interactions.....	95
Table 5-1: Relative abundance of the glycans detected in the HILIC chromatograms.....	139
Table 6-1: Summary of the inconsistencies observed in the literature about the influence of FcγRs N-glycosylation on the binding to IgG1 glycoforms.	193
Tableau annexe A - 1 : Impact de la N-glycosylation de la région Fc des IgG sur l'interaction avec les récepteurs Fc et les fonctions effectrices..	248
Table annexe B - 1: Apparent K_D values measured by our surface plasmon resonance assay. ...	258
Table annexe B - 2: EC ₅₀ of the TZM glycoforms.....	259

Table annexe C - 1: Effect of removal of FcγRs N-glycosylation sites on expression and aggregation..	263
Table annexe C - 2: Apparent K_D values measured by surface plasmon resonance for the interactions between mutated FcγRIIIa _{F158/V158} and trastuzumab glycoforms.	264
Table annexe C - 3: Apparent K_D values measured by surface plasmon resonance for the interactions between FcγRIIa/b mutants and trastuzumab glycoforms.	265
Table annexe C - 4: Apparent K_D values measured by surface plasmon resonance for the interactions between FcγRI mutants and trastuzumab glycoforms.	266
Table annexe C - 5: Similarity scores of mutated FcγRs compared to wild-type FcγRs.	270
Table annexe C - 6: Apparent K_D values measured by surface plasmon resonance for the interactions between wild-type FcγRs glycoforms and trastuzumab glycoforms.	271
Table annexe C - 7: Apparent K_D values measured by surface plasmon resonance for the interactions between mutated FcγRIIIa _{V158} glycoforms and trastuzumab glycoforms.	272
Table annexe C - 8: Similarity scores of FcγRs glycoforms compared to unmodified FcγRs. ...	275

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1 : Représentation schématique de la réponse immunitaire..	10
Figure 2-2 : Représentation du domaine immunoglobuline.....	11
Figure 2-3 : Représentation schématique d'une immunoglobuline G (IgG).	13
Figure 2-4 : Représentation schématique des fonctions effectrices de l'IgG..	16
Figure 2-5 : Représentation schématique des types d'anticorps monoclonaux thérapeutiques et nomenclature..	17
Figure 2-6 : Vue d'ensemble des approbations d'AcM..	18
Figure 2-7 : Représentation schématique des produits dérivés des anticorps..	20
Figure 2-8 : Localisation des sites d'interaction sur la région Fc de l'anticorps (A) et interaction entre les deux domaines C _{H2} de l'immunoglobuline G avec le domaine immunoglobulinique proximal et la partie charnière du récepteur FcγRIIIa (B)..	23
Figure 2-9 : Représentation des trois structures de la N-glycosylation (A) et des huit structures de la O-glycosylation (B) avec la notation symbolique des sucres communément observée dans les N- et O-glycosylations (C), selon le système de nomenclature des symboles pour les glycanes (Varki et al., 2015), et leur conformation en chaise (D). GalNAc : N-acétylgalactosamine; GlcNAc : N-acétylglucosamine; Neu5Ac : acide N-acétylneuraminique; Neu5Gc : acide N-glycolylneuraminique.....	31
Figure 2-10 : Représentation schématique du cycle dolichol..	34
Figure 2-11 : Représentation schématique du mécanisme de la N-glycosylation dans une cellule de mammifère..	35
Figure 2-12 : Représentation de l'architecture des domaines des récepteurs Fcγ et de leurs sites de N-glycosylation..	37
Figure 2-13 : (A) Représentation de la N-glycosylation de l'immunoglobuline G avec la structure centrale (noir) et les divers sucres pouvant être ajoutés de façon variable tels que le fucose (rouge), le galactose (jaune), l'acide α(2,3)-N-acétylneuraminique (pourpre) et le N-	

acétylglucosamine bissecteur (bleu) avec les types de liaison et (B) les oligosaccharides possibles.	40
Figure 2-14 : Exemple d'une méthode de modification chimioenzymatique de la N-glycosylation d'une IgG.....	56
Figure 2-15 : (A) Schématisation du système optique du système SPR de Biacore. (B) Représentation d'un sensogramme SPR type avec les différentes constantes cinétiques associées.	64
Figure 2-16 : (A) Représentation schématique de l'interaction superhélice ou <i>coiled-coil</i> et (B) d'une heptade hétérodimère du tandem peptidique E5/K5 en coupe transversale.....	69
Figure 4-1: Comparison of FcγR capture strategies on SPR biosensor surfaces..	91
Figure 4-2: E5-tagged FcγRIIIa production and purification.....	92
Figure 4-3: E5-tagged FcγRIIIa characterization.....	93
Figure 4-4: Impact of receptor capture strategy on the TZM/FcγRIIIa kinetic profiles..	96
Figure 4-5: Reproducibility assessment of FcγR capture strategy..	98
Figure 4-6: Evaluation of the robustness of the E5-tagged FcγR capture, the assay reproducibility and the K5 surface stability.....	100
Figure 4-7: SDS-PAGE and lectin-blots analysis of FcγRIIIa N-glycans.	102
Figure 4-8: Influence of the FcγRIIIa expression system upon binding kinetics of trastuzumab glycoforms.....	104
Figure 4-9: Influence of FcγRIIIa N-glycosylation level on binding kinetics of trastuzumab glycoforms.	106
Figure 4-10: Influence of FcγRIIIa terminal N-glycans upon binding to trastuzumab glycoforms..	109
Figure 5-1: Lectin blot analysis of the ten TZM glycoforms.....	135
Figure 5-2: cIEF profiles of the ten TZM glycoforms..	136
Figure 5-3: HILIC analysis of PNGaseF-released glycans for the ten TZM glycoforms.	138

Figure 5-4: Relative abundance of glycan families.....	141
Figure 5-5: Representative control-corrected SPR sensorgrams corresponding to the interactions of various TzM glycoforms with captured FcγRs.....	142
Figure 5-6: Influence of the IgG-Fc N-glycan sugar moieties upon FcγR binding.. ..	144
Figure 5-7: ADCC responses induced by the TzM glycoforms.. ..	147
Figure 6-1: Coil-tagged FcγR mutant production and purification.....	174
Figure 6-2: Representative control-corrected SPR sensorgrams corresponding to the interactions of various trastuzumab glycoforms with captured FcγRIIIa _{V158} mutants.....	176
Figure 6-3: Influence of the FcγRIIIa N-glycosylation site occupancy upon binding to various trastuzumab glycoforms.. ..	178
Figure 6-4: Influence of the FcγRI and FcγRIIa/b N-glycosylation site occupancy upon binding to various trastuzumab glycoforms.	179
Figure 6-5: SDS-PAGE and lectin-blot analysis of wild-type FcγR N-glycans.. ..	181
Figure 6-6: SDS-PAGE and lectin-blots analysis of mutated FcγRIIIa _{V158} N-glycans.. ..	183
Figure 6-7: Influence of the N-glycan profile of wild-type FcγRs upon binding to trastuzumab glycoforms.....	186
Figure 6-8: Influence of the N-glycan profile of FcγRIIIa mutants upon binding to trastuzumab glycoforms.....	188
Figure annexe B - 1: Soluble ST6Gal1 purification and characterization.	255
Figure annexe B - 2: Full-length lectin blots.....	256
Figure annexe B - 3: E5-tagged FcγRs production and purification.....	257
Figure annexe C - 1: Structures of the mutated coil-tagged FcγRs.....	261
Figure annexe C - 2: Effect of removal of FcγRs N-glycosylation sites on expression and aggregation.. ..	262
Figure annexe C - 3: Influence of FcγRs N-glycosylation sites on trastuzumab glycoforms affinity.. ..	267

Figure annexe C - 4: Influence of FcγRIIIa N-glycosylation sites on binding to trastuzumab glycoforms binding..	268
Figure annexe C - 5: Influence of FcγRIIa/b and FcγRI N-glycosylation sites on binding to trastuzumab glycoforms binding..	269
Figure annexe C - 6: Influence of the N-glycan profile of wild-type FcγRs upon various trastuzumab glycoforms binding..	273
Figure annexe C - 7: Influence of the N-glycan profile of mutated FcγRIIIa _{V158} upon various trastuzumab glycoforms binding..	274

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Les traductions non transparentes sont indiquées ici.

2-AA	Acide 2-aminobenzoïque
2-AB	2-aminobenzamide
2FF	2-F-peracétyl fucose
2FG	2-déoxy-2-fluoro-D-galactose
AAL	Lectine - <i>Aleuria aurantia lectin</i>
AcM	Anticorps monoclonal (<i>mAb</i> - <i>monoclonal antibody</i>)
ADCC	Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
ADCP	Phagocytose cellulaire dépendante des anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique (<i>DNA</i>)
AQC	6-aminoquinolyl-n-hydroxysuccinimidyl-carbamate
Asn	Asparagine (N)
β 4GT1	β 1,4-galactosyltransférase 1 humaine (GT)
BHK	Lignée cellulaire – <i>Baby hamster kidney</i>
CE-LIF	Électrophorèse capillaire - fluorescence induite par laser
CD	Clusters de différenciation
CDC	Cytotoxicité dépendante du complément - <i>Complement-dependent cytotoxicity</i>
CDR	Région déterminant la complémentarité - <i>Complementarity Determining Region</i>
CID	Dissociation induite par collision
C _H	Chaîne lourde (<i>HC</i>)
C _L	Chaîne légère (<i>LC</i>)
CHO	Lignée cellulaire - Cellule de Hamster Chinois - <i>Chinese hamster Ovary</i>
CMH-1	Complexe majeur d'histocompatibilité

CMP	Cytidine monophosphate
CNRC	Conseil national de recherches Canada
ConA	Concanavalin A
CQA	Attribut de qualité critique
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
E5/K5	<i>Ecoil/Kcoil</i>
EBNA1	<i>Epstein-Barr nuclear antigen 1</i>
ECL	Lectine - <i>Erythrina cristagalli lectin</i>
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
ELISA	Dosage immuno-enzymatique - <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPO	Érythropoïétine
ESI	Électronébulisation
Fab	Fragment de l'immunoglobuline se liant à l'antigène
Fc	Fraction cristallisable
FcγR	Récepteurs Fc gamma
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FT-ICR	Résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier
Fv	Fragment variable
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acétylgalactosamine
GDP	Guanosine diphosphate
GFP	Protéine fluorescente verte
GlcNAc	N-Acetylglucosamine

Gln	Glutamine (Q)
GM-CSF	Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages
GMD	GDP-mannose-4,6-déhydratase
GntIII	N-acétylglucosaminyltransférase III
GPI	Glycosyl-phosphatidylinositol
GTS	GDP-6-deoxy-D-talose synthétase
HBS-P	Tampon HEPES salin avec polysorbate 20
HEK-293	Lignée cellulaire - <i>Human embryonic kidney</i>
HER-2	Récepteur pour les facteurs de croissance épidermiques humains-2
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl) -1-pipérazine éthane sulfonique
HPAE-PAD	<i>High-performance anion-exchange chromatography - Pulsed amperometric detection</i>
HPLC-HILIC	<i>High-performance liquid chromatography - Hydrophilic interaction</i>
HPT	Méthode analytique haut-débit
HRP	Peroxydase de raifort - <i>horseradish peroxidase</i>
IFN- γ	Interféron gamma
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
IMAC	Chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés
ITAM	Motif d'activation des récepteurs immuns basé sur la tyrosine
ITIM	Motif d'inhibition des récepteurs immuns basé sur la tyrosine
IVIg	Immunoglobuline intraveineuse
LacdiNAc	GalNAc β 1-4GlcNAc
LCA	Lectine - <i>Lens culinaris agglutinin</i>
MALDI	Désorption-ionisation par impact laser assistée par matrice

MALII	Lectine - <i>Maackia amurensis lectin II</i>
Man	Mannose
MAP-kinase	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MPT	Modifications post-traductionnelles
Neu5Ac	Acide N-acétylneuraminique (NANA)
Neu5Gc	Acide N-glycolylneuraminique
NK	<i>Natural killer</i>
NS0	Lignée cellulaire lymphoïde murine
NSCLC	Cancer bronchique non à petites cellules - <i>Non-small cell lung cancer</i>
OD	Oxygène dissous
PAT	<i>Process Analytical Technology</i>
PBMC	Cellule mononucléée sanguine périphérique
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PD-1	<i>Programmed cell death receptor 1</i>
pH	Potentiel hydrogène
PI3-kinase	Phosphoinositide 3-kinase
PNGaseF	Peptide:N-Glycosidase F
QbD	Qualité par la conception - <i>Quality by Design</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i>
RE	Réticulum endoplasmique
RMD	Réductase GDP-4-dehydro-6-deoxy-D-mannose
RP-LC	Chromatographie liquide en phase inverse
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
SM	Spectrométrie de masse
SNA	Lectine - <i>Sambucus nigra agglutinin</i>
SP2/0	Lignée cellulaire lymphoïde murine
SPR	Résonance des plasmons de surface - <i>Surface plasmon Resonance</i>
ST6Gal1	β -galactoside α 2,6-sialyltransférase 1
sWGA,	Lectine - <i>Succinylated wheat germ agglutinin</i>
TNF	Facteur de nécrose tumorale
Tof	Temps de vol
t-PA	<i>Tissue plasminogen activator</i>
TRIM21	<i>Tripartite motif-containing protein 21</i>
TZM	Trastuzumab
UDP	Uridine diphosphate
UPLC-HILIC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography - Hydrophilic interaction</i>
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
YB2/0	Lignée cellulaire de myélome de rat

LISTE DES ANNEXES

Annexe A – Impact de la N-glycosylation de la région Fc des IgG.....	248
Annexe B – Informations supplémentaires du chapitre 5	254
Annexe C – Informations supplémentaires du chapitre 6	260

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Les protéines recombinantes thérapeutiques

Les protéines recombinantes résultent de l'expression par un organisme ou une cellule hôte d'ADN recombinant obtenu par des méthodes de recombinaison génétique. Plus précisément, le gène d'une protéine d'intérêt est cloné dans un vecteur plasmidique ou viral contenant les séquences de régulation nécessaires à la transcription et à la traduction (Clincke, Guedon, & Goergen, 2011). Le vecteur est ensuite inséré dans une cellule hôte qui utilise sa machinerie cellulaire afin d'exprimer la protéine d'intérêt en grande quantité (Voet & Voet, 2016). Différents types de système d'expression peuvent être utilisés que ce soit des organismes unicellulaires procaryotes (bactéries) et eucaryotes (levures, cellules de mammifères) ou des organismes pluricellulaires (plantes et animaux transgéniques) (Andersen & Krummen, 2002).

De nos jours, les protéines recombinantes sont devenues indispensables que ce soit à des fins industrielles, de recherche et thérapeutiques. Étant donné la complexité des protéines recombinantes destinées à des applications thérapeutiques, les cellules de mammifères sont progressivement devenues le système dominant pour l'expression (Walsh, 2018; Wurm, 2004). En effet, celles-ci sont capables de replier, d'assembler, de sécréter et de réaliser toutes les modifications post-traductionnelles (MPT) (c.-à-d., se produisant après la traduction de l'ARN messager en une chaîne d'acides aminés) essentielles aux propriétés fonctionnelles, structurales et pharmacocinétiques des protéines. Les MPT incluent notamment la protéolyse, la désamination, la formation de ponts disulfures et la glycosylation (Clincke et al., 2011). La glycosylation est la plus importante des MPT et les protéines subissant une ou plusieurs étapes de glycosylations (p.ex., les immunoglobulines G (IgG)) sont appelées glycoprotéines.

Les protéines recombinantes thérapeutiques sont utilisées pour le traitement de maladies telles que les cancers, les désordres immunologiques et les infections. Ces protéines regroupent de nombreux types de molécules très complexes incluant les produits basés sur les anticorps, les protéines de fusion Fc, les anticoagulants, les facteurs du sang, les facteurs de croissance, les enzymes, les hormones, les interférons, les interleukines et les thrombolytiques. Depuis de nombreuses années, le marché des biopharmaceutiques est dominé par les anticorps monoclonaux

(AcM) et leurs dérivés. Globalement, ce début d'introduction peut être résumé par une prévision du marché des biopharmaceutiques énoncée dans une revue récente (Walsh, 2018) :

« The profile of products in advanced-stage clinical trials suggests that biopharmaceutical approvals over the next few years will continue to be predominantly protein-based, that they will be produced largely using conventional mammalian cell expression systems, that monoclonal antibody-based products will continue to dominate the approvals, [...] and that cancer will remain the primary target indication. »

1.2 Les anticorps monoclonaux et les récepteurs Fcγ

Les anticorps monoclonaux sont issus d'un même clone de lymphocyte B et reconnaissent le même épitope (Liu, J. K. H., 2014). La première production *in vitro* d'AcM murins à partir d'hybridomes a été décrite en 1975 (Köhler & Milstein, 1975). Depuis, les AcM n'ont cessé de se développer que ce soit pour la recherche ou à des fins thérapeutiques, devenant ainsi le groupe de protéines recombinantes dominant (Kunert & Reinhart, 2016). Aujourd'hui, les AcM sont particulièrement utilisés dans des techniques de routine (ELISA, *Western blot*) et comme protéine thérapeutique pour des maladies telles que les cancers ou les maladies auto-immunes (Liu, J. K. H., 2014).

Le marché des anticorps monoclonaux est très lucratif puisqu'en 2017 les anticorps ont représenté un marché de 103 milliards de dollars, pour un total de 57 AcM et 11 biosimilaires approuvés (Walsh, 2018). Les prévisions montrent que le marché des biopharmaceutiques continuera à être dominé par les AcM et que les ventes globales d'AcM devraient atteindre entre 137 à 200 milliards de \$US en 2022 (Grilo & Mantalaris, 2019). Ces prévisions s'appuient sur les centaines de nouveaux candidats en développement, incluant des produits liés aux anticorps tels que les protéines de fusion Fc, les conjugués anticorps-médicament et les bispécifiques, des AcM déjà approuvés optimisés (*biobetter*) et des biosimilaires dus à l'expiration des brevets d'AcM commerciaux (Udpa & Million, 2015; Walsh, 2018).

L'engouement pour les AcM est principalement lié au rôle des IgG d'agent de liaison entre la reconnaissance spécifique d'un antigène et le déclenchement de fonctions effectrices (Buss, Henderson, McFarlane, Shenton, & de Haan, 2012; Pérez-Garcia, Muñoz-Couselo, Cortés, & Scaltriti, 2014; Ribatti, 2014; Weiner, 2015). En effet, les AcM thérapeutiques sont principalement

basés sur l'IgG1 qui, structurellement, est formée de trois régions protéiques indépendantes (2 Fab et 1 Fc) connectées entre elles par la région charnière (Kaplon & Reichert, 2018; Vidarsson, Dekkers, & Rispens, 2014; Walsh, 2018). Les deux régions Fab expriment un site de liaison spécifique à un antigène alors que la région Fc, de séquence peptidique identique pour toutes les IgG1, porte les sites d'interaction de plusieurs ligands. Les réponses biologiques induites par l'interaction des ligands avec la région Fc de l'anticorps sont vastes, puissantes et complexes avec des effets à la fois activateurs et inhibiteurs. Par exemple, le récepteur Fc néonatal (FcRn) est responsable de l'augmentation de la demi-vie des IgG (recyclage) et du transport à travers le placenta. D'autres ligands permettent le déclenchement de diverses fonctions effectrices. C'est le cas des récepteurs Fcγ (FcγR), présents à la surface des cellules de l'immunité innée, qui mènent à la neutralisation ou à la destruction du pathogène via le déclenchement de fonctions effectrices (voir plus bas). Citons également le C1q (composant 1q de la voie classique du complément), responsable de la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) et le TRIM21 (*tripartite motif-containing protein 21*) qui cible les virus et les bactéries opsonisés et les neutralise grâce au système ubiquitine-protéasome. Finalement, l'affinité de la région Fc pour la protéine A (une protéine trouvée dans les parois des bactéries *Staphylococcus aureus*) est mise à profit dans le procédé de purification des IgG (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2015; Desjarlais & Lazar, 2011; Hanson & Barb, 2015; Vidarsson et al., 2014).

Les FcγR sont des glycoprotéines présentes sur la presque totalité des cellules immunitaires. Elles sont divisées en trois catégories : FcγRI, FcγRIIa-c et FcγRIIIa/b (Nimmerjahn, Gordan, & Lux, 2015). Ces récepteurs peuvent également être classés fonctionnellement en deux classes : activateurs (FcγRI, FcγRIIa/c et FcγRIIIa) et inhibiteur (FcγRIIb) ou selon leur différence d'affinité pour les IgG (Bruhns et al., 2009). En effet, le FcγRI est considéré comme un récepteur de forte affinité tandis que les autres récepteurs sont de faible affinité. Dépendamment des types de cellule immunitaire et de FcγR engagés, quatre mécanismes peuvent être induits : (i) la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP) via les macrophages et les neutrophiles, (ii) la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) via les FcγRIIIa présents sur les cellules NK, (iii) la présentation antigénique via les cellules présentatrices de l'antigène (p.ex., les cellules dendritiques) et (iv) la sécrétion de facteurs solubles (p.ex., des cytokines). L'implication des FcγR dans la régulation d'une multitude de réponses immunitaires les place au

cœur du développement de nouvelles approches immunothérapeutiques (Nimmerjahn & Ravetch, 2008).

Le site de liaison des FcγR se situe sur la partie inférieure de la région charnière et les parties supérieures des domaines C_{H2} de l'IgG (Cohen-Solal, Cassard, Fridman, & Sautes-Fridman, 2004; Hanson & Barb, 2015). Or, sur chacun des domaines C_{H2}, dans la région incluant le site d'interaction des FcγR, se situe un site hautement conservé de N-glycosylation, à savoir les résidus asparagine 297 (Spearman, Dionne, & Butler, 2011). Les N-glycanes des IgG ont une influence majeure sur les propriétés biophysiques et biologiques de l'anticorps, notamment sur l'interaction avec les FcγR.

1.3 L'influence critique de la N-glycosylation des IgG

La glycosylation est la MPT la plus commune (plus de 50 % des protéines humaines) et la plus complexe. Plus d'un tiers des biopharmaceutiques approuvés sont des glycoprotéines (Walsh & Jefferis, 2006). La glycosylation consiste à attacher un ou plusieurs groupes de glycanes aux protéines de façon covalente pour former des biomolécules complexes (Struwe, Cosgrave, Byrne, Saldova, & Rudd, 2010). Dans le cas de la N-glycosylation, le glycanes est attaché sur l'asparagine (Asn) de la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (avec X pouvant être n'importe quel acide aminé sauf la proline) (Walsh & Jefferis, 2006). La N-glycosylation confère aux glycoprotéines leurs propriétés structurelles et fonctionnelles (Struwe et al., 2010). Les glycoprotéines apparaissent comme un mélange de variants de glycosylation appelés glycoformes (Brooks, 2009). Cette variabilité est due à la présence (ou non) d'un sucre attaché à la séquence consensus - on parle alors de macrohétérogénéité - mais aussi à la structure finale du glycanes attaché - on parle alors de microhétérogénéité (Brooks, 2009; Spearman et al., 2011). L'IgG possède deux N-glycanes dont la chaîne glycanique typique est une structure complexe bi-antennaire composée d'un heptasaccharide central comprenant des résidus de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et de mannose (Hayes, Cosgrave, et al., 2014; Spearman et al., 2011; Vidarsson et al., 2014). Les N-glycanes de la région Fc possèdent un niveau élevé de fucosylation et un nombre variable de galactose (Zauner et al., 2013). Étant donné que le profil de glycosylation des IgG est susceptible d'influencer à la fois l'activité biologique, la fonction, la clairance, l'immunogénicité, ainsi qu'un certain nombre de propriétés biophysiques, les N-glycanes des IgG sont considérés comme des attributs de qualité critique (CQA).

De nombreuses recherches ont été réalisées afin de définir les impacts de la variation structurales des glycanes sur l'interaction avec les FcγR et sur les fonctions effectrices (Spearman et al., 2011). Globalement, la présence des N-glycanes de l'IgG est essentielle pour l'interaction avec le FcγRIIIa (Dorion-Thibaudeau et al., 2014; Dorion-Thibaudeau, St-Laurent, Raymond, De Crescenzo, & Durocher, 2016; Yamaguchi et al., 2006). Concernant la fucosylation des glycanes de la région Fc de l'IgG, celle-ci a fait l'objet d'une attention particulière puisque l'absence de fucose augmente considérablement l'affinité pour le récepteur FcγRIIIa, se traduisant alors par une augmentation notable de l'ADCC (Yamane-Ohnuki & Satoh, 2009). Dans le cas d'autres résidus comme le galactose et l'acide sialique, les effets sur l'interaction avec les FcγR sont ambigus, au vu de la divergence des résultats obtenus par les différents groupes s'étant penchés sur la question. Cette ambiguïté est liée à la disparité des méthodes utilisées pour l'évaluation de l'affinité et de l'activité biologique, à l'hétérogénéité des glycoformes d'IgG dépendante de la méthode de glycoingénierie utilisée et/ou à l'absence d'une caractérisation précise des glycanes (Dekkers et al., 2017; Li, T. et al., 2017; Subedi & Barb, 2016; Thomann et al., 2015). Par exemple, dans le cas de la mesure des cinétiques d'interaction entre IgG et FcγR, la résonance des plasmons de surface (SPR) est la technique biophysique la plus largement utilisée puisque celle-ci permet la mesure en temps réel de l'interaction entre un ligand immobilisé et son partenaire injecté. Or, pour cette technique seulement, les conditions opératoires utilisées par chacun des groupes de recherche impliqués dans de tels travaux sont très différentes. Cela concerne particulièrement la méthode d'immobilisation du ligand qui s'avère être sous-optimale dans la plupart des cas.

La potentialisation de l'interaction des anticorps avec les FcγR est au cœur du développement de nouveaux anticorps thérapeutiques aux propriétés biologiques et biophysiques supérieures. Cela est permis par l'ingénierie des sites d'interaction des récepteurs de la région Fc et par l'enrichissement sélectif de glycoformes désirés d'AcM produits par culture cellulaire par glycoingénierie (p.ex., AcM afucosylés) (Lejeune, Thibault, Cartron, Ohresser, & Watier, 2010; Sondermann & Szymkowski, 2016). Néanmoins, la compréhension fine du rôle de la microhétérogénéité des IgG sur l'interaction avec l'ensemble des FcγR est essentielle pour rationaliser le développement d'AcM thérapeutiques avec une efficacité clinique supérieure (Spearman et al., 2011).

1.4 Et la glycosylation des récepteurs Fcγ dans tout ça ?

Les FcγR possèdent aussi un nombre important de sites de N-glycosylation (c.-à-d., 7 sur FcγRI, 5 sur FcγRIIIa, 2 sur FcγRIIa et 3 sur FcγRIIb). L'intérêt pour la glycosylation des FcγR est plus récent que celui des IgG puisqu'initialement l'utilisation des FcγR était restreinte aux études structure/fonction des IgG. Néanmoins, de nombreuses études ont récemment mis en évidence l'impact complexe et significatif de la N-glycosylation des FcγR, et plus particulièrement du FcγRIIIa, sur l'interaction avec les IgG1 (Ferrara et al., 2011; Hayes, Frostell, et al., 2014; Hayes et al., 2017; Subedi & Barb, 2018). Encore une fois, les impacts observés pour la macrohétérogénéité et la microhétérogénéité diffèrent selon les études.

D'un côté, des études soulignent l'impact de N-glycanes sur l'interaction avec les IgG1 en éliminant séquentiellement les sites de glycosylation des FcγR. L'une des plus significatives découvertes concerne l'implication du N-glycane sur le résidu Asn162 du FcγRIIIa. Plus précisément, ce glycane joue un rôle dans l'augmentation d'affinité observée pour les IgG afucosylées, via diverses interactions intermoléculaires complexes dont la nature fait l'objet d'un désaccord considérable entre groupes de recherche (Falconer, Subedi, Marcella, & Barb, 2018; Ferrara et al., 2011; Mizushima et al., 2011; Sakae et al., 2017).

D'un autre côté, de nombreuses recherches ont étudié les structures glycaniques des récepteurs produits dans divers types cellulaires, et ce, de façon globale ou site par site (Cosgrave et al., 2013; Hayes, Frostell, et al., 2014; Hayes et al., 2017; Kawasaki et al., 2014; Takahashi et al., 2002; Zeck, Pohlentz, Schlothauer, Peter-Katalinic, & Regula, 2011). Ces études ont ainsi permis de documenter la spécificité de la glycosylation des FcγR pour le type de cellule, la variabilité entre systèmes d'expression et entre lots mais aussi d'évaluer l'importance du site de N-glycosylation des FcγR (et de la nature du glycane) sur l'interaction avec l'IgG1.

Toutefois, il est important de noter que la nature recombinante des FcγR utilisés pour ces études ne reflète pas les structures glycaniques naturelles. L'étude des formes naturelles de la N-glycosylation de FcγR présents sur chacune des cellules immunitaires ainsi que dans des états pathologiques et sains permettrait de mieux comprendre les mécanismes de modulation de la réponse immunitaire liée aux anticorps (Hayes, Wormald, Rudd, & Davey, 2016). En effet, plusieurs travaux ont montré que les glycoformes de FcγRIIIa diffèrent selon la cellule immunitaire et présentent des affinités différentes pour les IgG, suggérant que la réponse des anticorps médiés

par les Fc γ R est modulée par le glycome spécifique des cellules (Edberg, Barinsky, Redecha, Salmon, & Kimberly, 1990; Edberg & Kimberly, 1997; Kimberly et al., 1989). Cependant, la caractérisation des formes de N-glycanes dans les tissus humains représente un défi lorsqu'on considère la difficulté d'obtenir une quantité suffisante de matériel pour l'analyse (Patel, K. R. et al., 2018).

Le rôle des glycanes des Fc γ R dans la modulation fine de la réponse immunitaire liée aux anticorps - afin d'estimer les conséquences possibles sur les effets de glycoformes d'AcM thérapeutiques - est toujours flou. Des méthodes biophysiques permettant l'évaluation des effets de la glycosylation des Fc γ R sur l'interaction avec les IgG, combinées à l'utilisation de Fc γ R recombinants ayant des profils de glycosylation similaires à ceux des Fc γ R naturels, permettrait d'obtenir des données cinétiques d'intérêt pour une meilleure compréhension (et prédiction) des effets thérapeutiques des anticorps.

1.5 Objectifs et structure de la thèse

Par une analyse critique de la littérature, le **Chapitre 2** a pour but de fournir aux lecteurs les éléments nécessaires à la compréhension des travaux présentés dans les chapitres ultérieurs. Ainsi, les anticorps monoclonaux et plus particulièrement les IgG, leur rôle en tant que protéine thérapeutique et leurs récepteurs spécifiques (les Fc γ R) seront introduits. Puis, plusieurs parties discuteront de la N-glycosylation des IgG et des récepteurs Fc γ , de son importance dans le cadre des anticorps monoclonaux thérapeutiques ainsi que des différentes méthodes pour la modifier et l'analyser. Enfin, le phénomène de résonance des plasmons de surface (SPR) utilisé dans des biocapteurs pour l'analyse d'interaction sera présenté. Cette méthode est très largement utilisée dans ces travaux et dans nombres d'études pour l'évaluation des interactions IgG / Fc γ R. L'interaction superhélice EK, fondamental dans le cadre de ces travaux, est également présentée. Brièvement, il s'agit de deux peptides (E5 et K5) de 35 acides aminés conçus *de novo* qui se lient lorsque mis en contact pour former la structure superhélice. Ce système a été largement utilisé dans notre laboratoire pour capturer des protéines de manière stable et orientée sur diverses surfaces pour diverses applications. Enfin, une partie portant sur l'influence de la N-glycosylation des IgG et des récepteurs Fc γ sur leurs interactions et sur les propriétés de l'IgG conclura la revue de littérature.

Dans un contexte de rationalisation du développement d'AcM thérapeutiques, l'objectif général de ce projet est donc d'étudier l'influence de la N-glycosylation des IgG et des FcγR sur leurs interactions par une technique biophysique. Pour cela, un biocapteur dont le principe de détection est basé sur la SPR a été utilisé afin de mesurer les cinétiques d'interaction entre les glycoformes de FcγR immobilisés et les glycoformes d'IgG injectés. Dans l'hypothèse où l'utilisation de l'interaction superhélice permettrait d'immobiliser les FcγR de façon stable et orientée pour des études cinétiques d'interaction reproductibles et peu coûteuses, nous tenterons de répondre à la problématique selon les objectifs spécifiques suivants :

- (i) Développer et valider un essai SPR permettant la mesure de l'interaction entre les FcγR immobilisés et les IgG injectées sur la base de l'interaction superhélice.
- (ii) Mesurer l'influence de la N-glycosylation des IgG sur leurs interactions avec les FcγR.
- (iii) Mesurer l'influence de la macro- et de la microhétérogénéité des FcγR sur leurs interactions avec différents glycoformes d'IgG.

Chacun de ces objectifs fait l'objet d'un article scientifique publié, soumis ou prochainement soumis à des revues à comité de lecture. Après avoir exposé la démarche de l'ensemble du travail dans le **Chapitre 3**, les articles scientifiques sont présentés dans le **Chapitre 4** (objectif (i)), le **Chapitre 5** et l'**Annexe B** (objectif (ii)) et le **Chapitre 6** et l'**Annexe C** (objectif (iii)). Plus précisément, le **Chapitre 4** présente le développement et la caractérisation de notre méthode d'immobilisation des FcγR fondée sur l'interaction superhélice. Puis, à partir de cette nouvelle approche, nous avons étudié l'influence de la N-glycosylation des IgG et des FcγR sur leurs interactions. Les résultats de ces études se situent respectivement dans les articles scientifiques présentés dans le **Chapitre 5** et le **Chapitre 6**.

•

CHAPITRE 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 Les anticorps monoclonaux

2.1.1 Les anticorps dans le système immunitaire

Le système immunitaire d'un individu se décline en deux immunités dites innée et adaptative (Figure 2-1). L'immunité innée fournit la première ligne de défense face aux infections grâce à divers mécanismes de défenses présents avant l'infection. Celle-ci a pour but de prévenir ou de limiter rapidement et de façon non spécifique une infection par un microorganisme (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2014). Au contraire, l'immunité adaptative, plus tardive et nécessitant une exposition à un microbe pour se mettre en place, permet une réponse spécifique. De plus, cette dernière a la capacité de répondre plus fortement aux expositions répétées d'un même microbe grâce à la mise en place d'une réponse mémoire (Abbas et al., 2014). L'immunité adaptative permet à la fois la destruction des microbes intracellulaires via les lymphocytes T de l'immunité à médiation cellulaire et extracellulaires via les lymphocytes B de l'immunité humorale (Abbas et al., 2015). Dans le cadre de l'immunité humorale, les anticorps, membranaires ou sécrétés dans la circulation et sur les muqueuses, jouent un rôle essentiel dans la neutralisation et l'élimination des microbes et des toxines microbiennes extracellulaires. Un anticorps est capable de reconnaître une séquence de l'antigène appelée épitope et de se lier à celui-ci avec plus ou moins d'affinité grâce à des interactions non covalentes et réversibles telles que des ponts hydrogènes (Abbas et al., 2015). De plus, les anticorps peuvent se lier à une grande variété d'antigènes de façon très spécifique, empêchant ainsi l'endommagement des cellules ou l'entrée de microbes dans des cellules hôtes (Abbas et al., 2015).

Les anticorps font partie de la superfamille des immunoglobulines, incluant de nombreuses glycoprotéines impliquées dans des phénomènes de reconnaissance, d'adhésion des cellules et de liaison (Paul, 2012). Les protéines membres de cette superfamille présentent une homologie de séquence, une organisation des gènes commune et des similitudes dans leur conformation tridimensionnelle. Cette dernière consiste en sept feuillets β plissés organisés en deux couches opposées et reliées par un pont disulfure (Figure 2-2) (Paul, 2012).

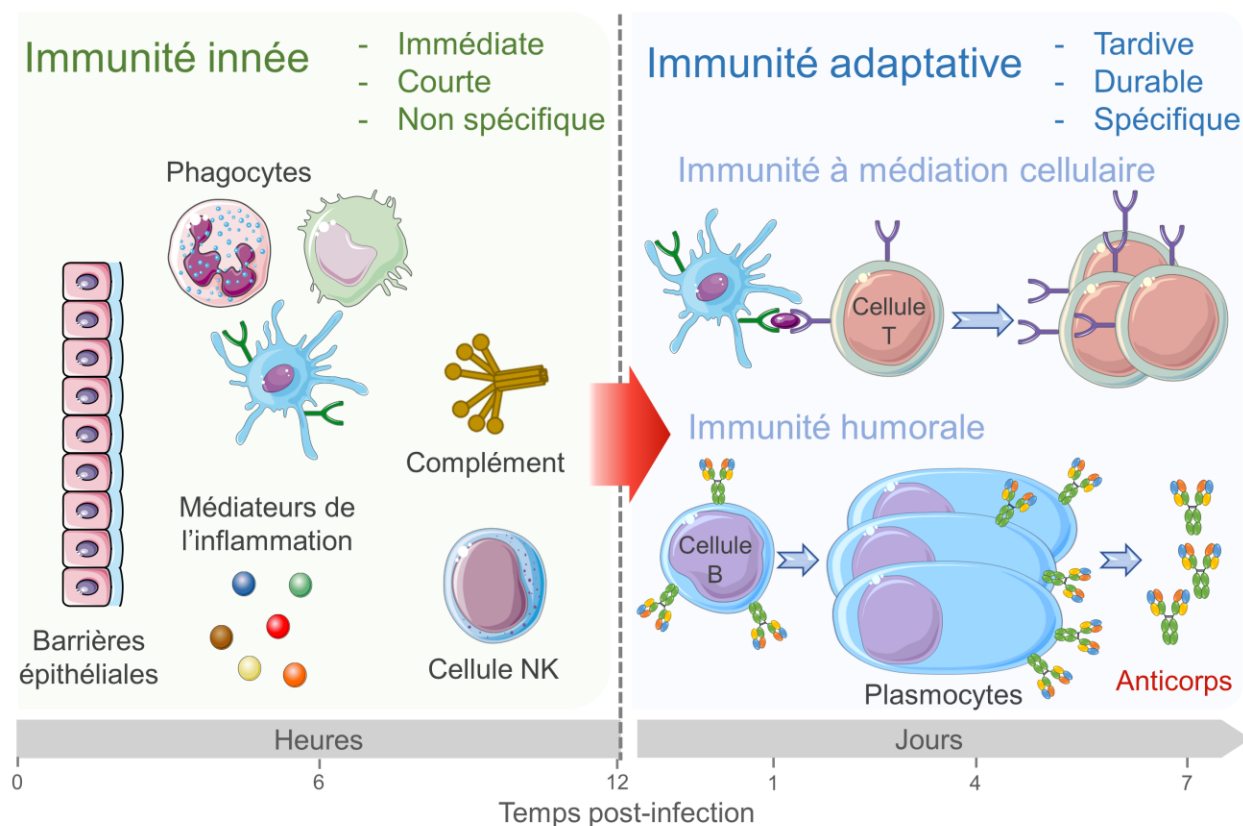


Figure 2-1 : Représentation schématique de la réponse immunitaire. Figure adaptée de (Abbas et al., 2015).

Chez l'humain, il existe 5 isotypes d'anticorps appelés IgA, IgD, IgE, IgG et IgM dont la principale différence se situe au niveau de leur chaîne lourde qui peut être respectivement de type α , δ , ϵ , γ ou μ . Cette diversité apportée par la production d'isotypes apporte une plasticité à la réponse liée aux anticorps et leur permet d'activer différentes fonctions (Abbas et al., 2015). Les caractéristiques de ces 5 isotypes sont rassemblées dans le Tableau 2-1. Les chaînes légères peuvent être de deux types (κ ou λ). Elles diffèrent au niveau de leur partie constante (C_L) mais possèdent les mêmes fonctions (Jefferis, 2010).

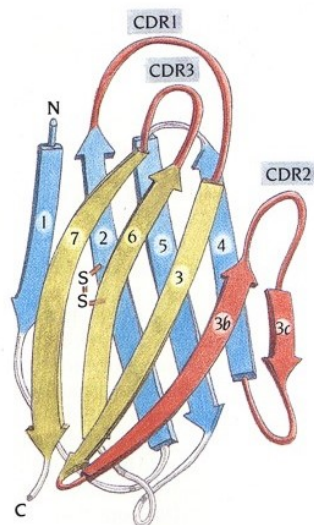


Figure 2-2 : Représentation du domaine immunoglobuline. Figure adaptée de (Branden & Tooze, 1991). Les flèches aplaties représentent les feuillets β plissés.

Le rôle d'agent de liaison entre la reconnaissance spécifique d'un antigène et le déclenchement de fonctions effectrices explique l'étude intensive de l'anticorps pour le développement d'outils pour la recherche ou à des fins thérapeutiques (Buss et al., 2012; Liu, J. K. H., 2014; Ribatti, 2014; Weiner, 2015). En effet, l'anticorps est largement utilisé dans des techniques de routine telles que l'ELISA (Gan & Patel, 2013) ou le Western blot (Mahmood & Yang, 2012) mais aussi comme protéine thérapeutique pour des maladies telles que le cancer ou les maladies auto-immunes (Liu, J. K. H., 2014).

Dans la suite de cette revue, une attention particulière sera portée à la classe des IgG et à leur application thérapeutique puisqu'il s'agit de l'isotype d'anticorps utilisé dans nos travaux.

Tableau 2-1 : Caractéristiques des isotypes d’anticorps. Tableau adapté de (Abbas et al., 2015; Hayes, Cosgrave, et al., 2014; Manz, Hauser, Hiepe, & Radbruch, 2005; Paul, 2012).

Isotype	IgA	IgD	IgE	IgG	IgM
Structure	Mono-, di- ou trimère	Membranaire	Monomère	Monomère	Pentamère
Sous-type	IgA1-2	-	-	IgG1-4	-
Chaîne lourde	α (1 ou 2)	δ	ϵ	γ (1, 2, 3 ou 4)	μ
Poids moléculaire (kDa)	160 (340)	184	188	146-170	160 (970)
Demi-vie (Jours)	6	3	2.5	21	10
Pourcentage d’Ig sériques (%)	7-15	0.3	0.02	85	5
Fonctions	Sécrétée dans les fluides corporels et responsable de l’immunité dans les muqueuses	Récepteur membranaire à antigène sur les lymphocytes B naïfs	Liaison à des récepteurs spécifiques (Fc ϵ RI) sur les basophiles et mastocytes Responsable des réponses inflammatoires allergiques Protection contre parasites	Opsonisation Activation du complément ADCC Immunité néonatale Rétroaction inhibitrice des lymphocytes B	Récepteur membranaire à antigène sur les lymphocytes B naïfs Activation du complément

2.1.2 Les anticorps monoclonaux thérapeutiques

Les anticorps monoclonaux thérapeutiques développés par les laboratoires biopharmaceutiques sont presque totalement basés sur l’IgG, et plus particulièrement l’IgG1, puisque cette classe d’anticorps est la plus abondante chez l’humain (Tableau 2-1 et Tableau 2-2) (Jefferis, 2007; Vidarsson et al., 2014). Au niveau structural, la forme la plus simple d’une IgG est composée de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes (H, ~50 kDa) identiques et deux chaînes légères (L, ~25 kDa) identiques (Figure 2-3) (Jefferis, 2007, 2010). Chacune de ces chaînes est constituée de domaines immunoglobulines homologues composés d’environ 110 acides

aminés (Figure 2-2) (Jefferis, 2009a). Chaque chaîne lourde possède un domaine variable N-terminal (V_H) et trois domaines constants (C_H1 , C_H2 et C_H3) avec un lien flexible appelé région charnière entre C_H1 et C_H2 . Les chaînes légères possèdent également un domaine variable N-terminal (V_L) et un domaine constant (C_L) (Paul, 2012; Vidarsson et al., 2014). Chaque partie variable des chaînes lourdes (V_H) et des chaînes légères (V_L) contient trois régions dites hypervariables (CDR - *complementarity-determining region*) responsables de la liaison avec l'antigène. Parmi ces trois régions, la CDR3 présente la plus grande variabilité et contribue plus fortement à la liaison avec l'antigène (Abbas et al., 2015). L'appariement des quatre chaînes, dû à la présence de ponts disulfures dans la région charnière et entre les chaînes lourdes et légères ainsi qu'à des liaisons non-covalentes entre les domaines C_H3 , permet la formation de trois régions protéiques indépendantes connectées entre elles par la région charnière (Jefferis, 2007, 2009a; Vidarsson et al., 2014).

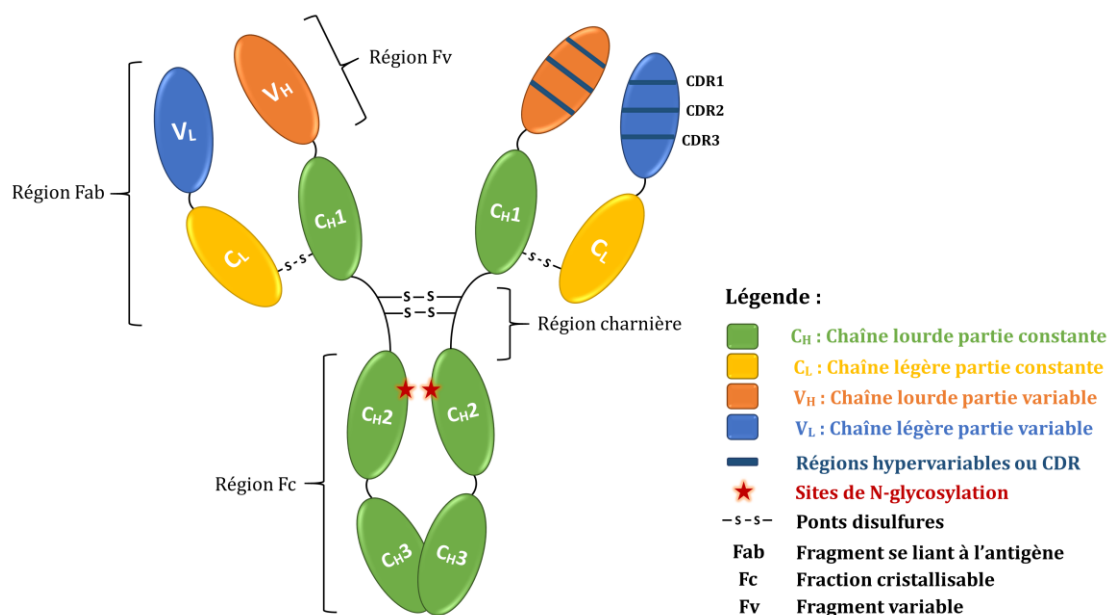


Figure 2-3 : Représentation schématique d'une immunoglobuline G (IgG).

Les chaînes légères associées aux domaines V_H et C_H1 forment deux régions Fab (*fragment antigen binding*) de structures identiques. Fonctionnellement, chacune de ces deux régions Fab exprime un site de liaison spécifique à un antigène via l'interaction des parties variables ($V_L + V_H$) et à l'assemblage différentiel des segments de gène Variable, Diversité et Jonction et à l'inclusion de mutations somatiques (Vidarsson et al., 2014).

La partie inférieure de la région charnière et les domaines C_H2 et C_H3 forment la région Fc (fragment cristallisable, puisque celle-ci tend à cristalliser en solution) (Jefferis, 2010; Vidarsson et al., 2014). Cette région exprime les sites d'interaction de plusieurs partenaires responsables du déclenchement de fonctions effectrices menant à la neutralisation ou à la destruction du pathogène et permet une communication entre les immunités innée et adaptative (Desjarlais & Lazar, 2011; Jefferis, 2007). Sur chacun des domaines C_H2 - plus précisément au résidu asparagine 297 (Asn-297) - se trouve un site hautement conservé de N-glycosylation ayant un impact sur les propriétés biophysiques et biologiques de l'anticorps (Spearman et al., 2011). La N-glycosylation et son influence seront longuement abordées dans la suite de cette revue.

Les IgG sont divisées en 4 sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4), basées sur leur abondance dans le sérum (Jefferis, 2009a). Malgré une homologie de 90 % au niveau de la composition en acide aminé, ces quatre sous-classes présentent des variations dans la région charnière et au niveau de la partie N-terminale du domaine C_H2 (Vidarsson et al., 2014). Ces différences significatives affectent leur liaison avec les récepteurs et les autres molécules contribuant à moduler l'activité des anticorps contre des microbes ou des tumeurs. Chaque sous-classe possède donc un profil unique au niveau de la liaison à l'antigène, la formation du complexe immun, l'activation du complément, le déclenchement des cellules effectrices, la demi-vie et le transport placentaire (Jefferis, 2005; Nimmerjahn & Ravetch, 2005; Vidarsson et al., 2014). Le Tableau 2-2 résume l'ensemble des caractéristiques de ces 4 sous-classes d'IgG. L'IgG1 est la sous-classe d'IgG la plus abondante et l'acteur majoritaire lors de réponses d'anticorps aux antigènes solubles et protéines membranaires. L'IgG2 semble intervenir majoritairement lors des réponses contre les antigènes polysaccharidiques capsulaires des bactéries. L'IgG3 est particulièrement efficace pour le déclenchement des fonctions effectrices. Cependant, en raison de ses propriétés fortement pro-inflammatoires, son temps de demi-vie est plus court et permet de limiter son activité excessive lors de réponses inflammatoires. Finalement, l'IgG4 est souvent formée après une exposition à long terme ou répétée d'antigènes (Jefferis, 2007; Vidarsson et al., 2014).

Tableau 2-2 : Caractéristiques des sous-classes d'immunoglobuline G. Tableau adapté de (Hamilton, 1987; Pan & Hammarström, 2000; Paul, 2012; Vidarsson et al., 2014).

Isotype	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Structure				
Poids moléculaire (kDa)	146	146	170	146
Demi-vie (jours)	21	21	7	21
Pourcentage d'IgG sériques (%)	66	24	7	3
Acides aminés dans la région charnière	15	12	62	12
Ponts disulfures dans la région charnière	2	4	11	2
Transfert à travers le placenta	++++	++	++	+++
Activation du complément via C1q	++	+	+++	0
Réactivité avec la protéine A via la région Fc	++	++	+/-	++

Comme expliqué précédemment, l'anticorps joue un rôle central dans la neutralisation ou la destruction de tout corps considéré comme étranger (Figure 2-4). Selon ce dernier, l'anticorps peut neutraliser le microbe ou la toxine via la liaison avec les régions Fab. Cela permet de prévenir toute infection ou contamination d'une cellule ou simplement d'éviter l'expansion d'une infection (Abbas et al., 2015). Dans d'autres cas, l'anticorps peut induire diverses fonctions effectrices via l'interaction de la région Fc avec certains ligands tels que les récepteurs Fc γ (Fc γ R) présents à la surface des cellules du système immunitaire inné et le composé du complément C1q (Desjarlais & Lazar, 2011; Jefferis, 2012). L'interaction avec ces ligands permet aux IgG de communiquer avec l'immunité innée et d'induire des réponses immunitaires telles que la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP) ou la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) (Abbas et al., 2015; Desjarlais & Lazar, 2011; Vidarsson et al., 2014). Ces fonctions sont développées dans la partie 2.1.3.2.

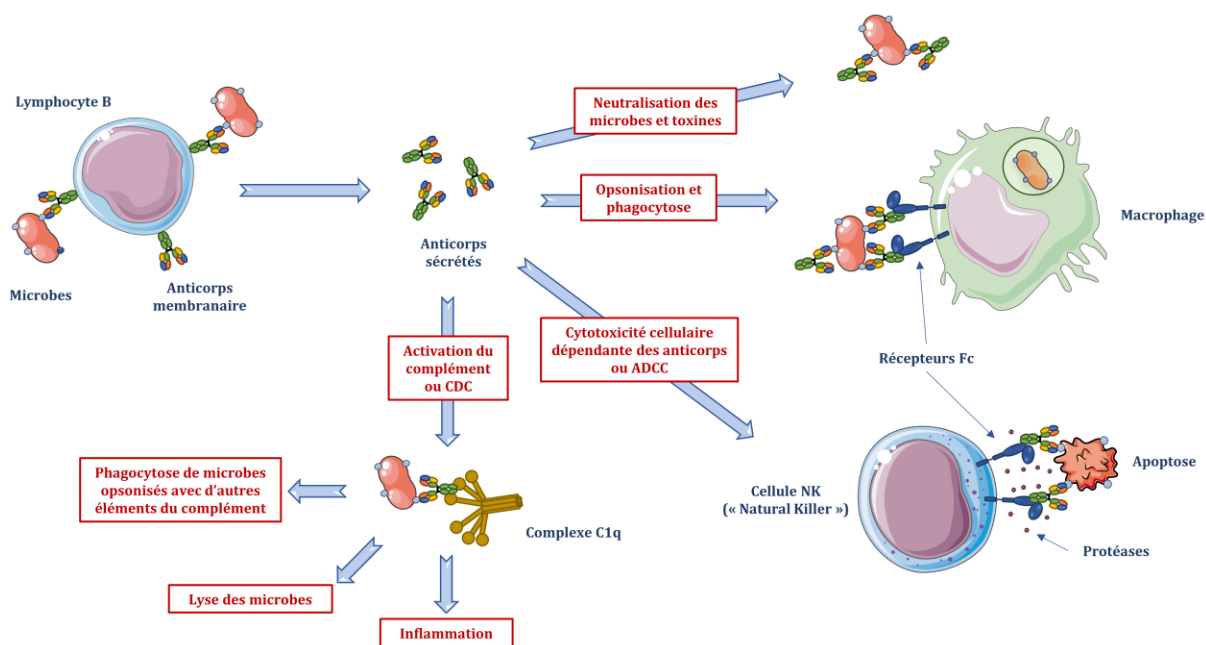


Figure 2-4 : Représentation schématique des fonctions effectrices de l'IgG. Figure adaptée de (Abbas et al., 2015).

La réponse immunitaire à un antigène ou à un organisme via les anticorps est le plus souvent de nature polyclonale. Les anticorps polyclonaux correspondent à un mélange d'anticorps sécrétés par différents clones de plasmocytes et reconnaissent différents épitopes sur un même antigène. C'est seulement en 1975 que Köhler et Milstein décrivent pour la première fois la production *in vitro* d'anticorps monoclonaux de souris à partir d'hybridomes (Köhler & Milstein, 1975; Ribatti, 2014). Les anticorps monoclonaux sont des anticorps monovalents issus d'un même clone de lymphocyte B et reconnaissent le même épitope (Liu, J. K. H., 2014). À partir de cette date, de par leur grande spécificité, les anticorps monoclonaux sont devenus inestimables comme outils biologiques pour le diagnostic et pour diverses techniques de laboratoire (Weiner, 2015). De plus, la technologie des anticorps monoclonaux a été la première étape vers le développement d'anticorps monoclonaux à but thérapeutique et plus particulièrement contre le cancer (Buss et al., 2012). Ainsi, en 1986, le premier anticorps dérivé d'un hybridome de souris, une IgG2a murine (Orthoclone OKT3), est approuvé par le secrétariat américain aux produits alimentaires et pharmaceutiques (*Food and Drug Administration*) pour prévenir les rejets de transplantation de rein.

À la fin des années 80, les anticorps monoclonaux murins (suffixe –omab) développés à partir de la technologie des hybridomes sont reconnus pour présenter néanmoins de nombreux inconvénients (Figure 2-5). En effet, ils sont souvent associés à des réactions allergiques, à l'induction d'anticorps anti-drogue, à une demi-vie plus courte et sont de faibles activateurs des fonctions effectrices (ADCC et CDC) (Buss et al., 2012).

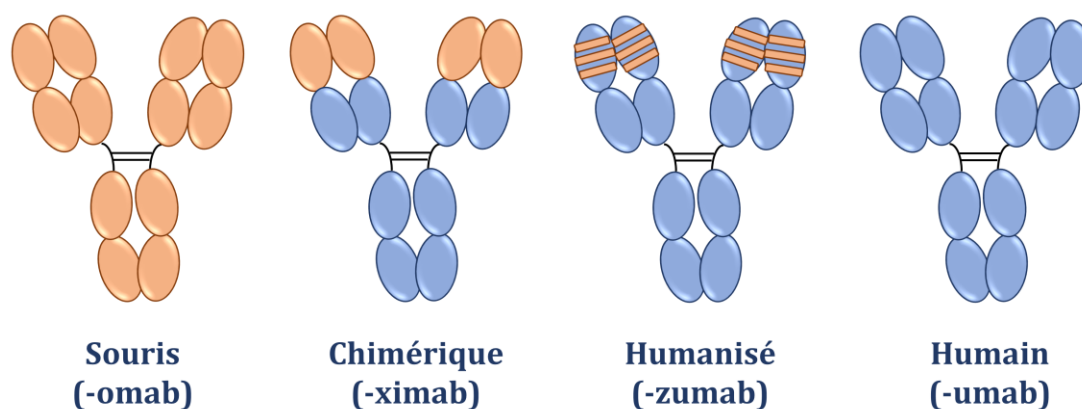


Figure 2-5 : Représentation schématisée des types d'anticorps monoclonaux thérapeutiques et nomenclature. Figure adaptée de (Buss et al., 2012).

Les anticorps chimériques (suffixe -ximab) et humanisés (suffixe -zumab) ont alors été développés par ingénierie génétique afin de surmonter les inconvénients des anticorps murins. Un anticorps chimérique est obtenu par greffage de la totalité des domaines variables murins sur les domaines constants humains, permettant d'obtenir environ 65 % d'homologie avec l'anticorps humain. L'anticorps humanisé est obtenu par greffage des parties hypervariables de la souris sur une structure d'anticorps humain, augmentant l'homologie avec l'anticorps humain à 95 %. Cependant, même si l'humanisation a permis de diminuer l'immunogénicité et d'augmenter la demi-vie par rapport aux anticorps murins et chimériques, ce type d'anticorps présente toujours des limitations et le procédé d'humanisation reste laborieux (Buss et al., 2012).

Par la suite, la volonté de diminuer les limitations des anticorps humanisés et l'utilisation de techniques telles que le *Phage Display* et la génération de souris transgéniques exprimant les domaines variables humains ont permis le développement d'anticorps entièrement humains (suffixe -umab). Le développement des anticorps humanisés et humains a permis d'obtenir des anticorps avec une immunogénicité diminuée, une demi-vie similaire aux IgG humaines endogènes

et une meilleure efficacité pour l'induction des fonctions effectrices. Ces avantages ont permis entre autres une administration du traitement plus pratique pour le patient et une présence plus longue des anticorps dans la circulation (Weiner, 2015).

Les anticorps monoclonaux sont le groupe de molécules pharmaceutiques ayant la croissance la plus rapide et la classe d'agents thérapeutiques majoritaires dans le traitement de nombreuses maladies telles que le cancer ou les maladies auto-immunes (Li, J. & Zhu, 2010; Liu, J. K. H., 2014). La nature flexible de la protéine et les avancées en science dans des domaines comme la biologie moléculaire, l'ingénierie des protéines, la biologie cellulaire et les sciences appliquées provenant des industries biotechnologiques et pharmaceutiques ont permis de maintenir la valeur de l'anticorps sur le marché (Elvin, Couston, & van der Walle, 2013). Ainsi, depuis l'approbation du premier anticorps monoclonal thérapeutique en 1986, les anticorps monoclonaux et l'ensemble des produits liés aux anticorps sont devenus la classe de produits dominante sur le marché des biopharmaceutiques (Figure 2-6) (Walsh, 2018). Un rapport récent de *La Merie Publishing* publié en 2019 montre qu'un total de 46 produits biologiques thérapeutiques ont atteint le statut de « superproduction » avec des ventes dépassant 1 milliard de \$US dont 28 anticorps (Tableau 2-3). Ainsi, les ventes d'anticorps ont représenté plus de 70 % des ventes totales de produits biologiques en 2018 (La Merie Publishing, 2019).

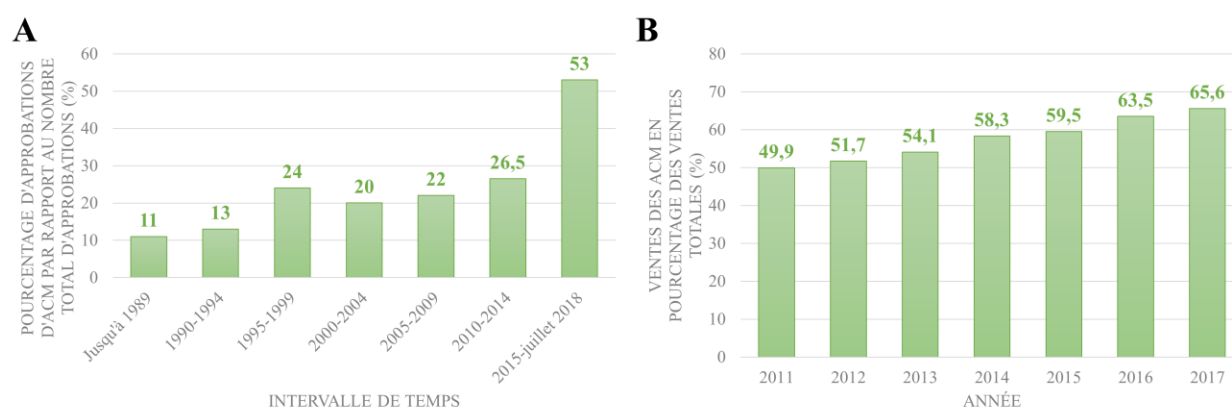


Figure 2-6 : Vue d'ensemble des approbations d'AcM. (A) AcM approuvés pour la première fois au cours des périodes indiquées, exprimée en pourcentage du total des produits biopharmaceutiques approuvés pour la première fois au cours du même intervalle de temps. (B) Ventes annuelles mondiales d'AcM, exprimées en pourcentage des ventes mondiales totales de produits biopharmaceutiques pour les années indiquées. Figure adaptée de (Walsh, 2018).

Tableau 2-3 : Exemples d'anticorps monoclonaux dits « superproductions » classés selon les ventes globales réalisées en 2017.

Tableau adapté de (Buss et al., 2012; Elvin et al., 2013; Urquhart, 2019; Walsh, 2018).

DCI	Nom commercial	Forme	Structure	Isotype	Système de production	Secteur thérapeutique	Cible	Traitement	Année d'approbation	Vente 2017 (Milliards \$US)
Adalimumab	Humira	Humain	IgG	IgG1κ	CHO	Inflammatoire Auto-immune	TNF-α	Arthrite rhumatoïde Maladie de Crohn	2002	18.94
Rituximab	Rituxan	Chimérique	IgG	IgG1κ	CHO	Oncologie	CD20	Lymphomes non hodgkiniens Leucémie lymphoïde chronique Arthrite rhumatoïde	1997	7.78
Infliximab	Remicade	Chimérique	IgG	IgG1κ	Sp2/0	Inflammatoire Auto-immune	TNF-α	Arthrite rhumatoïde Maladie de Crohn	1998	7.77
Trastuzumab	Herceptin	Humanisé	IgG	IgG1κ	Cellule murine	Oncologie	HER-2	Cancer du sein Carcinome gastrique	1998	7.39
Bevacizumab	Avastin	Humanisé	IgG	IgG1κ	CHO	Oncologie	VEGF	Cancer colorectal	2004	7.04
Nivolumab	Opdivo	Humain	IgG	IgG4	CHO	Oncologie	Récepteur PD-1	Mélanome NSCLC Carcinome rénéale	2014	5.79
Ustekinumab	Stelara	Humain	IgG	IgG1κ	Sp2/0	Inflammatoire	IL-12/23 p40	Psoriasis en plaques	2009	4.01
Pembrolizumab	Keytruda	Humanisé	IgG	IgG4	CHO	Oncologique	Récepteur PD-1	Mélanome NSCLC	2014	3.81
Denosumab	Prolia	Humain	IgG	IgG2	CHO	Oncologique	RANKL	Ostéoporose Métastase osseuse	2010	3.54
Ranibizumab	Lucentis	Humanisé	Fab	IgG1κ	<i>E. coli</i>	Physiopathologie	VEGF	Cédème maculaire	2006	3.38
Eculizumab	Soliris	Humanisé	IgG	IgG2/4κ	Myélome murin	Sang	C5	Hémoglobininurie paroxystique nocturne	2007	3.14
Golimumab	Simponi	Humain	IgG	IgG1κ	Sp2/0	Inflammatoire Auto-immune	TNF-α	Polyarthrite rhumatoïde Rhumatisme psoriasique Spondylarthrite ankylosante	2009	2.94
Omalizumab	Xolair	Humanisé	IgG	IgG1κ	CHO	Respiratoire	IgE	Asthme	2003	2.75

Les anticorps monoclonaux continueront de dominer les ventes globales de tous les produits biopharmaceutiques dans les années à venir avec les centaines de nouveaux candidats en développement qui favoriseront la croissance des ventes (Ecker, Jones, & Levine, 2015; Kaplon & Reichert, 2018). De plus, outre les cancers et les maladies auto-immunes, les cibles des AcM en développement comprennent l'obésité, le diabète, la maladie cœliaque, la maladie d'Alzheimer, les infections bactériennes et les maladies de la peau, menant ainsi à un élargissement de l'étendue du marché et à une augmentation de sa taille au cours des 5 à 10 prochaines années (Grilo & Mantalaris, 2019).

La flexibilité des AcM thérapeutiques a également permis le développement (phase d'essai clinique ou approuvé) de nouveaux produits dérivés des anticorps tels que les protéines de fusion Fc, les fragments d'anticorps (Fab, scFv), les conjugués anticorps-médicament et les bispécifiques (Figure 2-7) (Buss et al., 2012; Elvin et al., 2013; Li, J. & Zhu, 2010; Liu, J. K. H., 2014; Strohl, 2018; Walsh, 2018; Weiner, 2015). Ainsi, la FDA a approuvé le premier Fab bispécifique (blinatumumab, Blincyto®) en 2014. Puis, en 2017, le premier AcM bispécifique entier conçu sur la structure d'une IgG4 humanisée (emicizumab, Hemlibra®) a été approuvé (Grilo & Mantalaris, 2019).

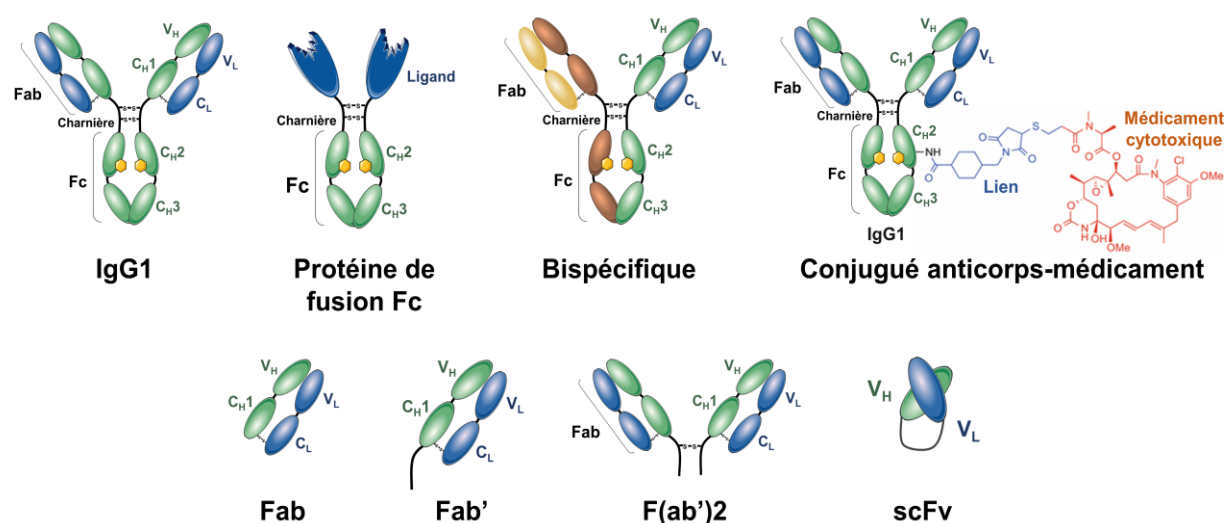


Figure 2-7 : Représentation schématique des produits dérivés des anticorps. Figure adaptée de (Strohl, 2018; Tsuchikama & An, 2018).

Finalement, ces dernières années, de nombreuses entreprises biopharmaceutiques se sont lancées dans le développement d'AcM biosimilaires en raison de l'expiration des brevets des AcM thérapeutiques « superproductions » (Udpa & Million, 2015). Ces biosimilaires correspondent à une version générique des anticorps déjà approuvés. Les biosimilaires doivent avoir une séquence d'acide aminé identique. Cependant, l'utilisation d'un clone et des procédés de production et de purification différents amènent des microvariations et surtout des différences au niveau de la N-glycosylation de la région Fc (Beck, Wurch, Bailly, & Corvaia, 2010). Pour assurer un haut degré de similarité, les agences réglementaires exigent que les différences avec le produit de référence au niveau de la qualité, de la sûreté, de la force, de la pureté et de l'efficacité ne soient pas significatives (Ahmad, Olech, McClellan, & Kirchhoff, 2016). En 2013, les deux premiers biosimilaires sont approuvés en Europe (Ecker et al., 2015; Moorkens et al., 2016). Il s'agit du Remsima (Celltrion) et du Inflectra (Hospira), deux versions biosimilaires de l'anticorps Infliximab (Remicade®) qui cible le facteur de nécrose tumorale (TNF) (Ecker et al., 2015; Udpa & Million, 2015). Depuis, 27 biosimilaires d'anticorps ont été approuvés en Europe ou aux États-Unis (Walsh, 2018) et le développement actuel de nombreux autres biosimilaires ainsi que les nombreux investissements des entreprises biopharmaceutiques assurent une place importante des biosimilaires sur le futur marché des biopharmaceutiques (Udpa & Million, 2015; Walsh, 2018). Il est à noter que le développement des *biobetters* peut tout de même représenter un frein au développement des biosimilaires. Le *biobetter* fait référence à un produit biopharmaceutique déjà approuvé et modifié afin d'améliorer certains aspects de sa performance clinique (p. ex. par une modification structurale, une formulation modifiée d'un produit fini) (Walsh, 2018).

Globalement, en 2017, les anticorps ont représenté un marché de 103 milliards de dollars, pour un total de 57 AcM et 11 biosimilaires approuvés (Walsh, 2018). En 2022, les ventes globales d'AcM devraient atteindre entre 137 à 200 milliards de \$US (Grilo & Mantalaris, 2019).

2.1.3 La région Fc : site d'interaction des récepteurs Fc γ

2.1.3.1 Les sites d'interaction

Comme expliqué précédemment, les anticorps sont des glycoprotéines ayant une double fonctionnalité. D'un côté la région Fab se lie de façon spécifique à un antigène tandis que la région Fc induit des fonctions effectrices via l'interaction avec divers récepteurs (Hanson & Barb, 2015). Grâce à l'interaction avec les récepteurs Fc, présents majoritairement sur les cellules de l'immunité innée mais aussi sur diverses cellules endothéliales, la région Fc unifie les immunités adaptative et innée (Anderson, Ganesan, & Robinson, 2015; Cassard et al., 2006; Cohen-Solal et al., 2004; Vidarsson et al., 2014). Ces dernières années, les recherches sur ces récepteurs se sont multipliées afin d'appréhender les mécanismes moléculaires et cellulaires liés à l'activité thérapeutique des anticorps monoclonaux, de plus en plus utilisés pour le traitement de diverses maladies (Nimmerjahn et al., 2015). De plus, dans le but de rationaliser l'ingénierie de la région Fc des anticorps et ainsi améliorer leur activité *in vivo*, de nombreuses études tentent de comprendre les effets liés à l'interaction des anticorps avec les récepteurs (Hogarth & Pietersz, 2012). Les réponses biologiques induites par ces récepteurs via l'interaction avec la région Fc de l'anticorps sont vastes, puissantes et complexes avec des effets à la fois activateurs et inhibiteurs, permettant ainsi la modulation des réponses immunitaires (Hogarth & Pietersz, 2012). Ces récepteurs ont un rôle central dans le système immunitaire puisqu'ils sont responsables de l'induction de l'ADCC, de la CDC et de la phagocytose. D'autres récepteurs sont responsables de l'augmentation de la demi-vie des anticorps, de leur transport dans la circulation ou à travers le placenta et de leur élimination (Hanson & Barb, 2015; Vidarsson et al., 2014). Les récepteurs de la région Fc peuvent être classés en deux types.

Les récepteurs Fc de type I comprennent les récepteurs Fc γ (I, II_{a/b/c} et III_{a/b}), spécifiques de l'immunoglobuline G ainsi que les récepteurs Fc α RI et Fc ϵ RI, spécifiques des immunoglobulines A et E, respectivement. Le type II comprend les lectines de type C telles que le sialo-récepteur DC-SIGN (Hayes, Cosgrave, et al., 2014; Nimmerjahn et al., 2015). Ce dernier est présent sur les macrophages et les cellules dendritiques et sa possible interaction avec les anticorps sialylés expliquerait ses propriétés anti-inflammatoires lors de traitement d'immunoglobulines par intraveineuse (IVIg) (Garcia-Vallejo & van Kooyk, 2013; Hanson & Barb, 2015; Vidarsson et al., 2014).

Il existe également d'autres récepteurs ou protéines interagissant avec la région Fc mais non classés dans les deux types précédents. Le récepteur Fc néonatal (FcRn) possède une structure similaire au complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH-1). Ce récepteur est responsable du recyclage des anticorps, de leur demi-vie plus élevée ainsi que du transport à travers le placenta (Hayes, Cosgrave, et al., 2014; Vidarsson et al., 2014). Le TRIM21 est un senseur immunologique ciblant les virus et les bactéries opsonisés par les IgG, pour une neutralisation intracellulaire par le protéasome dépendant de l'ubiquitine (Mallery et al., 2010; Vidarsson et al., 2014). Finalement, la région Fc se lie à des protéines (protéines A et G) présentes dans les parois de certaines bactéries et dont les propriétés sont utilisées en chromatographie d'affinité pour la purification des anticorps monoclonaux (Grodzki & Berenstein, 2010).

Les sites d'interaction de ces protéines avec la région Fc peuvent se situer soit dans la partie du domaine C_{H2} proche de la région charnière soit à l'interface des domaines C_{H2} et C_{H3} (Figure 2-8A). Étant donné le rôle prédominant des FcγR dans ces travaux, une attention particulière sera portée à ce type de récepteurs Fc dans la suite de cette revue.

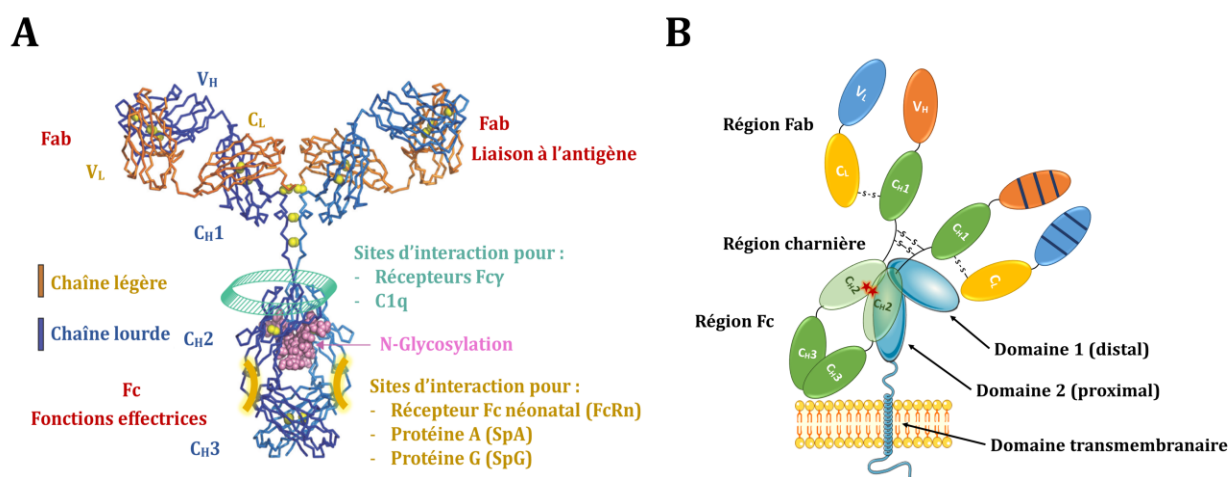


Figure 2-8 : Localisation des sites d'interaction sur la région Fc de l'anticorps (A) et interaction entre les deux domaines C_{H2} de l'immunoglobuline G avec le domaine immunoglobulinique proximal et la partie charnière du récepteur FcγRIIIa (B). Figure adaptée de (Jefferis, 2010; Lejeune et al., 2010).

2.1.3.2 Les récepteurs Fcγ

Les récepteurs Fcγ sont des glycoprotéines faisant partie de la superfamille des immunoglobulines (Lejeune et al., 2010). Ces récepteurs sont présents sur la presque totalité des cellules immunitaires excepté les lymphocytes T matures (Nimmerjahn et al., 2015). Les caractéristiques des FcγR sont résumées dans le Tableau 2-4. Ces récepteurs peuvent être classés fonctionnellement en deux classes : les FcγR activateurs ou inhibiteurs. Les FcγR activateurs (FcγRI, FcγRIIa/c et FcγRIIIa) déclenchent l'activation des cellules grâce aux voies de signalisation dépendantes du motif d'activation des récepteurs immuns basé sur la tyrosine (ITAM). Au contraire, l'unique récepteur inhibiteur FcγRIIb recrute les voies de signalisation inhibitrices via le motif d'inhibition des récepteurs immuns basé sur la tyrosine (ITIM) présent sur son domaine cytoplasmique (Tableau 2-4). Lors de conditions d'équilibre, la réponse est inhibée, permettant d'éviter une activation non spécifique du système immunitaire (Nimmerjahn & Ravetch, 2007).

Les FcγR présentent également des différences au niveau de leur affinité pour les différents isotypes d'IgG (Tableau 2-5) (Bruhns et al., 2009). Le FcγRI est considéré comme un récepteur de forte affinité tandis que les autres récepteurs sont de faible affinité. Diverses approches cellulaires et structurales ont montré que la partie inférieure de la région charnière et les parties supérieures des domaines C_{H2} contenaient le site de liaison des FcγR (Cohen-Solal et al., 2004; Hanson & Barb, 2015). Cette région de l'anticorps interagirait avec le domaine extracellulaire proximal et la région située entre les deux domaines du FcγR (Figure 2-8B) (Lejeune et al., 2010; Sondermann, Kaiser, & Jacob, 2001). Il existerait une différence entre le FcγRI et les autres FcγR. En effet, l'étude de la structure cristalline de l'interaction d'un complexe immunitaire avec le FcγRI montre une orientation unique des résidus de la partie inférieure de la région charnière, présentant une conformation linéaire par rapport à la conformation en coude des autres FcγR (Kiyoshi et al., 2015). Malgré la bivalence de la région Fc de l'anticorps et son potentiel de lier deux récepteurs, il a été démontré que la stœchiométrie des FcγR est de 1:1. Cela serait dû à un réarrangement de la partie inférieure de la région charnière suite à la liaison avec un récepteur, empêchant par la suite la liaison avec un second récepteur (Cohen-Solal et al., 2004).

Tableau 2-4 : Caractéristiques des récepteurs Fcγ. Tableau adapté de (Cohen-Solal et al., 2004; Hayes, Cosgrave, et al., 2014; Lejeune et al., 2010; Maenaka, van der Merwe, Stuart, Jones, & Sonderrmann, 2001; Powell & Hogarth, 2008; Radaev & Sun, 2002; Ravetch & Clynes, 1998; van der Poel, Spaapen, de Winkel, & Leusen, 2011).

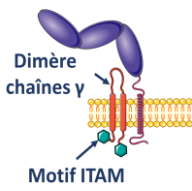
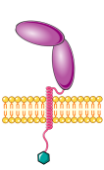
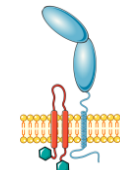
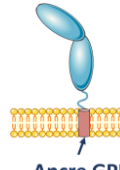
Récepteur	FcγRI		FcγRII		FcγRIII	
	CD64	CD32a	CD32b	CD32c	CD16a	CD16b
Structure						
Polymorphisme	-	R131H	I232T	Q57X	V158F 48 L / R / H	NA1/NA2/SH
Motif de signalisation	Activateur (ITAM) Dimère de chaînes γ	Activateur (ITAM)	Inhibiteur (ITIM)	Activateur (ITAM)	Activateur (ITAM) Dimère de chaînes γ	Ancrage GPI
Affinité IgG monomérique	Forte (10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁹ M)		Faible (10 ⁻⁶ M)		Faible (10 ⁻⁶ - 10 ⁻⁷ M)	
Poids moléculaire (kDa)	42.6 <i>sans les glycosylations</i>	40	34	25.9-35.5 <i>4 isoformes</i>	40	50-80
Nombre d'acides aminés	374	317	310	254-323 <i>4 isoformes</i>	254	233
Sites de N-glycosylation	7	2	3	3	5	6
Expression	Macrophages Monocytes Dendritiques Éosinophiles Neutrophiles	Macrophages Monocytes Dendritiques Éosinophiles Neutrophiles Mastocytes Plaquettes	Macrophages Monocytes Dendritiques Éosinophiles Neutrophiles Mastocytes Lymphocytes B	NK	Macrophages Monocytes Dendritiques NK Mastocytes Lymphocytes T	Macrophages Éosinophiles Neutrophiles
Fonctions associées	Phagocytose Endocytose ADCC Relargage de cytokines	Phagocytose Endocytose ADCC Relargage de cytokines	Blocage de l'activation des lymphocytes B	-	Phagocytose Endocytose ADCC Relargage de cytokines	-

Tableau 2-5 : Affinité des récepteurs de la région Fc pour les différents isotypes d'anticorps.

Tableau adapté de (Bruhns et al., 2009; Lejeune et al., 2010; Vidarsson et al., 2014).

	FcγRI	FcγRII			FcγRIII		FcRn
	CD64	CD32a _{H131}	CD32a _{R131}	CD32b/c	CD16a _{V158}	CD16a _{F158}	CD16b
IgG1	++++	++	++	+	+++	++	+++
IgG2	-	++	+	-	+	-	-
IgG3	++++	++++	++++	++	++++	++++	++++
IgG4	++	++	++	+	++	-	-

Le FcγRI est capable de fixer les IgG monomériques avec la même affinité que lorsqu'il lie des complexes immuns (Nimmerjahn & Ravetch, 2007). L'affinité des autres FcγR est trop faible pour lier les anticorps monomériques et un récepteur ne peut interagir qu'avec une seule IgG. Ils peuvent cependant fixer les anticorps engagés dans des complexes immuns avec une forte avidité (Daëron, 2014; Lejeune et al., 2010). En effet, les cellules immunitaires peuvent interagir avec les complexes immuns car les anticorps sont concentrés sur des antigènes multivalents et cette concentration locale élevée de région Fc se lie à de nombreux récepteurs Fc présents sur la membrane des cellules (Daëron, 2014). Cette concentration dépend principalement de la densité des épitopes présents sur l'antigène et reconnaissables par les anticorps. Pour les récepteurs de faible affinité, l'interaction avec des complexes immuns permet l'agrégation des récepteurs sur la membrane, un prérequis pour le déclenchement d'une réponse cellulaire (Cohen-Solal et al., 2004; Lejeune et al., 2010). L'agrégation permet ensuite la migration des récepteurs dans les radeaux lipidiques, étape indispensable pour la transduction du signal (Bournazos, Hart, Chamberlain, Glennie, & Dransfield, 2009; Lejeune et al., 2010). En effet, l'agrégation dans les radeaux lipidiques active une cascade de signalisation via la famille des tyrosine kinases de la famille Src (lck, lyn, hck) et Syk (Syk, ZAP-70, etc.) (Hogarth & Pietersz, 2012; Lejeune et al., 2010). Le type de réponse cellulaire, activatrice ou inhibitrice, dépend respectivement du motif ITAM ou ITIM. La co-agrégation de FcγRIIb avec les autres récepteurs activateurs permet d'inhiber les signaux activateurs (Hogarth & Pietersz, 2012). Ainsi, l'activation des cellules nécessitent le dépassement

d'un seuil de récepteurs activateurs agrégés (Nimmerjahn et al., 2015). Concernant les récepteurs possédant un motif ITAM (activateur), les kinases vont catalyser la phosphorylation et l'activation de différents substrats tels que la phospholipase C (PLC), la PI3-kinase et des protéines de la famille des MAP-kinases (Nimmerjahn & Ravetch, 2008; Ravetch & Bolland, 2001; Sanchez-Mejorada & Rosales, 1998).

Selon les récepteurs, le type de cellule ou encore la fonction cellulaire, le substrat engagé dans la signalisation sera différent (Sanchez-Mejorada & Rosales, 1998). De plus, la transduction du signal mènera à des réponses cellulaires différentes selon le motif ITAM engagé (Van den Herik-Oudijk, Ter Bekke, Tempelman, Capel, & Van de Winkel, 1995). En effet, les FcγRI et FcγRIIIa ne possèdent pas de motif ITAM dans leur domaine cytoplasmique mais forment indépendamment des complexes avec plusieurs sous-unités à travers leur association non covalente avec le dimère de chaînes γ. En effet, dans sa queue intracellulaire, celui-ci possède un motif ITAM sur chacune des chaînes du dimère (Tableau 2-4) (Hogarth & Pietersz, 2012).

La transduction du signal activateur à travers la cellule effectrice permet d'induire quatre mécanismes majoritaires, dépendamment des types de cellule immunitaire et de récepteur engagés (Figure 2-4 et Tableau 2-4). L'engagement des macrophages et des neutrophiles permet d'induire la phagocytose, à la suite de l'opsonisation de pathogènes ou débris cellulaires. Suite à la reconnaissance, les phagocytes émettent des pseudopodes autour des complexes immuns pour former un phagosome. Ce dernier, une fois dans la cellule, fusionnera avec des lysosomes contenant des enzymes hydrolytiques pour former un phagolysosome (Indik, Park, Hunter, & Schreiber, 1995). L'ADCC est une seconde voie possible, retrouvée le plus souvent dans le cadre d'une action anti-tumorale. Cette voie est principalement activée via les FcγRIIIa présents sur les cellules NK. Suite à la liaison avec la cellule cible, des granules présents dans le cytoplasme de la cellule NK sont transportés vers la membrane plasmique et relâchés dans l'espace situé entre la cellule NK et la cellule cancéreuse. Une première molécule (perforine) crée des pores dans la membrane plasmique afin de permettre l'entrée dans la cellule cible d'une seconde molécule (granzyme B) qui active la cascade des caspases et entraîne l'apoptose de la cellule cible (Chowdhury & Lieberman, 2008). La présentation antigénique est une troisième voie principalement permise par les cellules présentatrices de l'antigène comme les cellules dendritiques. Cette dernière, après avoir endocyté l'antigène via les FcγR, le dégrade et le présente sous forme de peptide via le CMH (Fanger, Wardwell, Shen, Tedder, & Guyre, 1996). Enfin, un

dernier mécanisme permet la sécrétion de facteurs solubles comme des cytokines ou des substances vasoactives qui vont jouer le rôle de modulateur de la réponse immunitaire ou participer à l'ADCC (te Velde, de Waal Malefijt, Huijbens, De Vries, & Figdor, 1992).

L'implication des Fc γ R dans la régulation d'une multitude de réponses immunitaires les place au cœur du développement de nouvelles approches immunothérapeutiques (Nimmerjahn & Ravetch, 2008). Ainsi, depuis une vingtaine d'années, la potentialisation de l'interaction des anticorps avec les Fc γ R est au centre du développement de nouveaux anticorps thérapeutiques (Lejeune et al., 2010). Notons que l'ingénierie de la région Fc et plus particulièrement des sites d'interaction des divers récepteurs de la région Fc a permis de générer des anticorps thérapeutiques avec des propriétés biologiques et biophysiques supérieures (Sondermann & Szymkowski, 2016).

2.1.3.3 Récepteur Fc néonatal et C1q

Le récepteur Fc néonatal (FcRn) et le composé du complément C1q sont également deux protéines importantes pour les propriétés des anticorps thérapeutiques (FcRn) et pour l'induction de fonctions effectrices (C1q).

Le FcRn se retrouve dans de nombreux tissus et organes tels que l'endothélium vasculaire et les cellules présentatrices de l'antigène (monocytes, cellules dendritiques et macrophages) (Hayes, Cosgrave, et al., 2014). Il a été nommé ainsi suite à la découverte de son rôle dans le transport des IgG à travers le placenta, permettant le transfert de l'immunité humorale de la mère à l'enfant (Hanson & Barb, 2015). Ce récepteur ne possède pas de fonction de signalisation (Hanson & Barb, 2015). L'interaction du FcRn avec les IgG est dépendante du pH. En effet, seul le pH acide (pH < 6.5) des vacuoles endocytaires permet la protonation des résidus histidine de l'IgG, nécessaire à l'interaction FcRn / IgG. Ceci explique que le site d'interaction se situe au niveau de l'interface des domaines C_H2-C_H3, où les résidus histidine sont nombreux (Figure 2-8A) (Vidarsson et al., 2014). Cette interaction dépendante du pH permet au FcRn de lier les anticorps dans les vacuoles endocytaires, évitant ainsi leur dégradation, et de les relâcher à la surface de la cellule où le pH est égal à 7.4. Ce recyclage permet d'augmenter la demi-vie des IgG dans le sérum. Le FcRn permet également de lier les complexes immuns puis de les transporter dans les lysosomes dans les cellules dendritiques pour la présentation des antigènes (Hayes, Cosgrave, et al., 2014).

Le composé du complément C1q peut se lier aux IgG et aux IgM. Le site de liaison du C1q avec la région Fc est similaire aux Fc γ R et se situe dans la région inférieure de la région charnière

(Figure 2-8A) (Jefferis, 2010). L'interaction IgG / C1q permet l'activation de la voie classique du complément. L'activation du complément permet l'opsonisation supplémentaire de l'antigène cible par le composé C3b puis à la formation du complexe d'attaque C5-C9 responsable de la destruction de la membrane bilipidique de la cellule cible (Vidarsson et al., 2014).

2.2 La N-glycosylation des IgG et des récepteurs Fcγ

2.2.1 Généralités

De nombreuses protéines subissent diverses modifications covalentes au cours ou après leur synthèse ribosomale, donnant respectivement lieu au concept de modifications co- et post-traductionnelles (Walsh, 2009). Les modifications post-traductionnelles (MPT) peuvent présenter des différences au niveau de leur taux d'apparition, leur réversibilité et leur introduction sur des protéines via des voies enzymatiques ou non enzymatiques (Walsh, 2009). Les MPT les plus caractéristiques des protéines thérapeutiques incluent la glycosylation, les procédés protéolytiques et la formation de ponts disulfures. Ces MPT ont une profonde influence sur la structure et les fonctions des protéines et sont essentielles pour l'activité biologique de nombreux produits biopharmaceutiques. De plus, elles possèdent un impact sur la stabilité, l'activité et les propriétés pharmacocinétiques des protéines thérapeutiques (Walsh, 2009).

La glycosylation est la modification post-traductionnelle la plus commune et la plus complexe (Struwe et al., 2010). En effet, la cellule dédie 1 à 2 % de son génome pour la machinerie de la glycosylation (Walsh & Jefferis, 2006). Lors de la glycosylation, un ou plusieurs groupes de glycanes sont attachés aux protéines ou aux lipides de façon covalente pour former des biomolécules complexes appelées respectivement glycoprotéines et glycolipides (Struwe et al., 2010). Ainsi, environ 50 % des protéines humaines sont glycosylées et plus d'un tiers des biopharmaceutiques approuvés sont des glycoprotéines (Walsh & Jefferis, 2006). Le glycanes peut être un monosaccharide simple ou être composé de plusieurs monosaccharides liés ensemble de façon linéaire ou branchée. Le glycanes peut être attaché soit à une asparagine (Asn) sur un atome d'azote (N-glycosylation) soit à une sérine (Ser) ou à une thréonine (Thr) sur un atome d'oxygène (O-glycosylation) (Struwe et al., 2010).

Pour la N-glycosylation, la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr, avec X pouvant être n'importe quel acide aminé sauf la proline, est essentielle pour permettre la glycosylation (Walsh & Jefferis, 2006). L'O-glycosylation est plus difficile à prédire étant donné le manque de reconnaissance d'une séquence consensus (Hossler, Khattak, & Li, 2009; Schwarz & Aeby, 2011). La construction des N- et O-glycanes est permise par environ 17 monosaccharides et les liaisons et les branchements de ces résidus augmentent la complexité des oligosaccharides (Struwe et al., 2010). Les N-glycosylations peuvent être catégorisées en différentes structures présentées dans la Figure 2-9A : oligomannosidique, hybride et complexe. Dans le cas de l'O-glycosylation, cette dernière est défini par la biosynthèse de 8 structures centrales, rajoutant une complexité supplémentaire (Figure 2-9B) (Struwe et al., 2010).

Les glycoprotéines peuvent contenir un ou plusieurs sites de N- ou O-glycosylation (Brooks, 2009). Chacun de ces sites peut être occupé ou non, menant à une variation d'une molécule à l'autre au sein d'une glycoprotéine spécifique appelée macrohétérogénéité. De plus, la variation de la structure des N-glycanes, apparaissant au cours des réactions enzymatiques à travers le RE et l'appareil de Golgi, mènent à une microhétérogénéité (Spearman et al., 2011). Ainsi, les glycoprotéines apparaissent comme un mélange de variants de glycosylation appelés glycoformes (Brooks, 2009). Cette complexité et variabilité structurelles des N- et O-glycanes fournissent un haut degré de variabilité à la protéine et permettent la modulation de ses fonctions et/ou sa structure (Struwe et al., 2010).

La gamme des glycoformes d'une glycoprotéine est spécifique de l'espèce ou du tissu et peut présenter des différences selon les conditions physiologiques (Brooks, 2009). D'ailleurs, pour la production des protéines recombinantes, le choix de la lignée cellulaire est assujéti aux MPT. Ainsi, la production des AcM thérapeutiques dans les cellules CHO ou toutes autres cellules de mammifères est principalement dictée par l'habilité de ces dernières à entreprendre des MPT appropriées (Butler & Spearman, 2014; Walsh, 2009).

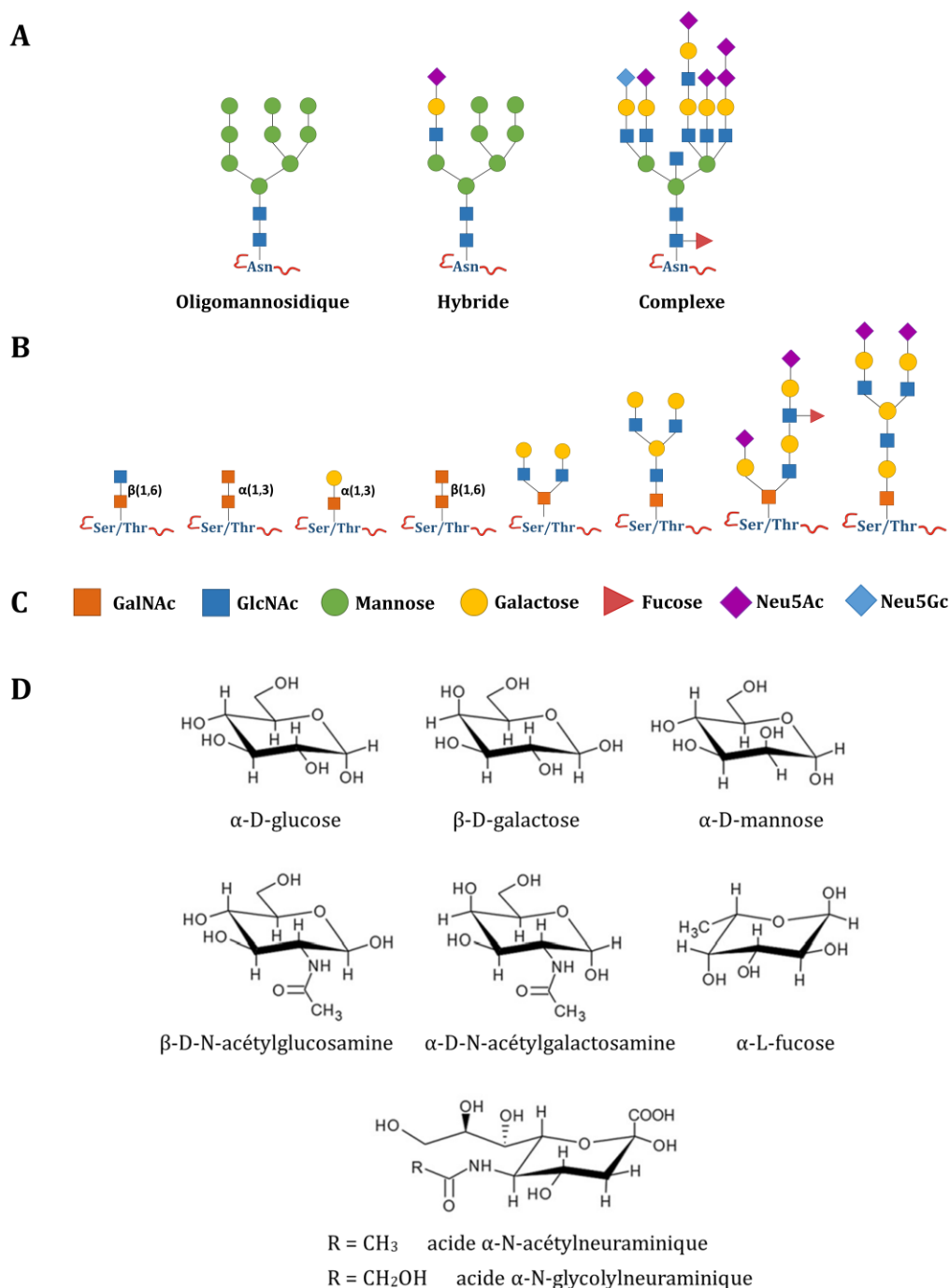


Figure 2-9 : Représentation des trois structures de la N-glycosylation (A) et des huit structures de la O-glycosylation (B) avec la notation symbolique des sucres communément observée dans les N- et O-glycosylations (C), selon le système de nomenclature des symboles pour les glycanes (Varki et al., 2015), et leur conformation en chaise (D). GalNAc : N-acétylgalactosamine; GlcNAc : N-acétylglucosamine; Neu5Ac : acide N-acétylneuraminique; Neu5Gc : acide N-glycolylneuraminique. Figure adaptée de (Hossler et al., 2009).

Les effets de la glycosylation des glycoprotéines sont très variés (Tableau 2-6) (Walsh & Jefferis, 2006). Parmi ceux-ci, le rôle des glycanes comme ligands pour les lectines, protéines se liant spécifiquement et de façon réversible à certains glycanes, est sûrement le mieux exploré des aspects fonctionnels des oligosaccharides dans les systèmes cellulaires (Ambrosi, Cameron, & Davis, 2005; Struwe et al., 2010). Les impacts de la N-glycosylation sur l'IgG sont détaillés dans la partie 2.4.2.

L'importance de la glycosylation explique qu'un simple changement au niveau de sa composition soit associé à des pathologies. En effet, des glycosylations aberrantes ont été identifiées dans des maladies telles que l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, la tuberculose ainsi que pour la progression métastatique du cancer (Brooks, 2009). Étant donné que la N-glycosylation est la seule MPT d'intérêt dans le cadre de ces travaux, la suite de la revue se concentrera uniquement sur le mécanisme de biosynthèse de la N-glycosylation dans les cellules de mammifères et son influence sur les AcM thérapeutiques.

Tableau 2-6 : Les rôles et les effets de la glycosylation des glycoprotéines. Tableau adapté de (Struwe et al., 2010; Walsh, 2009; Walsh & Jefferis, 2006).

Rôle / Effet	Détails
Repliement de la protéine	La glycosylation peut affecter la structure secondaire de la protéine et aider au repliement de la chaîne polypeptidique.
Ciblage / Trafic de la protéine	La glycosylation peut participer au tri et à l'orientation de la protéine vers sa destination finale.
Reconnaissance / Liaison à un ligand	La N-glycosylation de l'anticorps permet l'interaction avec les récepteurs Fc et le composé du complément C1q.
Activité biologique	La chaîne de sucre des gonadotrophines est essentielle pour l'activation de la transduction du signal.
Stabilité	La chaîne de sucre peut stabiliser la glycoprotéine de plusieurs manières : augmenter sa solubilité, protéger les zones hydrophobes à sa surface contre les protéases et diriger la participation des interactions stabilisant les intra-chaînes.
Régulation de la demi-vie	Une quantité importante d'acide sialique peut augmenter la demi-vie de la glycoprotéine dans le plasma. La structure oligomannosidique de la N-glycosylation des levures mène à une suppression rapide de la glycoprotéine de la circulation par les récepteurs au mannose.
Immunogénicité	Les motifs de glycosylation des glycoprotéines provenant de plantes (contenant du fucose et du xylose) sont hautement immunogènes chez les mammifères.

2.2.2 Mécanisme de la N-glycosylation

La voie de biosynthèse de la N-glycosylation ne suit pas un modèle prédéfini et repose sur la transcription et la traduction d'enzymes de glycosylation localisées dans toute la cellule. Cette voie de biosynthèse peut être divisée en 4 grandes étapes : (i) formation d'un précurseur oligosaccharidique lié à un lipide dans la partie cytoplasmique puis dans la lumière du RE; (ii) transfert en bloc du précurseur oligosaccharidique sur le polypeptide naissant dans la lumière du RE, facilité par une oligosaccharyltransférase; (iii) étapes de contrôle qualité réalisées par les chaperonnes calnexine et calréticuline ainsi que les glycosidases glucosidase I, glucosidase II et $\alpha(1,2)$ -mannosidase. Les résidus glucose sur la structure oligomannosidique interagissent avec les chaperonnes et sont nécessaires pour le bon repliement de la glycoprotéine; (iv) transformation du glycane dans le Golgi-médian et Golgi-trans par l'ajout de nouveaux monosaccharides sur le glycane tronqué (Struwe et al., 2010).

Plus précisément, la biosynthèse de la N-glycosylation est initiée du côté cytosolique du réticulum endoplasmique, où le dolichol diphosphate agit comme un « socle » pour l'ajout de monosaccharides jusqu'à la forme Man5GlcNAc2 (Figure 2-10 – étapes 1 à 7). Cette chaîne oligosaccharidique est ensuite transloquée dans la lumière du RE à l'aide d'une flippase puis des monosaccharides supplémentaires sont ajoutés jusqu'à la structure Glc3Man9GlcNAc2 (Figure 2-10 – étapes 8 à 15). Celle-ci est finalement transférée du dolichol pyrophosphate à la chaîne polypeptidique croissante sur le ribosome (Figure 2-10 – étape 16) (Aebi, 2013).

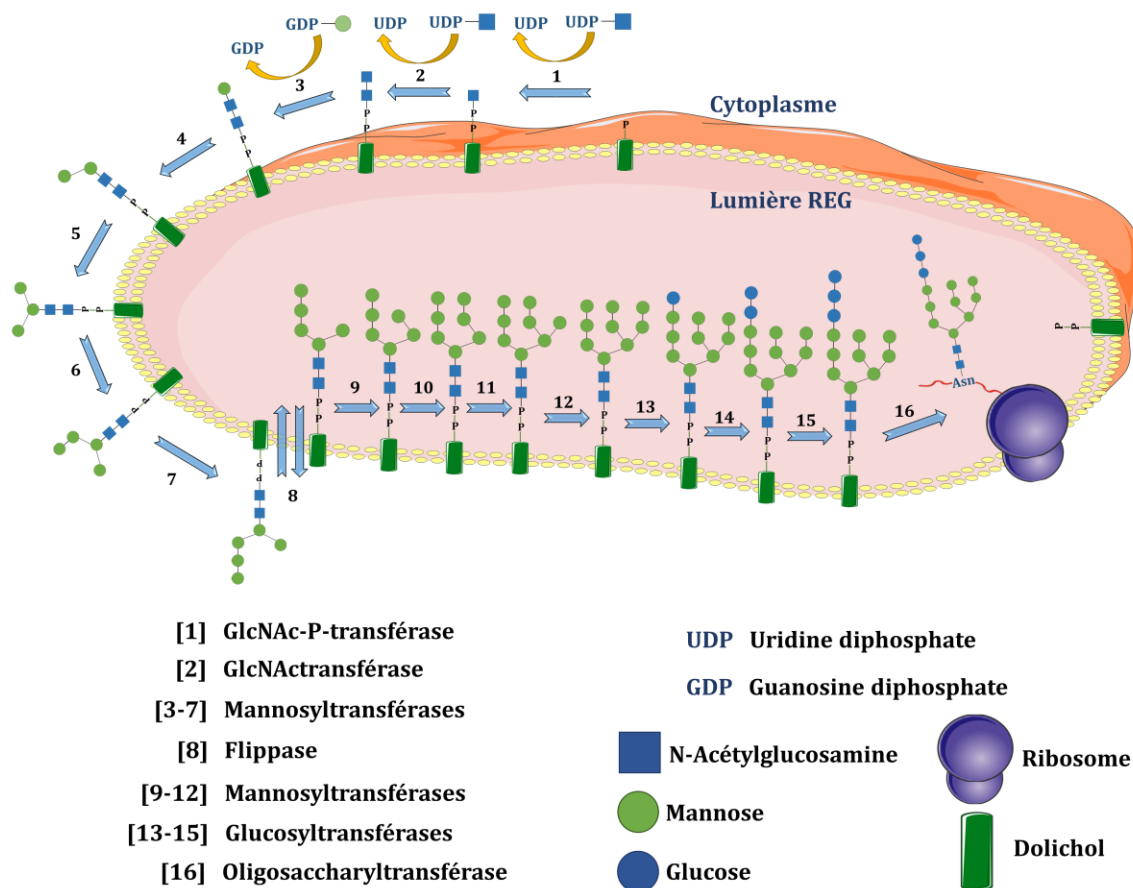


Figure 2-10 : Représentation schématique du cycle dolichol. Figure adaptée de (Kornfeld & Kornfeld, 1985).

La calnexine et la calréticuline ainsi que des glycosidases réalisent alors un contrôle qualité pour le bon repliement de la glycoprotéine naïve (Figure 2-11 – étapes 1 à 4) juste avant sa migration vers le Golgi-*cis* où des transformations supplémentaires du glycane sont réalisées (Figure 2-11 – étape 5) (Roth et al., 2010). La réduction des résidus mannose puis l'addition d'un résidu GlcNAc sur le bras $\alpha(1,3)$ -mannose signalent la migration vers le Golgi-*médian* (Figure 2-11 – étape 6). Dans ce dernier, un assemblage additionnel de monosaccharides est effectué, incluant le remplacement des résidus $\alpha(1,3)$ - et $\alpha(1,6)$ -mannose du bras $\alpha(1,6)$ par un résidu GlcNAc et l'addition d'un résidu $\alpha(1,6)$ -fucose central (Figure 2-11 – étapes 7 à 9). Le processus de biosynthèse de la N-glycosylation est complété par le transfert de la glycoprotéine vers la partie Golgi-*trans*, où des additions aléatoires de résidus de galactose et d'acide sialique sont réalisées (Figure 2-11 – étapes 10 et 11). Les glycoprotéines sont finalement dirigées spécifiquement vers une localisation intra- ou extracellulaire (Stanley, 2011).

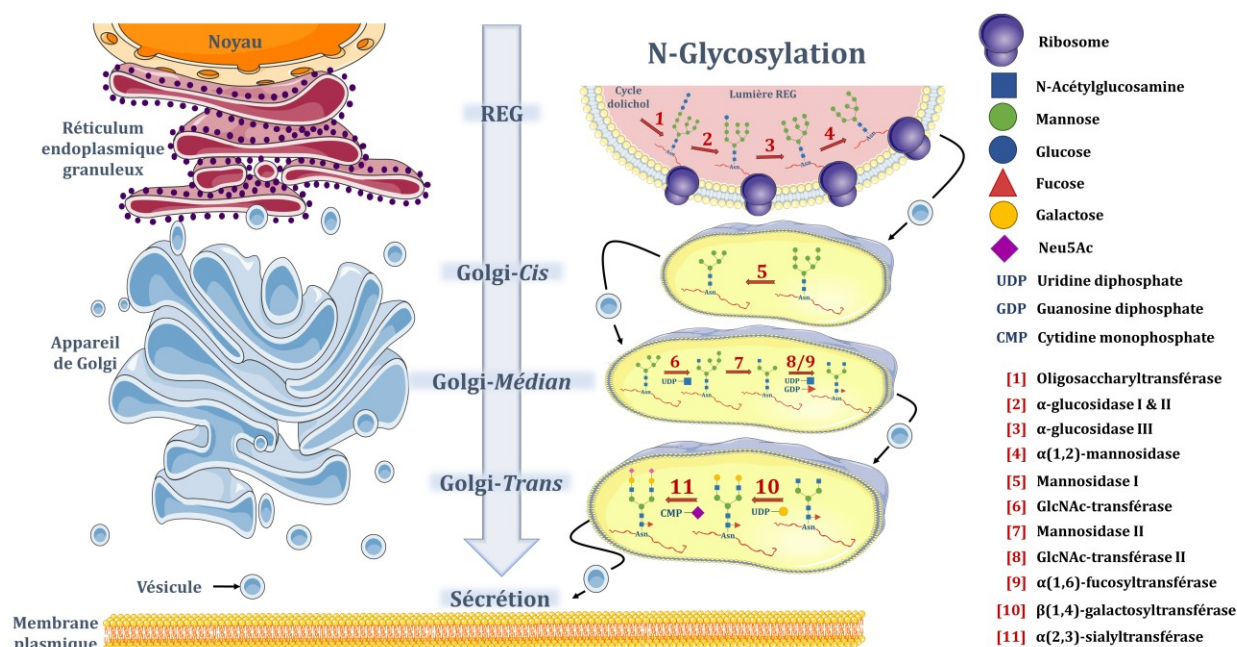


Figure 2-11 : Représentation schématique du mécanisme de la N-glycosylation dans une cellule de mammifère. Figure adaptée de (Hossler et al., 2009; Kornfeld & Kornfeld, 1985).

Les étapes de la N-glycosylation dans l'appareil de Golgi sont responsables de la diversité structurale hautement complexe des N-glycanes trouvés chez les mammifères et les autres espèces. La biosynthèse du glycanes dépend de nombreux facteurs tels que le taux de transport des glycopeptides du RE au Golgi, le métabolisme des monosaccharides-nucléotides, le temps de résidence des glycopeptides dans le golgi et la localisation des glycosyltransférases dans le Golgi (Struwe et al., 2010).

2.2.3 La N-glycosylation des récepteurs Fc γ

Cela fait plus d'une trentaine d'année que la N-glycosylation des Fc γ R est étudiée. Cependant, les études des effets de la N-glycosylation sur l'interaction IgG / Fc γ R se sont majoritairement concentrées sur l'impact de la N-glycosylation de la région Fc des IgG. En effet, de nombreuses recherches ont porté sur la manipulation de la N-glycosylation des IgG afin d'augmenter leur activité biologique. Dans ces études, les Fc γ R n'avaient pour rôle que de documenter la sureté et l'efficacité des anticorps monoclonaux.

Comme expliqué précédemment, les Fc γ R ont des fonctions distinctes mais des structures similaires. Chaque récepteur possède des sites de N-glycosylation (Figure 2-12). Ces dernières

années, la complexité et l'impact de la glycosylation des FcγR dans l'interaction avec les IgG et l'activité biologique associée ont été mis sur le devant de la scène grâce à d'importantes découvertes (Ferrara et al., 2011; Hayes, Cosgrave, et al., 2014; Patel, K. R., Roberts, Subedi, & Barb, 2018; Subedi & Barb, 2018). L'influence de la N-glycosylation des FcγR est abordée dans la partie 2.4.3.

Le FcγRI dispose de sept sites potentiels de N-glycosylation (N59, N78, N152, N159, N163, N195 et N240) (Figure 2-12). Il s'agit du FcγR possédant le plus de N-glycosylation puisque la présence du domaine D3 ajoute deux sites supplémentaires. D'ailleurs, le domaine D3 a longtemps été considéré comme responsable de la haute affinité du FcγRI pour l'IgG (Hulett & Hogarth, 1998). Cependant, plusieurs études récentes proposent des mécanismes différents. D'un côté, Lu et collègues suggèrent que l'IgG et le FcγRI interagissent avec une haute affinité grâce à la boucle FG au sein du domaine D2 du FcγRI et un résidu proximal de la N-glycosylation de la région Fc de l'IgG (Lu et al., 2015; Lu, Ellsworth, Hamacher, Oak, & Sun, 2011). De l'autre, deux études montrent que l'interface du complexe FcγRI-Fc ne contient pas de carbohydrate et que la forte affinité de ce complexe est liée à une poche hydrophobe unique à la surface du FcγRI où le résidu Leu235 du Fc s'insère (Kiyoshi et al., 2015; Oganessian et al., 2015). Selon Oganessian et collègues, les glycanes de l'IgG auraient un rôle indirect important dans l'interaction en maintenant une conformation du Fc ou une distance entre les C_H2 favorable pour l'engagement du FcγRI (Oganessian et al., 2015). La structure cristalline du domaine extracellulaire du FcγRI montre que six des sites potentiels, incluant les résidus asparagine 59, 78, 152, 159, 163 et 195, possèdent une N-glycosylation, soit environ 30 % du poids moléculaire du FcγRI (Lu et al., 2011).

Le FcγRIIa possède deux sites de N-glycosylation (N97 et N178) n'ayant aucun effet sur la liaison avec l'IgG. Lorsque le FcγRIIa est exprimé dans les CHO, les glycosylations présentent une microhétérogénéité avec la présence de sialylation sur les deux sites tandis que l'expression du même récepteur dans des cellules d'insecte infectées avec le baculovirus mène principalement à des structures Man₃ (Powell et al., 1999).

Le FcγRIIb possède trois sites de N-glycosylation (N106, N180 et N187) mais comme pour les autres FcγR, très peu d'informations existent concernant l'occupation des sites et la nature des oligosaccharides.

De nombreuses études et une vaste majorité des données concernent le FcγRIIIa. Celui-ci possède cinq sites de N-glycosylation potentiels (N38, N45, N74, N162 et N169). Seuls les N-glycanes aux positions N45 et N162 ont démontré une influence sur l'interaction IgG / FcγRIIIa (Figure 2-12) (voir partie 2.4.3). Enfin, le FcγRIIIb possède six sites potentiels (N38, N45, N64, N74, N162 et N169), menant à une forte variation de son poids moléculaire.

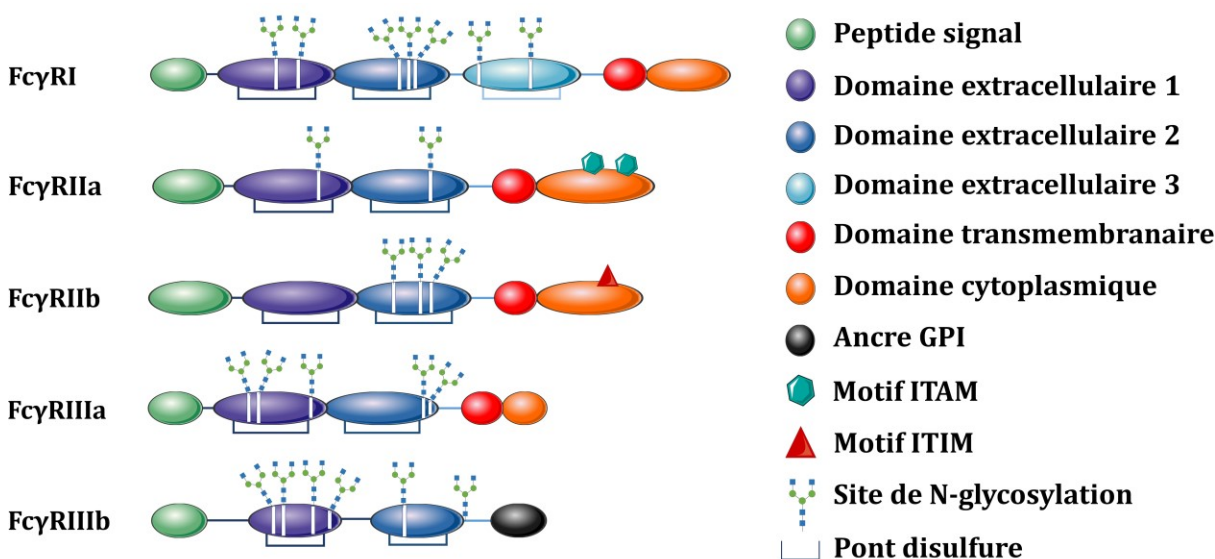


Figure 2-12 : Représentation de l'architecture des domaines des récepteurs Fcγ et de leurs sites de N-glycosylation. Figure adaptée de (Hayes, Cosgrave, et al., 2014).

Ces dernières années, plusieurs études ont analysé les profils de glycosylation de l'ensemble des FcγR produits dans diverses lignées cellulaires telles que CHO (Hayes et al., 2017; Zeck et al., 2011), HEK-293 (Hayes, Frostell, et al., 2014), NS0 (Cosgrave et al., 2013) et BHK (Kawasaki et al., 2014; Takahashi et al., 2002). Il a été observé une forte hétérogénéité ainsi qu'une spécificité des profils de glycosylations en fonction du type cellulaire. D'un côté, des épitopes glycaniques immunogéniques et spécifiques au type cellulaire ont été observés tels que l' α -Gal dans les cellules NS0 (Cosgrave et al., 2013; Hayes et al., 2017) ou le Neu5Gc et le LacdiNAc dans les cellules HEK-293 (Zeck et al., 2011). De l'autre, des variations au niveau des structures glycaniques ou du taux de sialylation ont été observées selon le type cellulaire. Par exemple, l'expression des FcγR dans les cellules NS0 mène à des glycosylations ayant des structures multi-antennaires complexes présentant un taux de fucosylation élevé (Cosgrave et al., 2013) tandis que l'expression dans les cellules CHO mène à ≈ 30 -40 structures glycaniques par récepteur avec des glycanes multi-

antennaires principalement complexes et faiblement sialylés (Hayes et al., 2017). Cette dernière étude a également démontré que les profils de glycosylation des récepteurs présentent des variations à la fois entre les récepteurs mais aussi entre deux lots du même récepteur (Hayes et al., 2017). Plus précisément, les glycanes du FcγRI présentent des structures oligomannosidiques ou complexes (bi- et tri-antennaire) abondantes tandis que le FcγRIIIa_{V158} possèdent majoritairement des glycanes avec des structures complexes (bi-, tri- et tétra-antennaires) peu sialylées.

La plupart des études ont analysé la glycosylation des récepteurs de façon globale, ne permettant donc pas de déterminer la présence de structures glycaniques spécifiques aux sites de glycosylation (Cosgrave et al., 2013; Hayes, Frostell, et al., 2014; Hayes et al., 2017; Takahashi et al., 2002). Néanmoins, quelques études ayant réussi à réaliser une étude par site de la glycosylation ont démontré des structures spécifiques à chaque site (Kawasaki et al., 2014; Zeck et al., 2011). C'est le cas d'une étude ayant analysé les N-glycanes du FcγRIIIa exprimé dans CHO ou HEK-293 et qui a démontré que, dans les deux cas, chaque site glycosylé présentait des types de glycosylation spécifiques tels que des structures multi-antennaires sialylées avec une fucosylation centrale (Zeck et al., 2011). Plus précisément, le glycanes à la position N45 présentait un taux élevé de structures hybrides suivi de structures complexes bi-antennaires. Au contraire, des structures complexes tétra-antennaires sialylées ont été retrouvées sur le glycanes à la position N74 (Zeck et al., 2011). Globalement, ces recherches ont permis de décrire de nombreuses caractéristiques telles que la spécificité de la glycosylation des FcγR pour le type de cellule, une variabilité selon les systèmes d'expression et entre les lots et une spécificité des glycanes selon le site de N-glycosylation offrant la capacité de moduler l'interaction avec l'IgG.

Une nuance doit être toutefois apportée à ces résultats puisqu'ils ont été obtenus à partir de récepteurs recombinants. En effet, comme expliqué précédemment, les FcγR recombinants possèdent des structures glycaniques spécifiques qui ne reflètent pas les glycanes naturels et leurs effets potentiels. Peu de recherches ont été entreprises sur les FcγR naturels liés aux membranes des cellules immunitaires étant donné la difficulté d'obtenir des quantités de récepteurs suffisantes pour l'analyse (Patel, K. R. et al., 2018). Cependant, deux études récentes ont réussi à analyser la N-glycosylation de FcγR naturels. D'un côté, Yagi et collègues ont réalisé une analyse par site de la N-glycosylation du FcγRIIIb soluble dans le sérum humain (Yagi et al., 2018). Cette étude a montré que parmi les six sites de N-glycosylation du FcγRIIIb, le glycanes à la position N45 est exclusivement occupé par des glycanes oligomannosidiques, à la différence des autres sites,

composés uniquement de glycanes complexes sialylés et fucosylés. Les glycoformes présents à chaque site ont ainsi montré une similarité entre les glycoprotéines natives et les glycoprotéines recombinantes (Kawasaki et al., 2014). D'un autre côté, Patel et collègues ont effectué l'analyse de la N-glycosylation des Fc γ RIIIa présents à la surface de cellules NK primaires humaines (Patel, K. R. et al., 2018). Leur étude a démontré la présence d'un taux élevé de glycanes avec des structures oligomannosidiques et hybrides sur les Fc γ RIIIa présents à la surface des cellules NK. Dans ce cas, les résultats diffèrent de ceux obtenus avec les Fc γ RIIIa recombinants qui ont montré une présence prédominante de glycanes avec des structures complexes (Cosgrave et al., 2013; Hayes, Frostell, et al., 2014; Hayes et al., 2017; Zeck et al., 2011).

2.2.4 La N-glycosylation des IgG

Les différents isotypes d'immunoglobuline présentent un nombre et des motifs de glycosylation très variés. Parmi ces isotypes, l'immunoglobuline G possède la glycosylation la plus simple avec une N-glycosylation conservée sur les résidus asparagine 297 (Asn-297) des domaines C_H2 des chaînes lourdes de la région Fc. Malgré leurs différences au niveau de la région Fc, des ponts disulfures et du type d'antigène reconnu, les 4 sous-classes d'IgG (1-4) présentent cette même N-glycosylation (Spearman et al., 2011; Vidarsson et al., 2014). Cependant, une importante microhétérogénéité existe au sein des oligosaccharides occupant ce site. En effet, jusqu'à 36 structures de glycoformes d'IgG ont été trouvées dans le sérum humain, avec seulement une poignée représentant la forme dominante (Hayes, Cosgrave, et al., 2014; Vidarsson et al., 2014).

La chaîne glycanique typique est une structure complexe bi-antennaire composée d'un heptasaccharide central comprenant des résidus de GlcNAc et de mannose avec deux bras liés en $\alpha(1,6)$ et $\alpha(1,3)$ (Figure 2-13A) (Hayes, Cosgrave, et al., 2014; Spearman et al., 2011; Vidarsson et al., 2014). Les N-glycanes de la région Fc possèdent également un niveau élevé de fucosylation centrale (liaison $\alpha(1,6)$ avec le GlcNAc primaire) et un nombre variable de galactose (Gal) ajouté à la structure centrale. Cette variabilité résulte en des glycoformes prévalent tels que G0F (aucun Gal), G1F (un Gal) et G2F (deux Gal) (Figure 2-13B) (Zauner et al., 2013). De nombreux rapports indiquent que le degré de galactosylation peut varier selon l'âge, le sexe, la grossesse ainsi que durant des maladies telles que des cancers, des maladies auto-immunes et infectieuses (Zauner et al., 2013). Une proportion mineure des glycanes peut contenir des résidus de GlcNAc bissecteur (attaché au mannose primaire) et/ou d'acide sialique (Neu5Ac ou Neu5Gc ajouté au galactose)

(Figure 2-13A) (Spearman et al., 2011; Zauner et al., 2013). La composition approximative des oligosaccharides des IgG-Fc humain polyclonaux est G0, 3 %; G1, 3 %; G2, 6 %; G0F, 23 %; G1F, 30 %; G2F, 24 %; G0BF, 3 %; G1BF, 4 %; G2BF, 7 %. De plus, des études par spectrométrie de masse indiquent la présence minoritaire de glycoformes oligomannosidiques et hybrides (Jefferis, 2012). Enfin, le glycoforme est préférablement défini selon la molécule d'IgG entière ([G0/G1F] ou [G1/G2BF]) puisque des études ont montré l'apparition d'appariements symétrique et asymétrique des glycosylations de la chaîne lourde (Jefferis, 2012).

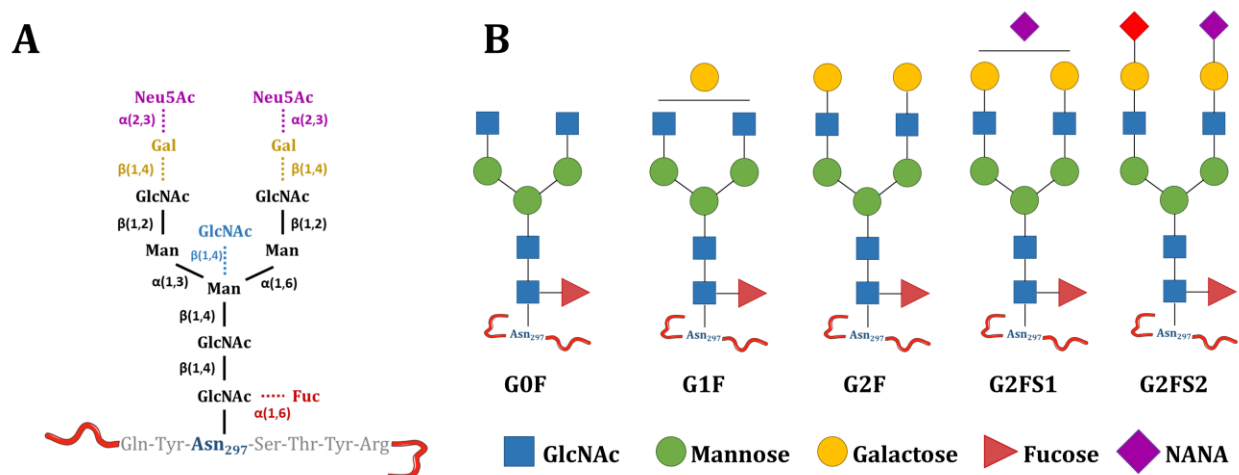


Figure 2-13 : (A) Représentation de la N-glycosylation de l'immunoglobuline G avec la structure centrale (noir) et les divers sucres pouvant être ajoutés de façon variable tels que le fucose (rouge), le galactose (jaune), l'acide α(2,3)-N-acétylneuraminique (pourpre) et le N-acétylglucosamine bissecteur (bleu) avec les types de liaison et (B) les oligosaccharides possibles. Figure adaptée de (Hayes, Cosgrave, et al., 2014; Hossler et al., 2009).

En plus de la N-glycosylation conservée de la région Fc, l'IgG humaine peut présenter une seconde glycosylation dans la région Fab sur les domaines variables des chaînes légères κ et λ ou de la chaîne lourde (V_H). Environ 20-30 % des IgG présentent au moins une N-glycosylation sur la région Fab, résultant majoritairement de mutations somatiques (Jefferis, 2007; Spearman et al., 2011). Parmi les AcM thérapeutiques approuvés, seul le Cetuximab possède une N-glycosylation dans la région Fab et plus particulièrement sur le résidu Asn-88 du domaine variable de la chaîne lourde (V_H) (Jefferis, 2007; Zhang, P. et al., 2016). À la différence des N-glycanes de la région Fc, les N-glycanes de la région Fab présentent des structures bi-antennaires avec des niveaux élevés

de bissection, de galactosylation et de sialylation, incluant des N-glycanes disialylés, rarement vus dans la région Fc. Cependant, les N-glycanes de la région Fab présentent un taux de fucosylation plus faible (~70 % par rapport à ~94 % pour la région Fc) (Hayes, Cosgrave, et al., 2014; Vidarsson et al., 2014). Ces différences s'expliquent par une plus grande accessibilité des glycosyltransférases et des glycosidases aux sites de glycosylation de la région Fab par rapport aux sites de glycosylation de la région Fc qui reposent plus profondément entre les deux chaînes lourdes (Vidarsson et al., 2014).

Les glycanes de la région Fc sont partiellement localisés dans la cavité située entre les deux chaînes lourdes, influençant à la fois la structure et la fonction des anticorps (Zauner et al., 2013). Ainsi des variations dans la structure de ces glycanes conduisent à des changements subtils dans la conformation de la région Fc, affectant de façon significative la liaison avec les FcγR et le composé du complément C1q (Jefferis, 2007; Zhang, P. et al., 2016). De par cette influence, il est devenu nécessaire de comprendre le rôle *in vivo* de la microhétérogénéité et de la macrohétérogénéité de la glycosylation afin de développer des AcM thérapeutiques efficaces au niveau clinique (Spearman et al., 2011). L'influence de la N-glycosylation des IgG est abordée dans la partie 2.4.2.

2.3 Modification de la N-glycosylation

Étant donné l'influence de la N-glycosylation sur les propriétés physiques et fonctionnelles des glycoprotéines thérapeutiques, celle-ci est considérée comme un attribut de qualité critique (CQA) pour une efficacité et une sûreté optimales (Butler & Spearman, 2014). La production routinière d'un produit avec des MPT appropriées et reproductibles est devenue une nécessité et l'une des principales préoccupations lors du développement des procédures de fabrication. De plus, avec l'échéance de plusieurs brevets d'AcM thérapeutiques, divers programmes ont été mis en place pour la production et la mise sur le marché de biosimilaires. Ces derniers n'étant pas produits à partir de la même lignée cellulaire ni avec les mêmes conditions de culture, des différences peuvent apparaître, notamment au niveau de la glycosylation, d'où la nécessité d'un contrôle sur la modification du glycane.

Par ailleurs, les anticorps existent généralement sous forme de mélanges de glycoformes hétérogènes qui sont difficiles à séparer en glycoformes purs. Plusieurs méthodes de glycoingénierie ont été développées afin de contrôler et optimiser la N-glycosylation, permettant

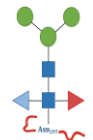
ainsi la production d'anticorps plus homogènes avec des N-glycanes définis et de ce fait une meilleure efficacité thérapeutique (Wang, Tong, Li, Giddens, & Li, 2019). Ces glycoformes plus homogènes ont été utilisés pour des études fonctionnelles et ces recherches ont permis de clarifier le lien entre la structure du glycane et son impact sur la fonction biologique de l'anticorps et donc de son efficacité thérapeutique (Spearman et al., 2011; Wang et al., 2019). L'augmentation de la compréhension des liens structure-fonction combinée à une modification plus efficace de la glycosylation par glycoingénierie ont ensuite facilité le développement de glycoprotéines de seconde génération avec des MPT modifiées et des fonctionnalités optimisées (Walsh, 2009).

Différentes approches existent afin d'altérer la glycosylation des IgG. Dans un premier temps, il est possible d'influencer la glycosylation par le choix de la lignée cellulaire et de certaines conditions de culture telles que le milieu et les conditions opératoires. Puis, différentes approches de glycoingénierie ont été développées afin de moduler le N-glycane via la manipulation des voies de biosynthèse ou par un remodelage *in vitro*. Cette manipulation peut s'exercer à différents temps du processus de production : (i) avant la production (modification des lignées cellulaires, du métabolisme et co-expression d'enzymes), (ii) pendant la production (molécules dans le milieu de culture) et (iii) après la production (remodelage *in vitro* avec des enzymes).

2.3.1 Influence des paramètres de culture

L'ingénierie du procédé est l'une des voies possibles pour le contrôle de la glycosylation. En effet, l'ensemble des paramètres opératoires de la production et de la purification ont une influence sur la N-glycosylation des glycoprotéines. Ainsi, la compréhension de l'influence de chaque paramètre permet la modulation de la N-glycosylation et la production du glycoforme souhaité. Parmi l'ensemble des conditions de culture, la lignée cellulaire est le paramètre le plus étudié et celui possédant le plus d'influence sur la N-glycosylation de la région Fc de l'IgG (Tableau 2-7).

Tableau 2-7 : Impact de la plateforme d'expression sur la N-glycosylation de la région Fc des IgG.

Plateforme d'expression	Exemple	Structure de la glycosylation	Caractéristiques	Avantages	Inconvénients	Perspectives	Références
Bactérie	<i>Escherichia coli</i>	-	Pas de glycosylation	Croissance rapide Connaissance complète du génome Peu coûteux et conditions de culture simples Plateforme parfaite pour les protéines non glycosylées	Pas de glycosylation Présence d'endotoxines Pas de sécrétion et formation de corps d'inclusion	Possibilité de O- et N-glycosylations chez certaines bactéries transférables dans <i>E. coli</i> (Langdon, Cuccui, & Wren, 2009) Possibilité de glycoingénierie de la bactérie pour exprimer des glycosylations de mammifère	(Jefferis, 2010; Kowarik & Feldman, 2009)
Levure	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Pichia pastoris</i>		Oligomannose seulement N-glycosylation très branchée et longue	Facile à cultiver Capable de sécréter Formation de ponts disulfures et de glycosylation Peu coûteux et conditions de culture simples	N-glycosylation de type oligomannose avec des propriétés pharmacocinétiques moins intéressantes Faible rendement	Possibilité de glycoingénierie pour la production de glycoformes homogènes sur l'IgG-Fc (Potgieter et al., 2009)	(De Pourcq, De Schutter, & Callewaert, 2010; Jefferis, 2010)
Insecte	Sf21 SfSWT-1		N-glycosylation très courte Fucose lié en $\alpha(1,3)$ et $\alpha(1,6)$	Système d'expression biosécuritaire Productivité élevée Formation de ponts disulfures et de glycosylation Possibilité de glycoingénierie	N-glycosylation différente des mammifères Résidus immunogéniques	Possibilité de glycoingénierie pour la production de glycoformes sialylés (Hill, Aumiller, Shi, & Jarvis, 2006)	(Geisler & Jarvis, 2009; Jefferis, 2010)
Plante	Cellule de racine de carotte <i>Lemna minor</i>		Présence de xylose Fucose en $\alpha(1,3)$ et $\alpha(1,4)$ seulement $\alpha(1,3)$ -galactose	Pas de contamination par des virus humains Production moins coûteuse que cellules de mammifères	N-glycosylation différente des mammifères Résidus très immunogéniques : xylose, $\alpha(1,3)$-gal et fucose en $\alpha(1,3)$ et $\alpha(1,4)$	Stratégies possibles pour surmonter les désavantages : inhibition d'ARN (Cox et al., 2006), extinction de gènes (Koprivova et al., 2004)	(De Muynck, Navarre, & Boutry, 2010; Gomord et al., 2010; Jefferis, 2010; Jin et al., 2008)

Cellules murines	NS0 Sp2/0		Présence de sialylation en $\alpha(2,3)$ et $\alpha(2,6)$ 50 % de Neu5Gc $\alpha(1,3)$ -galactose sur 30 % des branches Pas de GlcNAc bissecteur	Proviennent de lymphocytes B non différenciés Synthèse élevée d'anticorps monoclonaux Culture en suspension et sans sérum Plateforme bien caractérisée Pas de contamination par des virus humains	Peut contenir des structures glycosylées immunogéniques pour l'homme Présence de Galα1,3-Gal Présence de Neu5Gc	Glycoingénierie : sécrétion de sialidases pour augmenter ADCC (Naso, Tam, Scallon, & Raju, 2010)	(Butler, 2009; Butler & Spearman, 2014)
Cellules de hamster	CHO		Sialylation en $\alpha(2,3)$ Traces de Neu5Gc Pas de GlcNAc bissecteur	Lignée cellulaire du premier biopharmaceutique (t-PA) Facilite l'approbation par rapport à une lignée inconnue Plateforme bien caractérisée Culture en suspension et sans sérum Pas de contamination par des virus humains Système d'amplification développé permettant une productivité élevée Moins de résidus immunogéniques (pas de Galα1,3-Gal et peu de Neu5Gc)	Peut contenir des structures glycosylées immunogéniques pour l'homme $\alpha(2,3)$-sialylation exclusivement Rendement faible	Glycoingénierie : - Ajout de sialylation en $\alpha(2,6)$ (Raymond et al., 2015) - Suppression du fucose central en $\alpha(1,6)$ (Yamane-Ohnuki et al., 2004) - Ajout du GlcNAc bissecteur (Ferrara et al., 2011) Glycoingénierie : sécrétion de sialidases pour augmenter ADCC (Naso et al., 2010)	(Butler, 2009; Butler & Spearman, 2014)
Cellules humaines	HEK-293		Sialylation en $\alpha(2,3)$ et $\alpha(2,6)$ Neu5Ac GlcNAc bissecteur Fucose en $\alpha(1,6)$	Exprime l'$\alpha(2,6)$-sialyltransférase Production de protéines avec N-glycosylation humaine Possibilité d'ajout de GlcNAc bissecteur	Rendement faible Contamination par des virus humains Résidu LacdiNAc	Possibilité d'utiliser des lignées avec un rendement plus élevé (PER.C6)	(Butler, 2009; Butler & Spearman, 2014)



De nombreuses autres conditions de cultures ont également été étudiées et leurs impacts sont rassemblés dans le Tableau 2-8. L'ensemble de ces études présente néanmoins des différences au niveau des cellules de mammifères utilisées, des glycoprotéines produites et des conditions de culture. Ces différences permettent difficilement d'attribuer une influence claire à certains des paramètres même si pour d'autres, les effets paraissent évidents. De plus, étant donné que les analyses sur la glycosylation sont effectuées sur des glycoprotéines purifiées et que les étapes de purification et de caractérisation peuvent potentiellement avoir une influence sur les glycanes, les résultats de ces recherches portent à discussion.

2.3.2 Glycoingénierie par manipulation des voies de biosynthèse

La manipulation des voies de biosynthèse de la N-glycosylation (Figure 2-10 et Figure 2-11) est possible en sous- ou surexprimant des protéines impliquées dans ces voies et ainsi obtenir le profil de glycosylation souhaité.

2.3.2.1 Modification de la lignée cellulaire

La modification génétique permet d'obtenir des lignées cellulaires capables de produire des glycoformes optimisés. De plus, la limitation des capacités de glycosylation de ces lignées permet de réduire la complexité et l'hétérogénéité des glycanes et d'éviter la synthèse de structures glycaniques non souhaitées ou non observées dans le matériel d'origine.

La modification des lignées cellulaires a principalement été utilisée pour réduire le taux de fucosylation des IgG afin d'amplifier l'activité ADCC. La fucosylation de l'IgG est réalisée par l' α 1,6-fucosyltransférase (FUT8), qui utilise le GDP-fucose comme substrat donneur et reconnaît le glycoforme GlcNAcMan₃GlcNAc₂ comme substrat accepteur (Wang et al., 2019). Brièvement, il est possible de moduler la fucosylation en utilisant certaines lignées cellulaires, en sous- ou surexprimant certaines enzymes ou encore en intervenant sur la voie de biosynthèse du GDP-fucose et sur ses transporteurs.

Tableau 2-8 : Impact des paramètres de culture et du milieu de culture sur la N-glycosylation des glycoprotéines.

Conditions	Commentaires	Stratégie	Effets sur la glycosylation	Références
Mode de culture	Cuvée	a. Stratégie cuvée en bioréacteur pour la production d'IFN- γ en CHO	a. Diminution de la disialylation de l'IFN- γ au cours du temps	(Rodriguez, Spearman, Huzel, & Butler, 2005)
		b. Culture cuvée d'anticorps dans CHO en flasque	b. Anticorps déglycosylé une fois le glucose consommé	(Liu, J. K. H., 2014)
		c. Comparaison stratégies cuvée et cuvée alimentée en bioréacteur pour la production d'anticorps en cellules humaines	c. Anticorps déglycosylé dans la culture cuvée une fois le glucose consommé	(Seo et al., 2014)
	Cuvée alimentée	a. Culture en cuvée alimentée d'une glycoprotéine de fusion en CHO	a. Diminution de la sialylation et de la galactosylation avec la baisse de viabilité et le temps de culture	(Borys et al., 2010)
		b. Comparaison stratégie cuvée alimentée avec une culture perfusion pour la production d'une glycoprotéine dans les cellules CHO	b. Résultats similaires obtenus concernant le niveau de sialylation	(Meuwly et al., 2006)
		c. Culture en cuvée alimentée d'anticorps en bioréacteur avec une lignée inducible CHO	c. Diminution de la galactosylation avec le temps de culture	(Mellahi et al., 2019)
Sérum	Perfusion	Comparaison entre des cultures en cuvée alimentée et en perfusion pour la phosphatase alcaline en CHO	Augmentation de la sialylation avec la culture en perfusion	(Lipscomb, Palomares, Hernández, Ramírez, & Kompala, 2005)
			Croissance lente = meilleure occupation des sites de glycosylation + élongation complète plus fréquente	
Température	La production des protéines thérapeutiques est réalisée sans sérum Inconvénients : variabilité entre les lots, risque de contamination et composition non définie	a. Production d'anticorps par des hybridomes avec ou sans sérum	a. Sans sérum = taux de disialylation et d'hypergalactosylation plus élevés	(Serrato, Hernández, Estrada-Mondaca, Palomares, & Ramírez, 2007) (Costa et al., 2013)
		b. Adaptation d'une lignée de CHO produisant des anticorps monoclonaux pour une culture sans sérum (de 10 % à 0 % en 280 jours)	b. Grande influence de la glycosylation au changement de concentration de sérum durant le procédé d'adaptation	
Température	Une légère hypothermie (30 à 33°C) permet d'augmenter la productivité des cellules CHO (Kumar, Gammell, & Clynes, 2007) Impact différent selon la glycoprotéine produite	a. Culture d'anticorps dans des CHO avec un passage de 37 °C à 32 °C à la fin de la phase exponentiel de croissance	a. La diminution de la température à 32 °C diminue les concentrations de sucres nucléotidiques et l'expression des glycosyltransférases causant une diminution de la galactosylation et de la sialylation	(Sou et al., 2015)
		b. Production de GM-CSF dans des cellules CHO à 37 °C avec une diminution à 33 °C	b. Pas d'effet significatif du changement de température sur la glycosylation de la cytokine, incluant le degré de sialylation	(Bollati-Fogolin et al., 2005)
		c. Production d'EPO dans les cellules CHO à 37, 33 et 30 °C	c. La sialylation de l'EPO est meilleure à des températures plus faibles (30 °C) par rapport à 37°C	(Yoon, Song, & Lee, 2003)

Glucose/Glutamine	Le glucose et la glutamine influence de nombreuses voies métaboliques. La contradiction de certains résultats peut être due à des différences au niveau de la protéine produite, des conditions opératoires, des lignées cellulaires ...	a. Production d'un AcM chimérique humain-lama en CHO avec de faible concentration en glucose b. Culture d'anticorps dans des cellules CHO en cuve alimentée avec différentes stratégies d'alimentation c. Culture d'anticorps en CHO avec des concentrations initiales en glutamine variables (0 à 8 mM) d. Production de gonadotrophine en CHO avec divers taux de glutamine (0, 4 et 8 mM) e. Culture d'anticorps en CHO avec la substitution de la glutamine par le glutamate	a. Production d'anticorps avec un faible niveau de galactosylation et de sialylation ainsi que non glycosylés car la privation en glucose diminue la disponibilité immédiate en précurseurs de la glycosylation b. Le faible taux de glutamine mène à une limitation de la biosynthèse de l'UDP-GlcNAc favorisant les structures oligomannosidiques, Le taux de glucose et de glutamine influence la disponibilité du GDP-Gal et <i>a fortiori</i> la galactosylation c. Les cultures initiées avec un faible taux de glutamine ont des taux de galactosylation et de sialylation plus élevés d. La culture avec une faible concentration en glutamine mène à des structures mannosylés et à une diminution de la fucosylation, de la sialylation et de la biantennarité e. Augmentation du pourcentage d'anticorps galactosylé G1F et G2F	(Villacrés, Tayi, Lattová, Perreault, & Butler, 2015) (Fan, Y. et al., 2015) (Aghamohseni et al., 2014) (Burleigh et al., 2011) (Hong, Cho, & Yoon, 2010)
Déchets métaboliques	L'ammoniaque est un déchet métabolique toxique provenant du métabolisme de la glutamine et de l'asparagine et inhibe la croissance cellulaire et la productivité.	Culture d'anticorps en CHO avec des concentrations initiales en glutamine variables (0 à 8 mM)	Une concentration élevée en ammoniac cause une diminution de la galactosylation et de la sialylation	(Aghamohseni et al., 2014)
pH	Le pH du milieu influence le pH intracellulaire et l'activité des enzymes de la glycosylation. Le pH du RE est de 7,2 et il passe de 6,7 à 6 dans les compartiments de l'appareil de Golgi. Le pH influence peut influencer le transport du précurseur UDP-GlcNAc dans l'appareil de Golgi (Waldman & Rudnick, 1990).	a. Culture d'anticorps en CHO avec un pH maintenu à 6.8 par l'ajout d'acide lactique b. Production d'une enzyme dans des cellules CHO dans une gamme de pH étroite (7 à 7.18) c. Production d'EPO dans les cellules CHO avec une variation de pH (de 6.85 à 7.8) d. Production d'une IgG3 par un hybridome à divers pH (6.9, 7.2 et 7.4)	a. La réduction du pH permet l'augmentation de la galactosylation et de la sialylation b. L'augmentation du pH est corrélée à la diminution du taux d'occupation des sites de glycosylation et la sialylation diminue linéairement en passant d'un pH 7 à 7.16 c. La sialylation est plus élevée pour des pH inférieurs à 7.2 d. Variations des formes G0F, G1F et G2F avec le pH et une meilleure sialylation à pH 7.2 par rapport aux pH 6.9 et 7.4	(Aghamohseni et al., 2014) (Gawlitsek, Estacio, Fürch, & Kiss, 2009) (Yoon, Choi, Song, & Lee, 2005) (Müthing et al., 2003)
O₂ dissout	L'oxygène dissout influence les réactions enzymatiques du métabolisme cellulaire et la glycosylation. L'OD pourrait influencer le moment où se forme les ponts disulfures et créer une gêne stérique empêchant la galactosylation (Butler, 2006).	a. Production d'un anticorps par un hybridome avec une variation de l'OD (10, 50 et 100%) b. Production d'EPO-Fc avec une culture initiée dans des conditions normales (OD 30%) puis en phase exponentielle inoculation de cultures en bioréacteurs à des conditions d'OD variables (10 à 100%)	a. La réduction de l'OD diminue le taux de galactosylation b. Pas d'impact de l'OD sur la sialylation entre 10 et 90% mais diminution de la sialylation pour une OD de 100%	(Kunkel, Jan, Jamieson, & Butler, 1998) (Trummer et al., 2006)

Une des premières approches pour diminuer le taux de fucosylation consiste à utiliser certaines lignées cellulaires telles que la lignée dérivée de myélome de rat YB2/0. En effet, celle-ci dispose d'un niveau plus faible d' α 1,6-fucosyltransférase (Okazaki et al., 2004; Shinkawa et al., 2003). Une seconde approche consiste à intervenir sur la voie de biosynthèse du GDP-fucose. Pour cela, certaines études ont utilisé la lignée cellulaire mutante Lec13. Celle-ci porte une mutation dans le gène du GDP-mannose-4,6-déhydratase (GMD), une enzyme intervenant dans la conversion du GDP-mannose en GDP-fucose. Cela a mené à la production d'IgG avec un niveau plus faible de fucosylation (50-70 % d'IgG fucosylées) par rapport à celles obtenues avec des lignées cellulaires CHO sauvages (Ohyama et al., 1998; Ripka, Adamany, & Stanley, 1986; Shields et al., 2002). Un autre groupe a également démontré une inhibition de la fucosylation dans une lignée cellulaire ne disposant plus de GMD (Kanda et al., 2007). D'autres enzymes intervenant dans la voie de biosynthèse du GDP-fucose ont également été étudiées. Louie et collègues ont ainsi généré une lignée cellulaire n'exprimant plus la GDP-4-keto-6-D-deoxymannose epimérase/GDP-4-keto-6-L-galactose réductase (Louie et al., 2017). D'un autre côté, Kelly et collègues ont surexprimé la GDP-6-deoxy-D-talose synthétase (GTS) dans une lignée cellulaire CHO. Cette enzyme convertit le GDP-4-keto-6-deoxymannose en GDP-6-deoxy-D-talose. Cette stratégie a mené à la génération d'IgG avec un niveau d'afucosylation supérieur à 80 % (Kelly et al., 2018). Une troisième approche consiste à supprimer l'expression des transporteurs de GDP-fucose. En effet, les cellules n'étant plus capables de transporter le GDP-fucose à l'intérieur du Golgi, la fucosylation est inhibée. Récemment, cette approche a été utilisée pour générer des IgG anti-HER2 afucosylées menant à une augmentation de l'activité ADCC (Chan et al., 2016). D'un autre côté, Haryadi et collègues ont généré une lignée CHO (CHO-gmt5) dont les gènes codant pour les transporteurs des précurseurs GDP-fucose et CMP-Sia ont été inactivés. Cette double inactivation a permis la production d'anticorps asialylés et afucosylés (Haryadi, Zhang, Chan, & Song, 2013). Finalement, une dernière approche consiste à inhiber l' α 1,6-fucosyltransférase. Une des premières méthodes consistait à surexprimer la N-acétylglucosaminyltransférase III (GnTIII), une enzyme catalysant l'addition d'un GlcNAc bissecteur sur le β -mannose central (Davies et al., 2001; Ferrara et al., 2011; Umana, Moudry, Amstutz, & Bailey, 1999). En effet, l'ajout d'un GlcNAc bissecteur diminue indirectement la fucosylation en bloquant l'action de l' α 1,6-fucosyltransférase pendant la biosynthèse des IgG. Puis, des lignées cellulaires ne codant plus pour l' α 1,6-fucosyltransférase (suppression de FUT8) ont été générées, menant à la suppression de la fucosylation (Chung, S. et

al., 2012; Kanda et al., 2006; Niwa et al., 2004; Yamane-Ohnuki et al., 2004; Yamane-Ohnuki & Satoh, 2009). Yamane-Ohnuki et collègues ont ainsi développé une lignée cellulaire CHO FUT8 -/- produisant des anticorps anti-CD20 afucosylés avec une meilleure affinité pour les Fc γ RIIIa et une activité ADCC augmentée d'environ 100 fois (Yamane-Ohnuki et al., 2004).

D'autres études ont cherché à augmenter le taux de galactosylation et de sialylation (α 2,6) des IgG recombinantes puisqu'elles sont généralement très faiblement galactosylées ($\approx$ 80 % G0F et G1F) en raison d'une gêne stérique. En effet, il a été démontré que la galactosylation est importante pour la CDC (Dekkers et al., 2017; Quast et al., 2015; Wada, Matsui, & Kawasaki, 2019) et que la sialylation joue un rôle dans l'action anti-inflammatoire des IVIg (Anthony & Ravetch, 2010). Il a d'abord été démontré que certaines mutations d'acides aminés dans la région Fc de l'anticorps (F241A, F243A, V264A, D265A et R301A) augmentent l'accessibilité du site de glycosylation à la galactosyltransférase et à la sialyltransférase (Lund, Takahashi, Pound, Goodall, & Jefferis, 1996). Par la suite, un autre groupe a combiné la mutation de certains acides aminés de la région Fc avec la suppression de l'expression de ST3Gal4 et ST3Gal6 (deux enzymes codant pour l' α 2,3-sialyltransférase). Dans une première étude, des IgG avec 80 % de G2F ont ainsi été exprimées avec la mutation F241A (Chung, C. Y., Wang, Yang, Ponce, et al., 2017). Puis, dans une seconde étude, des IgG avec 77 % de α 2,6-sialylation ont été produites avec les mutations F241A, F243A, V262E et V264E couplées à une surexpression de l' α 2,6-sialyltransférase (Chung, C. Y., Wang, Yang, Yin, et al., 2017). Au contraire, d'autres groupes ont cherché à diminuer la sialylation puisqu'il a été démontré qu'elle diminue l'activité ADCC. C'est le cas de Naso et collègues qui ont développé des lignées cellulaires (CHO et NS0) sécrétant à la fois l'IgG et la sialidase A. Cette approche a permis le retrait de l'acide sialique des anticorps sécrétés et par conséquent une diminution du taux de sialylation. Les anticorps désialylés produits ont ainsi démontré une activité ADCC supérieure par rapport aux anticorps partiellement sialylés (Naso et al., 2010).

2.3.2.2 Co-expression d'enzyme

La co-expression de certaines enzymes modulant les voies de biosynthèse des IgG a été utilisée afin de générer rapidement des IgG avec des N-glycanes définis. Comme dans le cas précédent, cette approche a été largement utilisée pour diminuer le taux de fucosylation et augmenter la galactosylation et la sialylation.

Afin de réduire la fucosylation, Ferrara et collègues ont co-exprimé une GnTIII dont le domaine de localisation avait été échangé avec celui d'enzymes présentes dans le Golgi et ont atteint un niveau d'afucosylation de 90 % (Ferrara, Brunker, et al., 2006). D'un autre côté, Von Horsten et collègues ont produit des IgG non fucosylées par expression hétérologue de l'enzyme procaryote GDP-6-désoxy-D-lyxo-4-hexulose réductase. Cette enzyme convertit le GDP-4-keto-6-désoxy-D-mannose en GDP-D-rhamnose, menant à une rétroaction négative sur l'activité de la GMD et conséquemment à un faible niveau de GDP-fucose. Les anticorps obtenus avec un taux d'afucosylation de 98 % ont montré une activité accrue de l'ADCC (von Horsten et al., 2010). Plus récemment, Dekkers et collègues ont utilisé cette approche et ont également observé une diminution de l'incorporation de la fucosylation mais seulement de 94 % à 27 % (Dekkers et al., 2016).

D'autres études se sont concentrées sur l'optimisation de la galactosylation et de la sialylation. Raymond et collègues ont ainsi co-exprimé l' α 2,6-sialyltransférase (ST6Gal1) et la β 1,4-galactosyltransférase 1 (β 4GT1) dans une lignée CHO n'exprimant naturellement que l' α 2,3-sialyltransférase. Ces travaux ont montré que la co-expression des deux enzymes est nécessaire pour obtenir des profils de glycosylation enrichis en α 2,6-sialylation (Raymond et al., 2015). Dekkers et collègues ont également augmenté le niveau de galactosylation jusqu'à 70 % et 50 % en co-exprimant la β 4GT1 ou la β 1,4-galactosyltransférase 2 (β 4GT2) respectivement (Dekkers et al., 2016). Afin d'augmenter le taux d' α 2,6-sialylation, la même équipe a combiné la galactosylation (c.à.d., co-expression de β 4GT1 et ajout de D-galactose) avec la co-expression de la ST6Gal1. Cette approche a permis la génération d'IgG avec un taux de sialylation de 44 % (mono- et disialylé) sans affecter la production ou le niveau de galactosylation.

2.3.2.3 Ajout dans le milieu de culture de molécules modulant la N-glycosylation

La modulation de la N-glycosylation est également possible durant la phase de production grâce à l'ajout de molécules ayant une influence sur les voies de biosynthèse des IgG. De nombreuses molécules, ajoutées dans le milieu de culture ou dans les milieux d'alimentation, ont fait l'objet d'études et ont démontré une efficacité en tant que modulateur de la glycosylation. Une présentation détaillée de ces molécules et de leurs effets sur la glycosylation est disponible dans le Tableau 2-9.

Récemment, des études ont utilisé des inhibiteurs tels que le 2-F-peracétyl fucose (Rillahan et al., 2012) et le 2-déoxy-2-fluoro-L-fucose (Bruggeman et al., 2017; Dekkers et al., 2016; Dekkers et al., 2017; Subedi & Barb, 2016) afin de réduire significativement le taux de fucosylation. Très récemment, Ehret et collègues ont testé l'efficacité d'une large gamme de composés modulant la glycosylation (mannosylation, galactosylation, sialylation et fucosylation) dans deux lignées cellulaires (CHO-K1 et CHO-DG44), chacune produisant une IgG1 unique (Ehret, Zimmermann, Eichhorn, & Zimmer, 2019). D'après leurs résultats, la kifunensine est la molécule la plus efficace pour augmenter les formes oligomannosidiques (en particulier Man9). Concernant la fucosylation, le 2-F-peracétyl fucose (inhibiteur de la fucosyltransférase) s'est montré le plus efficace pour diminuer le taux de fucosylation avec une diminution concentration-dépendante. Dans le cas de la galactosylation, le niveau le plus élevé a été obtenu avec l'ajout combiné de galactose, de manganèse et d'uridine. Finalement, la dexaméthasone a été le composé le plus efficace pour augmenter la quantité totale de glycanes sialylés.

Tableau 2-9 : Résumé des petites molécules connues modulant la N-glycosylation. Tableau adapté de (Ehret et al., 2019).

Classe	Molécule	Modulation	Mécanisme	Références
Mannosylation	Castanospermine	↑ structures oligomannosidiques contenant du glucose	Inhibiteur de l'α-glucosidase	(Foddy & Hughes, 1988; Gross et al., 1986)
	Déoxynojirimycine	↑ structures oligomannosidiques contenant du glucose	Inhibiteur de l'α-glucosidase	
	Kifunensine	↑ structures oligomannosidiques	Inhibiteur de l'α-mannosidase I	(Chang et al., 2007; Kommineni et al., 2019; van Berkel et al., 2010)
	Déoxymannojirimycine	↑ structures oligomannosidiques	Inhibiteur de l'α-mannosidase I du Golgi	(Bischoff, Liscum, & Kornfeld, 1986)
	Mannostatine A	↑ structures oligomannosidiques	Inhibiteur de l'α-mannosidase II du Golgi	(Kuntz, Zhong, Guo, Rose, & Boons, 2009; Tropea et al., 1990)
	Tagatose	↑ Man5	Diminue la disponibilité du précurseur de l'UDP-GlcNAc	(Hossler et al., 2014)
	Sucrose	↑ Man5	Diminue la disponibilité du précurseur de l'UDP-GlcNAc	
	Raffinose	↑ Man5	Des différences dans les taux de sucres nucléotidiques ont été observées et un changement dans le niveau d'expression des gènes dépendants de la glycosylation a été identifié	(Brühlmann et al., 2017)
	Mannose	↑ structures oligomannosidiques	Augmente la concentration de GDP-mannose, menant à l'inhibition de l'activité de l'α-mannosidase	(Slade, Caspary, Nargund, & Huang, 2016)
	Monensine	↑ structures oligomannosidiques, surtout Man5	Neutralisation du pH dans le Golgi	(Pande, Rahardjo, Livingston, & Mujacic, 2015)
Fucosylation	2-F-peracétyl fucose	↓ fucosylation	Inhibiteur de l'α-1,6-fucosyltransférase et inhibition rétroactive du GDP-mannose 4,6-déhydratase	(Rillahan et al., 2012)
	2-déoxy-2-fluoro-L-fucose	↓ fucosylation	Inhibiteur des fucosyltransférases	(Dekkers et al., 2016; Subedi & Barb, 2016)
	<i>Reactive red</i> 120 (colorant triazine)	↓ fucosylation	Inhibiteur de l'α-1,6-fucosyltransférase dans un dosage enzymatique	(Kamińska, Dzieciol, & Kościelak, 1999)
	Acide mycophénolique	↓ fucosylation	Réduit la disponibilité du GTP	(Zhang, A. et al., 2016)

Galactosylation	Manganèse	↑ galactosylation	Cofacteur de la galactosyltransférase	(Crowell, Grampp, Rogers, Miller, & Scheinman, 2007; Gramer et al., 2011)
	Uridine	↑ galactosylation	Précurseur pour l'UDP-Gal	(Crowell et al., 2007; Gramer et al., 2011)
	Galactose	↑ galactosylation	Précurseur pour l'UDP-Gal	(Crowell et al., 2007; Gramer et al., 2011)
	Ammoniaque	↓ galactosylation	Augmentation du pH intracellulaire menant à une diminution de l'activité de la β -1,4-galactosyltransférase et de l'expression de l'ARNm	(Chen & Harcum, 2006; McCracken, Kowle, & Ouyang, 2014)
	2-deoxy-2-fluoro-D-galactose (2FG)	↓ galactosylation	Analogue du galactose	(Dekkers et al., 2016)
Sialylation	N-Acétylmannosamine	↑ sialylation	Précurseur du CMP-acide sialique	(Gu & Wang, 1998)
	ManNAc tétraacétylé	↑ sialylation	Précurseur du CMP-acide sialique	(Jones et al., 2004)
	N-Azidoacetyl D-mannosamine	↑ sialylation	Précurseur du CMP-acide sialique	(Jones et al., 2004; Keppler, Horstkorte, Pawlita, Schmidt, & Reutter, 2001)
	1,3,4-O-Bu3ManNAc Acide	↑ sialylation	Précurseur du CMP-acide sialique	(Yin et al., 2017)
	2,3-Déhydro-2-déoxy-N-acétylneuraminique	↑ sialylation	Inhibiteur compétitif de la sialidase	(Gramer, Goochee, Chock, Brousseau, & Sliwkowski, 1995)
	Cuivre	↑ sialylation	Inhibiteur compétitif de la sialidase	(Mitchelson, Hughes, Mondia, & Hyde-Deruysscher, 2017)
	Siastatine B	↑ sialylation	Inhibiteur compétitif de la sialidase	(Li, J. & McClane, 2014)
	Dexaméthasone	↑ sialylation	Augmentation du transfert d'acide sialique sur le galactose terminal, augmentation de l'expression de l' α -2,3-sialyltransférase et de la β -1,4-galactosyltransférase, diminution de l'activité sialidase extracellulaire	(Jing, Qian, & Li, 2010)
	Fétuine	↑ sialylation	Protéine hautement sialylée présente dans le sérum de veau fœtal qui pourrait fournir la NANA comme précurseur ou inhiber la sialidase extracellulaire	(Green, Adelt, Baenziger, Wilson, & Van Halbeek, 1988; Hollister, Conradt, & Jarvis, 2003)
	Glycérol	↑ sialylation	Stabilisation de la sialylation des glycoprotéines	(Rodriguez et al., 2005)

2.3.3 Glycoingénierie *in vitro*

La glycoingénierie par manipulation des voies de biosynthèse a permis la production d'anticorps avec des formes de glycane pures ou enrichies pour des études fonctionnelles et pour le développement thérapeutique. Néanmoins, la diversité des glycoformes accessibles par ces approches ainsi que leur qualité sont assez limitées en raison de la complexité des voies de biosynthèse du glycane.

2.3.3.1 Remodelage enzymatique *in vitro* résidu par résidu

Parallèlement aux approches génétiques précédemment énoncées, plusieurs études ont mis au point des méthodes de remodelage *in vitro* du glycane à l'aide de glycosidases et de glycosyltransférases. Ces méthodes ont permis de réduire ou d'étendre les chaînes de sucre d'anticorps purifiés. Le remodelage *in vitro* permet d'outrepasser les difficultés liées à l'influence négative des conditions opératoires de la production et de la purification et a permis la génération d'un large panel de glycoformes d'IgG. Cependant, cette méthode reste fastidieuse et coûteuse et ne permet pas une mise à l'échelle. De plus, elle nécessite des étapes de purification supplémentaires. Par conséquent, cette approche a été principalement utilisée dans le cadre d'études fonctionnelles de la glycosylation des IgG sur leur interaction et fonction biologique. Récemment, plusieurs études ont remodelé *in vitro* la galactosylation et la sialylation des IgG afin d'étudier leur influence sur l'interaction avec les FcγR et sur l'activité ADCC (Dashivets et al., 2015; Subedi & Barb, 2016; Thomann et al., 2015).

Dans la plupart des études, la modulation de la galactosylation et de la sialylation suit un protocole similaire. D'un côté, la dégalactosylation d'IgG désialylées est réalisée avec la β-1,4-galactosidase (Boyd, Lines, & Patel, 1995; Dashivets et al., 2015; Hodoniczky, Zheng, & James, 2005; Peipp et al., 2008; Peschke, Keller, Weber, Quast, & Lünemann, 2017; Subedi & Barb, 2016; Thomann et al., 2015) tandis que l'augmentation du niveau de galactosylation s'effectue avec la β-1,4-galactosyltransférase accompagnée d'UDP-galactose (Anthony et al., 2008; Dashivets et al., 2015; Hodoniczky et al., 2005; Peschke et al., 2017; Raju, Briggs, Chamow, Winkler, & Jones, 2001; Scallon, Tam, McCarthy, Cai, & Raju, 2007; Subedi & Barb, 2016; Thomann et al., 2015; Warnock et al., 2005; Washburn et al., 2015). Warnock et collègues ont ainsi décrit la galactosylation *in vitro* d'IgG agalactosylées à une échelle de 40 L suivie par une seule étape de

purification avec la protéine A (Warnock et al., 2005). Dans le cas de la sialylation, étant donné que les IgG recombinantes sont rarement sialylées, il est rarement nécessaire de réaliser une désialylation. Cependant, avec certaines lignées cellulaires, un certain niveau de sialylation peut être observé et leur retrait est permis par des sialidases aussi appelées neuraminidases (Anthony et al., 2008; Boyd et al., 1995; Dashivets et al., 2015; Peipp et al., 2008; Scallan et al., 2007). Ces enzymes varient selon leur capacité à hydrolyser une ou plusieurs liaisons osidiques entre l'acide sialique et le galactose ($\alpha 2,3$, $\alpha 2,6$, $\alpha 2,8$ et/ou $\alpha 2,9$). Finalement, la sialylation *in vitro* est généralement réalisée avec une sialyltransférase et le précurseur CMP-NANA (acide N-acétylneuraminique) (Anthony et al., 2008; Barb et al., 2012; Dashivets et al., 2015; Dekkers et al., 2016; Raju et al., 2001; Scallan et al., 2007; Thomann et al., 2015; Washburn et al., 2015). Selon l'étude, des variations peuvent être observées pour certains paramètres tels que le type d'enzyme (p.ex. $\alpha 2,3$ - ou $\alpha 2,6$ -sialyltransférase), le tampon, le temps d'incubation ainsi que les concentrations de substrat, d'enzyme et de précurseur.

L'addition ou le retrait enzymatique *in vitro* de résidus de galactose et d'acide sialique sur des anticorps monoclonaux purifiés permet donc d'enrichir le mélange du profil glycanique souhaité. Cependant, toutes les études ayant utilisé cette approche ont montré un niveau significatif d'hétérogénéité. C'est le cas d'une étude récente où la glycoingénierie *in vitro* avec des glycosidases et des glycosyltransférases a permis d'obtenir des glycoformes d'IgG enrichis mais hétérogènes surtout concernant la sialylation (c.-à-d., hypogalactosylée : 85.3 % G0F; hypergalactosylée : 83.7 % G2F; disialylée : 47.7 % G2FS1 et 29.6 % G2FS2) (Thomann et al., 2015). Étant donné la complexité de l'influence des N-glycanes d'IgG sur l'interaction avec les Fc γ R, l'hétérogénéité peut nuire à l'interprétation des effets observés et mener à des conclusions erronées. Ceci peut partiellement expliquer la divergence de certaines études concernant l'effet de la galactosylation et de la sialylation.

2.3.3.2 Remodelage chimioenzymatique

Contrairement à l'approche basée sur les glycosidases et les glycosyltransférases, permettant la réduction et l'allongement de la chaîne de sucre résidu par résidu, la synthèse chimioenzymatique est basée sur l'utilisation d'endoglycosidases pour le remodelage de blocs oligosaccharidiques. Au vu de l'homogénéité et de la diversité des glycoformes obtenues, cette approche de remodelage chimioenzymatique du glycane a suscité un intérêt considérable ces dernières années que ce soit

pour la synthèse de glycoprotéines et le remodelage glycanique des anticorps (Fan, S.-Q., Huang, & Wang, 2012; Huang, Giddens, Fan, Toonstra, & Wang, 2012; Kurogochi et al., 2015; Li, T. et al., 2017; Lin et al., 2015; Parsons et al., 2016; Shivatare et al., 2018; Tsukimura et al., 2017; Wada et al., 2019; Wang et al., 2019; Zou et al., 2011). Cette méthode a été utilisée pour la première fois en 2008 sur le domaine Fc d'une IgG humaine recombinante dont le glycane a été remodelé à l'aide d'une endoglycosidase (Wei et al., 2008). Globalement, cette approche illustrée dans la Figure 2-14 comprend deux étapes clés : (i) déglycosylation par une endoglycosidase afin d'éliminer les N-glycanes naturels hétérogènes puis (ii) transfert enzymatique en bloc d'un N-glycane préassemblé par une endoglycosidase mutante (glycosynthase) (Wang et al., 2019).

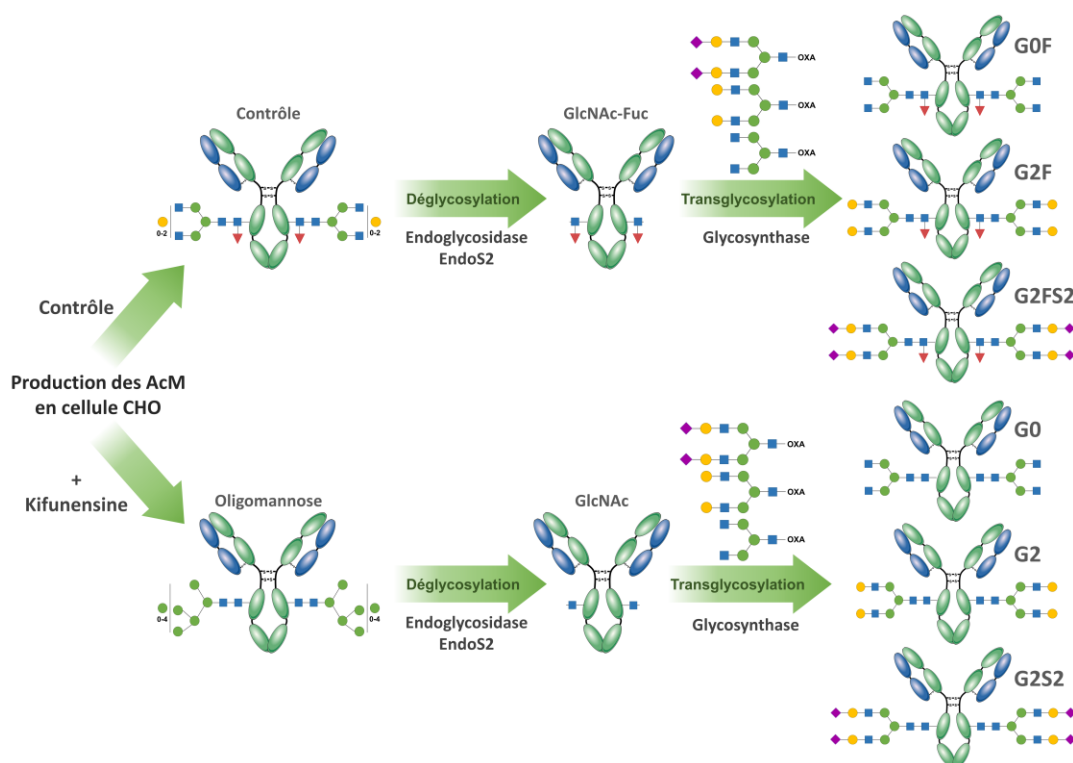


Figure 2-14 : Exemple d'une méthode de modification chimioenzymatique de la N-glycosylation d'une IgG. Les AcM sont d'abord déglycosylés par la GST-EndoS2, laissant respectivement les GlcNAc-Fucose et GlcNAc sur leurs résidus d'asparagine. Après purification et échange de tampon, les N-glycanes couplés à l'oxazoline (G2S2-oxa, G2-oxa et G0-oxa) sont transférés sur le résidu restant lié à l'asparagine (GlcNAc-Fuc ou GlcNAc) de chaque accepteur (AcM-GlcNAc-Fuc et AcM-GlcNAc) par transglycosylation en utilisant une glycosynthase. Figure adaptée de (Fairbanks, 2018; Wada et al., 2019).

2.3.4 Analyse de la N-glycosylation

La qualité par la conception (« *Quality by design* » – QbD) est un cadre conceptuel pour le développement, la fabrication et l'approbation des produits biopharmaceutiques (del Val, Kontoravdi, & Nagy, 2010). Cette approche générique a été proposée dans le but de tester et de construire la qualité du produit fini au sein du procédé. Les principales organisations réglementaires encouragent fortement sa mise en place dans la fabrication de l'ensemble des produits biologiques tels que les AcM. Plus précisément, des attributs de qualité critiques (CQA) du produit (p. ex. la glycosylation) sont identifiés ainsi que les paramètres du procédé qui les affectent. Ensuite, le fabricant doit déterminer le profil de qualité du produit souhaité et sélectionner un procédé de fabrication adapté pour produire celui-ci. Finalement, une stratégie de contrôle du procédé est mise en place dans le but de maintenir le procédé dans des limites prédéfinies et d'obtenir le profil de qualité souhaité (Jedrzejewski, del Val, Polizzi, & Kontoravdi, 2013).

Comme expliqué précédemment, la glycosylation est l'une des principales responsables de l'hétérogénéité de l'anticorps et influence l'activité biologique de ce dernier. Ainsi, une glycosylation appropriée a été définie comme un CQA qui doit avoir fait la preuve de sa force et de sa sûreté avant toute approbation (Zhang, P. et al., 2016). De plus, chaque CQA doit être suivi et mesuré à différents stades de la fabrication de l'AcM : la découverte, la caractérisation, la comparabilité, l'optimisation du procédé, les tests de stabilité et les tests fonctionnels. Dans ce contexte et celui des études fonctionnelles de la N-glycosylation, de nombreuses techniques d'analyse ont été développées afin de permettre un profilage, une quantification et une analyse structurale de la glycosylation. Ces méthodes, basées sur différentes techniques, cherchent à être rapide et à haut-débit (Aich, Lakbub, & Liu, 2016). Par ailleurs, l'analyse de la glycosylation peut être réalisée à trois niveaux : sur le glycan libre, à partir d'un glycopeptide ou à partir de l'anticorps entier (Zhang, P. et al., 2016).

2.3.4.1 Analyse du glycan libre

L'analyse du glycan libre nécessite plusieurs étapes préalables de préparation. En effet, une première étape de déglycosylation est nécessaire afin de séparer le glycan de la protéine. Cette étape est réalisée le plus souvent grâce à une amidase appelée Peptide:N-Glycosidase F (PNGaseF) et qui permet le clivage entre l'asparagine et le premier GlcNAc du glycan. Ensuite, étant donné que le glycan ne possède pas de chromophore naturel, une étape de marquage par une molécule

fluorescente n'affectant pas le profil glycanique est indispensable. Les marqueurs fluorescents les plus communément utilisés sont le 2-aminobenzamide (2-AB), l'acide 2-aminobenzoïque (2-AA) et le 6-aminoquinolyl-n-hydroxysuccinimidyl-carbamate (AQC) (Zhang, P. et al., 2016). Finalement, avant toute analyse, l'échantillon doit subir plusieurs étapes de nettoyage. Suite à cette préparation, l'analyse de la structure des glycanes est permise par des méthodes basées sur la spectrométrie de masse ou sur des techniques de séparation telles que la chromatographie et l'électrophorèse capillaire (Aich et al., 2016). Malgré ses inconvénients, l'analyse du glycanes libre permet de déterminer la composition en monosaccharides, la quantité relative des glycanes dans un mélange et les types de liaisons glycosidiques grâce à des digestions successives du glycanes par un panel d'exoglycosidases (Zhang, P. et al., 2016).

2.3.4.1.1 Techniques de séparation

Les techniques de séparation les plus communément utilisées pour l'analyse des glycanes libres sont résumées dans le Tableau 2-10 (Adamczyk et al., 2014; Reusch et al., 2015; Stöckmann, Duke, Millán Martín, & Rudd, 2015; Szekrenyes et al., 2015). L'UPLC est devenue la méthode de choix étant donné ses avantages : meilleure résolution, temps de séparation rapide et couplage possible avec un spectromètre de masse comme méthode orthogonale.

2.3.4.1.2 Association avec la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode permettant l'ionisation des molécules puis leur séparation en fonction de leur rapport masse/charge. Pour l'analyse des glycanes libres, les méthodes de séparation peuvent être couplées à un spectromètre de masse. Les méthodes d'ionisation les plus souvent utilisées sont l'électronébulisation (ESI) et la désorption-ionisation par impact laser assistée par matrice (MALDI). La MALDI est une méthode rapide pour le profilage des glycanes neutres. Cependant, elle mène à la dissociation des acides sialiques d'où la nécessité de dériver ces derniers (perméthylation). L'ESI est une méthode plus douce pouvant être couplée à des méthodes de séparation en ligne mais avec des taux d'ionisation des glycanes hydrophiles plus faibles (Zhang, P. et al., 2016).

La plupart du temps, une simple spectrométrie de masse ne permet pas l'obtention des structures glycaniques. Il est donc nécessaire d'utiliser la spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) qui permet l'ajout d'une étape supplémentaire de fragmentation. La dissociation induite

par collision (CID) est l'une des méthodes de fragmentation la plus commune (Zhang, P. et al., 2016).

Diverses technologies basées sur des puces (NanoHPLC chip-MS) se sont également développées ces dernières années, amenant de nouvelles stratégies de profilage des N-glycanes plus rapides et plus sensibles (Bynum et al., 2009).

Tableau 2-10 : Méthodes de séparation communément utilisées dans le profilage et la quantification de la N-glycosylation des IgG. Tableau adapté de (Aich et al., 2016).

Méthodes	Spécificité	Avantages	Inconvénients
HPAE-PAD	60 min	Excellente séparation des structures monoantennaires.	Les facteurs de réponses peuvent être différents pour différents glycanes.
	Haute résolution	Séparation des glycanes neutres et sialylés. Ne nécessite pas de dérivation. Les erreurs de quantification dues à la désialylation sont évitées.	Temps d'analyse plus élevé. Contamination par des oligosaccharides et non oligosaccharides. Éluant très concentré en sels anioniques.
HPLC-HILIC	~180 min	Séparation des glycanes fucosylés / afucosylés et des glycanes sialylés / neutres. Compatible avec un détecteur SM.	Temps de séparation plus long. Co-élution de plusieurs glycanes. Résolution plus faible par rapport à UPLC-HILIC.
UPLC-HILIC	Rapide <17 min	Séparation rapide. Possible pour le criblage rapide des N-glycanes pour l'optimisation de procédé. Hautement reproductible.	Co-élution de pics possible. Faible résolution comparée à l'UPLC-HILIC haute résolution.
	Haute résolution 45-60 min	Séparation haute résolution des glycanes fucosylés, galactosylés, mannosylés et sialylés. Compatible avec un détecteur SM. Haute sensibilité et haute reproductibilité.	Les GlF-GlcNAc co-éluent. Les glycanes oligomannosidiques peuvent éluer presque en même temps que les glycanes sialylés.
RP-LC	60-80 min	Séparation basée sur différents attributs de qualité. Méthode simple et haute résolution. Compatible avec un détecteur SM.	Co-élution de nombreuses structures. Temps de séparation plus long.
CE-LIF	Rapide 5 min	Séparation rapide. Possible pour le criblage rapide des N-glycanes pour l'optimisation de procédé. Haute spécificité et adaptable au haut-débit.	Co-élution possible de glycanes. Faible résolution comparée à la CE-LIF haute résolution.
	Haute résolution 20-30 min	Séparation haute résolution. Approche orthogonale à la méthode HILIC-UPLC.	Ne peut pas détecter les glycanes G2. Quantité relative de glycanes afucosylés plus faible. G0F-GlcNAc et G1F-GlcNAc non séparés.

2.3.4.2 Analyse du glycopeptide

L'analyse de glycopeptide permet d'étudier la microhétérogénéité et de comprendre la contribution de la structure d'un glycane situé sur un site spécifique. Cette technique est donc utile lors de l'analyse de glycoprotéine possédant plusieurs sites de glycosylation. Cette méthode nécessite une digestion protéolytique préalable de la glycoprotéine grâce à des enzymes telles que la trypsine. Par la suite, les glycopeptides sont séparés et analysés par des techniques de séparation associées à de la spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse est requise pour la détermination de la séquence du peptide et la composition saccharidique. Parmi les analyseurs, le temps de vol (TOF) est le plus communément utilisé (Zhang, P. et al., 2016). Parmi les méthodes les plus communément utilisées, on retrouve le MALDI-SM, le RP-LC-SM, le nano-LC-SM et le HILIC-LC-SM (Aich et al., 2016).

Le MALDI-SM est une technique rapide permettant une faible consommation d'échantillon, un haut débit et un fort potentiel d'automatisation. Cependant, cette méthode ne permet pas la détection des acides sialiques sans stabilisation de ces derniers (Reusch et al., 2015). La RP-LC-SM est une méthode hautement reproductible et capable de détecter les glycanes sialylés. Cette méthode est particulièrement utile pour l'identification de la glycosylation et des sites de glycosylation des anticorps. Cependant, cette méthode présente un temps de rétention plus long, une sous-estimation de la quantité de certaines structures et une co-élution des peptides et des glycopeptides (Reusch et al., 2015). La nano-LC-SM est une technique rapide (~16 min) mais ne permettant pas la détection de tous les glycanes sialylés (Reusch et al., 2015). Enfin, la HILIC-LC-SM permet une bonne séparation des peptides et glycopeptides mais nécessite encore des optimisations (Gilar et al., 2011).

2.3.4.3 Analyse de l'anticorps entier

Dans ce dernier type d'analyse, la glycoprotéine intacte peut être analysée par spectrométrie de masse avec ou sans étape de séparation préalable mais aussi par l'utilisation de techniques basées sur les lectines. Ce type d'analyse permet principalement l'étude des glycoformes et des appariements de glycanes. L'analyse des anticorps entiers est rapide, robuste et permet la comparaison de produits provenant de différentes cultures avec une préparation minimale (Zhang, P. et al., 2016).

2.3.4.3.1 *Spectrométrie de masse*

Étant donné sa haute résolution, la spectrométrie de masse est devenue un outil analytique indispensable pour la caractérisation des AcM durant les différentes phases du développement. Des analyseurs haute résolution tels que le temps de vol, l'Orbitrap et la résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR) sont nécessaires pour séparer les faibles différences de masse. Cependant, le FT-ICR n'est pas une technique communément utilisée dans les compagnies biopharmaceutiques étant donné son coût. Sans l'utilisation de FT-ICR, une très haute résolution est permise par l'utilisation d'un hybride QToF ou un hybride piège ionique quadripolaire-Orbitrap (Zhang, P. et al., 2016).

2.3.4.3.2 *Lectines*

L'utilisation des lectines permet l'analyse de la glycosylation des anticorps sans étapes de préparation (déglycosylation et marquage) et sans l'utilisation de techniques onéreuses comme la spectrométrie de masse. De plus, les lectines peuvent être associées à des techniques comme l'ELISA (Thompson, Creavin, O'Connell, O'Connor, & Clarke, 2011) ou la chromatographie d'affinité (Yang, Z. & Hancock, 2004). D'autres techniques ont également été développées ces dernières années comme par exemple un test de liaison aux lectines basé sur la chimioluminescence (Onitsuka & Omasa, 2014).

Une autre équipe a développé une micro-puce contenant 45 lectines, reconnaissant des glycanes distincts, pour l'évaluation de la glycosylation d'AcM thérapeutiques. Cette technique s'est avérée hautement sensible et les résultats en accord avec les motifs glycaniques connus. Cependant, cette étude a analysé uniquement des AcM purifiés et ne semble pas détenir le potentiel d'analyse d'AcM dans un surnageant. De plus, un marquage des glycoprotéines est nécessaire (Zhang, L., Luo, & Zhang, 2016).

Afin d'améliorer les performances des techniques basées sur les lectines, Shang et collègues ont développé une plateforme microfluidique automatisée avec des « code-barres » de lectines (Shang, Zeng, & Zeng, 2016). Encore une fois, malgré une haute sensibilité, les auteurs analysent des anticorps purifiés et la détection des glycoprotéines capturées nécessite un anticorps biotinylé et une streptavidine marquée par un fluorochrome.

Ainsi, comme le montre les différentes études ci-dessus, l'utilisation des lectines pour le profilage de la glycosylation des anticorps ne permet l'analyse que de glycoprotéines purifiées. De plus, ces techniques nécessitent une étape de détection et ne permettent pas de différencier les différences d'appariements.

2.4 Influence de la N-glycosylation sur l'interaction IgG / FcγR

2.4.1 Mesure de l'interaction IgG / FcγR par SPR

La résonance des plasmons de surface (SPR) est un phénomène physique exploité par de nombreux biocapteurs pour la mesure en temps réel et sans marquage des interactions entre un ligand immobilisé sur une surface et son partenaire biologique injecté. La SPR est une méthode très sensible puisque le biocapteur est capable de détecter des changements de masse inférieurs à quelques picogrammes/mm². Par ailleurs, la mesure de l'interaction en temps réel permet l'obtention de caractéristiques d'interaction telles que les constantes cinétiques et thermodynamiques (Biacore, 2003; De Crescenzo, Boucher, Durocher, & Jolicoeur, 2008).

2.4.1.1 Principe du biocapteur SPR

Dans le cas de la technologie BiacoreTM, un rayon de lumière monochromatique polarisée passe à travers un prisme et est totalement reflété sur une fine surface d'or (Figure 2-15A). Sous ces conditions de réflexion interne totale, la lumière incidente, selon une certaine combinaison d'angle incident et d'énergie, excite des plasmons (ondes d'électron) à la surface du film d'or. Ce phénomène appelé résonance des plasmons de surface cause une diminution de l'intensité de la lumière reflétée due à l'apparition d'une onde évanescente absorbant une partie de l'énergie. L'angle de la lumière reflétée pour lequel la diminution est maximale est appelé angle de résonance (θ_{SPR}) (Boisseau & Lahmani, 2009; De Crescenzo et al., 2008).

Étant donné que l'onde évanescente pénètre dans la solution, l'angle de résonance est sensible aux changements d'indice de réfraction proche de la surface (environ 300 nm) (De Crescenzo et al., 2008). Cet indice de réfraction dépend lui-même d'un certain nombre de facteurs tels que la masse des molécules à la surface (Boisseau & Lahmani, 2009). Pour résumer, les changements de concentration de la solution à la surface de la fine couche d'or, liés à l'interaction analyte (A) / ligand (L), provoquent des changements dans l'indice de réfraction de la solution,

menant à une perturbation de la résonance des plasmons et à une variation de l'angle de résonance (Biacore, 2003). En mesurant le déplacement de l'angle de résonance en fonction du temps, il est possible de mesurer l'association et la dissociation de l'analyte avec le ligand immobilisé (Figure 2-15) (Boisseau & Lahmani, 2009).

Le sensogramme obtenu comprend généralement 4 phases qui forment un cycle : (i) injection de tampon, (ii) injection de l'analyte, (iii) injection de tampon (dissociation de l'analyte) et (iv) régénération de la surface (Figure 2-15B). Durant un cycle, la surface sur laquelle est immobilisée le ligand ainsi qu'une surface contrôle (sans ligand) sont exposées en continu à un flux de solvant (tampon, solution avec l'analyte ou solution de régénération). Plus précisément, avant la phase d'injection, la réponse est stabilisée par le passage du tampon. Puis, une fois le signal stable, la solution avec l'analyte est injectée et la réponse corrigée augmente si l'analyte interagit avec le ligand immobilisé et que la masse à la surface du biocapteur augmente. À la fin de la phase d'injection, le flux d'analyte est remplacé par un flux de tampon et la réponse corrigée diminue si les complexes se dissocient. Enfin, une dernière phase consiste à dissocier totalement l'analyte du ligand avec une solution de régénération (base, acide, sel, détergent) afin de revenir au signal d'origine. Cette étape est critique car il est essentiel de ne pas endommager la surface afin que le nombre de site de liaison soit similaire pour les prochains cycles (Figure 2-15B) (Boisseau & Lahmani, 2009). Plusieurs paramètres tels que la température, la concentration de l'analyte, le temps d'injection et le temps de dissociation peuvent être modulés entre chaque cycle.

L'utilisation d'une surface contrôle ainsi qu'une injection de tampon sur les deux surfaces (ligand + contrôle) permet d'effectuer une double correction du signal (Myszka, 1999). Celle-ci permet d'éliminer certains artéfacts tels que les interactions non spécifiques, les perturbations physiques et électriques ainsi que le changement d'indice de réfraction causé par l'injection d'une autre solution (De Crescenzo et al., 2008). Plus précisément, chaque signal est corrigé une première fois en soustrayant la réponse de la surface contrôle de la réponse de la surface avec ligand ($S_{\text{Lig}} - S_{\text{Cont}}$). Puis, une seconde correction est réalisée en soustrayant le signal corrigé du cycle avec tampon aux signaux corrigés des cycles obtenus avec différentes concentrations d'analyte ($(S_{\text{Lig}} - S_{\text{Cont}}) - (S_{\text{Lig-Tampon}} - S_{\text{Cont-Tampon}})$). D'autres artéfacts tels que la reliaison de l'analyte et la limitation par transfert de masse peuvent être évités en augmentant la vitesse d'injection ($> 30 \mu\text{L/min}$) et/ou en diminuant la quantité de ligand immobilisé ($< 100 \text{ RU}$) (Myszka, 1997).

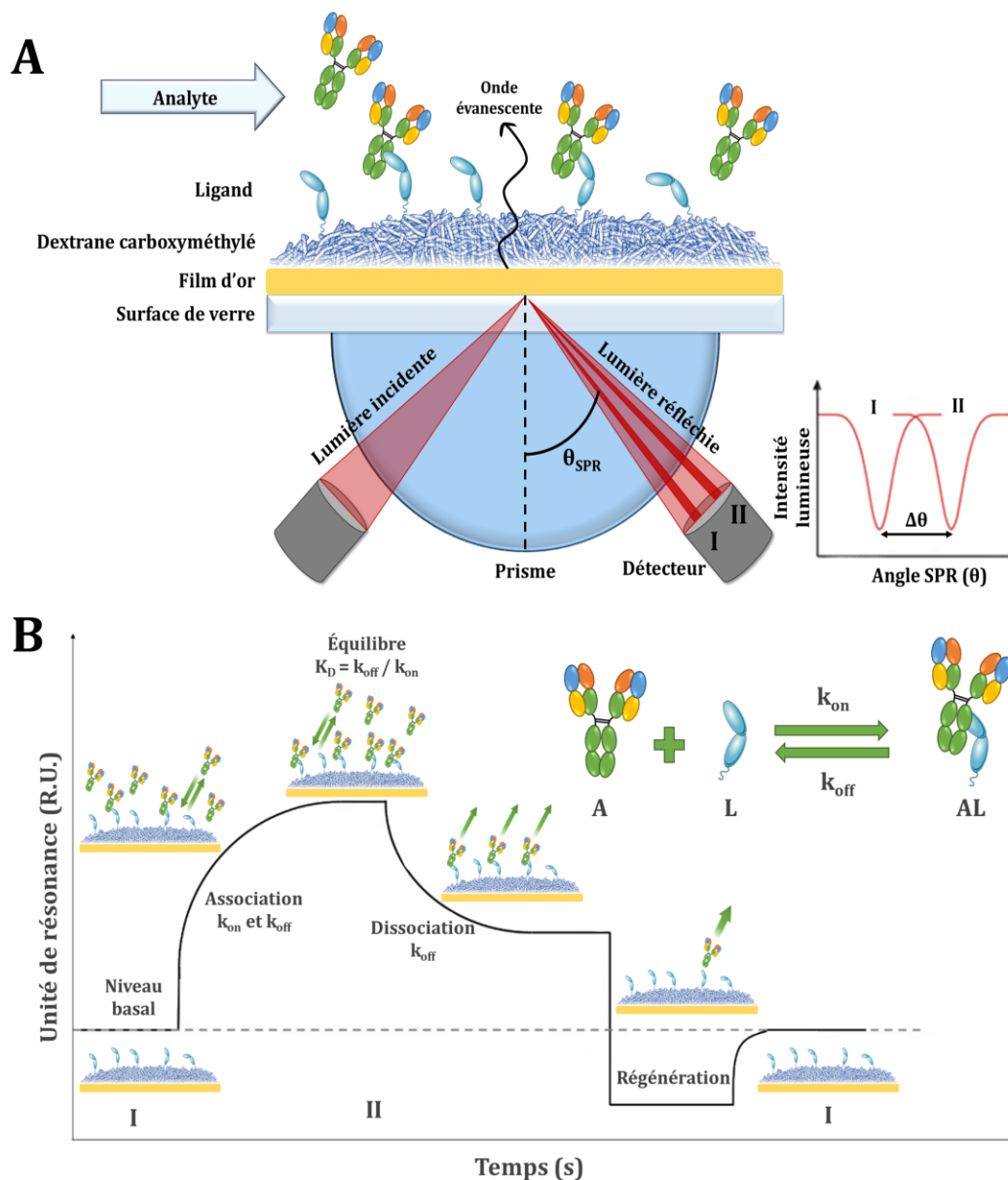


Figure 2-15 : (A) Schématisation du système optique du système SPR de Biacore. (B) Représentation d'un sensogramme SPR type avec les différentes constantes cinétiques associées. Figure adaptée de (De Crescenzo et al., 2008).

L'avantage de la détection en temps réel du biocapteur SPR est la détermination de la cinétique des interactions biomoléculaires pour étudier le comportement du système. Les constantes cinétiques (k_{on} et k_{off}) et les constantes thermodynamiques (K_A et K_D) des interactions peuvent être déterminés. Les détails concernant chacune de ces constantes sont consignés dans le Tableau 2-11.

Tableau 2-11 : Définitions des constantes cinétiques d'association et de dissociation et des constantes thermodynamiques d'association et de dissociation. Tableau adapté de (Schasfoort, 2017)

	Constante cinétique d'association, k_{on}	Constante cinétique de dissociation, k_{off}	Constante thermodynamique d'association, K_A	Constante thermodynamique de dissociation, K_D
Définition	$A + L \rightarrow AL$	$AL \rightarrow A + L$	$[AL]/[A][L]$ $= k_{on} / k_{off}$	$[A][L]/[AL]$ $= k_{off} / k_{on}$
Description	Vitesse de réaction de la formation de AL : nombre de complexes AL formés par unité de temps	Vitesse de dissociation de AL : nombre de complexes AL se dissociant par unité de temps	Affinité de l'association : K_A élevé = affinité élevée pour l'association	Inverse de l'affinité : K_D élevé = affinité faible
Unité	$L.mol^{-1}.s^{-1}$	s^{-1}	$L.mol^{-1}$	$mol.L^{-1}$ (M)
Intervalle typique	$10^3 - 10^7$	$10^{-1} - 5 \times 10^{-6}$	$10^3 - 10^{12}$	$10^{-3} - 10^{-12}$

Brièvement, les cinétiques d'interaction sont analysées en mesurant l'interaction en fonction du temps sur une gamme de concentrations d'analyte. Les constantes cinétiques sont alors obtenues via l'ajustement global de l'ensemble des données à un modèle mathématique décrivant l'interaction (Schasfoort, 2017). La phase d'association (pendant l'injection de l'analyte) contient des informations sur l'association (k_{on}) et la dissociation (k_{off}) de l'analyte, tandis que la phase de dissociation (après l'injection de l'analyte, lorsque le flux de tampon élimine l'analyte qui se dissocie) ne contient que des informations sur la dissociation (k_{off}) de l'analyte (Figure 2-15B) (Healthcare, 2012). Il est important de savoir que les résultats de l'analyse cinétique ne sont valables que dans le contexte du modèle d'interaction choisi pour l'évaluation. Un certain nombre de modèles cinétiques peuvent être appliqués aux données mesurées. En général, il faut utiliser le modèle le plus simple pour obtenir des valeurs cinétiques. Cependant, toutes les données ne donnent pas les constantes de réaction pseudo-premier ordre attendues (Marquart, 2019). Le transfert de masse, la liaison de l'analyte à la surface ou les effets de surface tels que l'hétérogénéité de l'immobilisation peuvent affecter les données. Par conséquent, avant d'ajuster plusieurs modèles à la recherche du meilleur ajustement aux données, il est préférable d'optimiser les conditions expérimentales (p.ex., types de puces, méthodes d'immobilisation, densité de ligand,

compositions du tampon et/ou débits). Par ailleurs, l'obtention des constantes cinétiques suppose que les molécules de ligand sur la surface n'ont pas été altérées par la régénération. L'évaluation de l'ajustement et des constantes calculées révèle si le modèle est correct.

Les constantes thermodynamiques, qui reflètent la force de la liaison et non la cinétique, peuvent être dérivée soit des constantes cinétiques soit de l'analyse des niveaux de liaison à l'équilibre (plateaux) (Healthcare, 2012). Ainsi, dans le cas d'une liaison simple 1:1, les constantes thermodynamiques sont égales au rapport des constantes cinétiques (Tableau 2-11). Dans le cas de mécanismes de liaison plus complexes, il n'est pas toujours possible d'établir des relations directes entre l'affinité et la cinétique. Par conséquent, les constantes thermodynamiques ne sont obtenues qu'à partir de constantes cinétiques obtenues avec un modèle d'interaction simple. La détermination des constantes thermodynamiques peut également être réalisée via l'analyse des niveaux de liaison à l'équilibre (plateau) en fonction des concentrations d'analyte. Plus précisément, cette méthode consiste à faire circuler l'analyte (à différentes concentrations) sur le ligand jusqu'à ce que le signal se stabilise et que l'association nette soit égale à la dissociation (phase d'équilibre) (Figure 2-15B) (Marquart, 2019). Puis, les réponses à l'équilibre sont tracées en fonction des concentrations d'analyte. La constante thermodynamique de dissociation (K_D) correspond alors à la concentration d'analyte donnant une réponse égale à 50 % de R_{max} (la réponse maximale où tous les sites de liaison sont occupés par l'analyte). Il est à noter que pour cette méthode, il n'est pas nécessaire de saturer le ligand, tant que la courbe d'équilibre présente une courbure suffisante pour être ajustée. Pour un résultat fiable, environ 30 à 40 % du ligand devrait être saturé. Le plus important est que l'injection de l'analyte doit être suffisamment longue pour atteindre l'état d'équilibre (plus long à atteindre pour les petites concentrations d'analyte). Enfin, cette méthode n'est applicable qu'à une liaison simple 1:1 (Marquart, 2019).

Comme mentionné précédemment, certaines interactions sont trop complexes pour être décrites par un modèle mathématique simple. Dans ce cas, l'obtention des constantes cinétiques et thermodynamiques est inappropriée. Pour pallier ce problème, une méthode de comparaison des profils cinétiques a été mise en place par Karlsson et collègues (Karlsson, Pol, & Frostell, 2016) et a notamment été utilisée pour l'analyse des interactions IgG / FcγR qui dans certains cas sont trop complexes (c.-à-d., FcγRIIIa et FcγRI) (Cambay, Henry, Durocher, & De Crescenzo, 2019; Hayes et al., 2017). Cette méthode est développée dans le Chapitre 4.

La surface de la puce du biocapteur et la méthode d'immobilisation sont des paramètres essentiels pour la conception d'une analyse optimale. La surface des puces BiacoreTM est recouverte d'une matrice de dextrane carboxyméthylé. Celle-ci permet d'éviter les adsorptions non spécifiques et crée un environnement 3D ouvert dans lequel les groupements carboxyles peuvent être utilisés pour le couplage covalent de molécules (De Crescenzo et al., 2008).

L'une des méthodes d'immobilisation les plus utilisées consiste à immobiliser de façon covalente le ligand via les groupements amine disponibles sur le N-terminal et sur les chaînes latérales des résidus lysine de la protéine. C'est une méthode simple qui nécessite peu d'étapes : (i) activation des groupements carboxyles avec le mélange N-hydroxysuccinimide/1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (NHS/EDC), (ii) injection du ligand dont les amines primaires réagissent spontanément avec les esters N-hydroxysuccinimide précédemment formés pour former des liaisons covalentes et (iii) injection d'éthanolamine afin de bloquer les groupements activés n'ayant pas réagi (De Crescenzo et al., 2008). Malgré la simplicité de cette méthode, les ligands provenant d'un mélange homogène sont immobilisés de façon aléatoire, créant ainsi une surface hétérogène avec des ligands dont les cinétiques d'interaction peuvent varier. En effet, les amines couplées à la surface peuvent être proches du site de liaison de la protéine, altérant ainsi l'interaction avec l'analyte. De plus, étant donné que la bioactivité du ligand doit être préservée pour obtenir des constantes cinétiques valables, la régénération de la surface devient très complexe dans le cas d'interactions fortes. D'autres stratégies d'immobilisation covalente existent soit via le glycane des glycoprotéines (Johnsson et al., 1995) ou le groupement thiol (O'Shannessy, Brigham-Burke, & Peck, 1992). Cette dernière approche est particulièrement bien adaptée aux petits peptides étant donné qu'une cystéine peut être ajoutée à la séquence peptidique initiale au cours de la synthèse (De Crescenzo, Litowski, Hodges, & O'Connor-McCourt, 2003).

Les inconvénients de l'immobilisation covalente ont pu être surmontés par la capture du ligand via des agents de capture chimiques (acide nitrilotriacétique, NTA) ou biologiques (anticorps, protéine A) préalablement immobilisés de façon covalente sur la surface du biocapteur (De Crescenzo et al., 2008). Malgré une étape supplémentaire et l'utilisation d'un agent de capture ayant une haute affinité pour le ligand, ces méthodes permettent une immobilisation orientée du ligand (Dorion-Thibaut et al., 2014). Notons tout de même que certains agents de capture ont l'avantage d'utiliser les étiquettes exploitées lors des étapes de purification (p.ex., étiquette histidine et protéine A). Par ailleurs, contrairement au couplage amine, la capture du ligand

s'effectue dans des conditions plus douces (pH et concentrations de sels). Une telle approche permet également d'utiliser une même surface pour la capture de différents niveaux d'un même ligand ainsi que de différents ligands, tant que ces derniers présentent une affinité pour l'agent de capture. Finalement, l'étape de régénération est facilitée puisque l'analyte et le ligand doivent être éliminés à chaque fin de cycle. En effet, le ligand est capturé au même niveau au début de chaque cycle (De Crescenzo et al., 2008). L'une des méthodes de capture les plus utilisées consiste à immobiliser un anticorps anti-histidine reconnaissant une étiquette histidine présente sur le ligand (Dorion-Thibaut et al., 2014; Hayes, Frostell, et al., 2014; Hayes et al., 2017; Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009; Zeck et al., 2011). L'étape de régénération consiste à dissocier l'anticorps anti-histidine de l'étiquette histidine à partir de glycine pH 1.5. Une autre approche développée par BiacoreTM repose sur l'interaction biotine / streptavidine. Cette méthode utilise une surface de dextrane carboxyméthylé avec un simple brin d'ADN et consiste à immobiliser de la streptavidine couplée au brin d'ADN complémentaire (kit Biotin CAPture) puis d'immobiliser de façon stable et orienté le ligand biotinylé (affinité biotine / streptavidine très élevée avec $K_D \approx 10^{-14}$ M). La régénération de la surface s'effectue facilement par simple dissociation des brins d'ADN (Dorion-Thibaut et al., 2016). Cependant, cette stratégie est prohibitive d'un point de vue des coûts associés et manque de reproductibilité. Ces deux méthodes de capture sont présentées dans la Figure 4-1.

Au sein du laboratoire, une approche basée sur l'interaction superhélice ou *coiled-coil* a également été largement utilisée pour la capture orientée de ligand. Cette structure se retrouve naturellement au sein d'une protéine ou encore dans des interactions protéine-protéine. Dans notre cas, cette approche repose sur deux peptides (E5 et K5) de 5 heptades (c.-à-d., 35 acides aminés soit ~ 5 kDa) conçus *de novo* (Figure 2-16) (Chao, Bautista, Litowski, Irvin, & Hodges, 1998; Chao et al., 1996; Litowski & Hodges, 2001; Tripet et al., 1996). Ces monomères adoptent une conformation aléatoire lorsqu'ils sont isolés. En revanche, lorsqu'ils sont mis en contact, les deux peptides hétérodimérisent pour former la structure superhélice (Figure 2-16A) sous l'action d'interactions hydrophobes et électrostatiques médiées respectivement par les chaînes latérales des résidus leucine / valine et des résidus lysine / glutamate de chaque heptade (Figure 2-16B). Plus précisément, deux hélices alpha se forment spontanément et s'enroulent l'une autour de l'autre (Figure 2-16A). Les interactions électrostatiques sont responsables de la spécificité de l'interaction, évitant l'homodimérisation des peptides. Avec une manipulation rationnelle du contenu de ces peptides, il

est possible de moduler finement des propriétés telles que la constante thermodynamique de dissociation K_D (Murschel, Fortier, Jolicoeur, Hodges, & De Crescenzo, 2017). Dans le cadre de la SPR, le système E5/K5 présentent plusieurs avantages : (i) une immobilisation orientée sans intermédiaire de capture (c.-à-d., immobilisation covalente d'un peptide à la surface du biocapteur et greffage du second peptide sur le ligand), (ii) une possibilité d'immobiliser des protéines biotinylées (voir Figure 4-1), (iii) une immobilisation stable et (iv) facilement régénérable via l'utilisation d'un agent chaotrope (ici, le chlorure de guanidium 6 M) permettant la dénaturation des peptides en interférant sur les interactions non covalentes.

Comme mentionné précédemment, le système E5/K5 a été largement utilisé pour dimériser ou capturer des protéines de manière stable et orientée sur diverses surfaces pour diverses applications biotechnologiques et biomédicales. Au sein de notre laboratoire, ce système a été appliqué à la biodétection (De Crescenzo, Pham, Durocher, & D O'Connor-McCourt, 2003), au développement de *Western blot* et d'ELISA (Boucher, St-Laurent, Jolicoeur, De Crescenzo, & Durocher, 2010; Liberelle et al., 2010), au ciblage de nanoparticules (Fortier, De Crescenzo, & Durocher, 2013), à la conception d'inhibiteur (De Crescenzo, Pham, Durocher, Chao, & O'Connor-McCourt, 2004) ainsi qu'à la culture cellulaire et au génie tissulaire (Boucher, Ruiz, et al., 2010; Murschel et al., 2013; Murschel, Zaimi, Noel, Jolicoeur, & De Crescenzo, 2015).

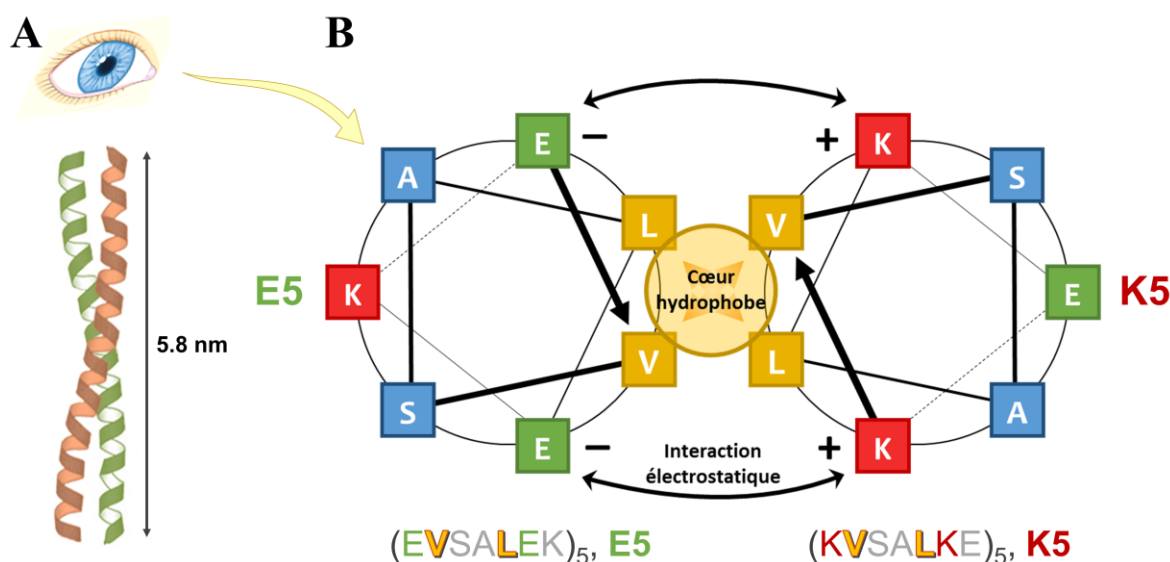


Figure 2-16 : (A) Représentation schématique de l'interaction superhélice ou *coiled-coil* et (B) d'une heptade hétérodimère du tandem peptidique E5/K5 en coupe transversale. Figure adaptée de (De Crescenzo, Litowski, et al., 2003).

2.4.1.2 Mesure de l'affinité des anticorps avec les récepteurs Fcγ

De nombreuses études ont utilisé un biocapteur SPR afin de mesurer les cinétiques d'interaction entre les IgG et les FcγR (constantes cinétiques k_{on} et k_{off} et/ou les constantes thermodynamiques K_A et K_D). Ces constantes ont permis de déterminer l'impact de la modification des anticorps (acide aminé et glycosylation) sur leurs interactions avec les FcγR.

Le Tableau 2-12 rassemble les études sur l'interaction IgG / FcγR et permet de constater la disparité des affinités obtenues. Celle-ci est largement liée à des conditions opératoires différentes et parfois non adaptées. Ces études ont employé des méthodes d'immobilisation ainsi que des récepteurs différents. En effet, certaines études ont utilisé l'immobilisation par les amines (Ferrara, Stuart, Sondermann, Brunker, & Umana, 2006) tandis que d'autres ont capturé le ligand via un anticorps anti-histidine (Hayes, Frostell, et al., 2014). Comme mentionné précédemment, la méthode d'immobilisation du ligand est un paramètre essentiel. Par conséquent, l'utilisation de différentes approches d'immobilisation conduira inéluctablement à une variation des constantes cinétiques et thermodynamiques. Une étude réalisée par notre groupe a permis de démontrer l'influence de la méthode d'immobilisation (aléatoire vs orientée) du FcγRIIIa_{F158} sur les affinités calculées avec le trastuzumab (Dorion-Thibaudeau et al., 2014). L'étude conclut que les méthodes d'immobilisation aléatoire et avec un anticorps anti-histidine ne sont pas adaptées pour la mesure de l'interaction IgG / FcγR. En effet, la capture par un anticorps anti-histidine présente un artefact à la fin de la phase d'injection de l'analyte (Dorion-Thibaudeau et al., 2014). Afin de surmonter ces limitations, Dorion-Thibaudeau et collègues ont développé des récepteurs biotinylés afin d'utiliser le kit BiacoreTM pour l'immobilisation de protéines biotinylées (Dorion-Thibaudeau et al., 2016). D'autres paramètres comme la méthode de calcul des constantes, le modèle cinétique, le choix du ligand/analyte, le biocapteur SPR sont autant de causes expliquant cette disparité (Tableau 2-12).

Tableau 2-12 : Affinités de l'interaction IgG / FcγR mesurées par SPR.

Récepteur	Étiquette	Ligand	Analyte	Immobilisation	K_D (nM)	Calcul de l'affinité	Instrument	Références
FcγRIIIa F158	-	IgG1		Amine	5000	Plateau	Biacore 3000	(Ferrara, Stuart, et al., 2006)
	His		IgG1	Anticorps anti-His	533	Plateau	BiacoreT100	(Kanda et al., 2006)
	-	IgG1		Protéine A	1000	Modèle 1:1	Biacore 3000	(Richards et al., 2008)
	-		IgG1	Amine	855	Plateau	Biacore 2000	(Bruhns et al., 2009)
	His		IgG1	Anticorps anti-His	279	Plateau	BiacoreT100	(Shibata-Koyama, Iida, Misaka, et al., 2009)
	-	IgG1		Anticorps	13.1	Plateau	BiacoreT100	(Ha et al., 2011)
	-	IgG1		Anticorps	554	Plateau	BiacoreT100	(Zhang, N. et al., 2011)
	-		IgG1	Amine	1590	Plateau	BiacoreT100	(Dorion-Thibaudeau et al., 2014)
	His		IgG1	Anticorps anti-His	1970	Plateau	BiacoreT100	
	His		IgG1	Anticorps anti-His	-	Modèle 1:1	BiacoreT200	(Hayes, Frostell, et al., 2014)
	Biotine		IgG1	Streptavidine	2290	Plateau	BiacoreT100	(Dorion-Thibaudeau et al., 2016)
	Biotine		IgG1	Streptavidine	1300	Modèle 1:1	IBIS MX96	(Dekkers et al., 2017)
	-	IgG1		Protéine A	2710	Modèle 1:1	BiacoreT200	(Li, T. et al., 2017)
FcγRIIIa V158	Ecoil		IgG1	Kcoil	4015	Plateau	BiacoreT100	(Cambay et al., 2019)
	His		IgG1	Anticorps anti-His	208	Modèle 1:1	Biacore 2000	(Okazaki et al., 2004)
	-	IgG1		Amine	750	Plateau	Biacore 3000	(Ferrara, Stuart, et al., 2006)
	His		IgG1	Anticorps anti-His	129.5	Plateau	BiacoreT100	(Kanda et al., 2006)
	-		IgG1	Amine	244	Modèle 1:1	Biacore 2000	(Yamaguchi et al., 2006)
	-		IgG1	Anticorps anti-FcγRIIIa	710	Modèle 1:1	Biacore 1000	(Li, P. et al., 2007)
	-	IgG1		Protéine A	200	Modèle 1:1	Biacore 3000	(Chu et al., 2008)
	-	IgG1		Protéine A	280	Modèle 1:1	Biacore 3000	(Richards et al., 2008)
	-		IgG1	Amine	500	Plateau	Biacore 2000	(Bruhns et al., 2009)
	His		IgG1	Anticorps anti-His	89	Plateau	BiacoreT100	(Shibata-Koyama, Iida, Misaka, et al., 2009)
	His		IgG1	Anticorps anti-His	2166	Plateau	BiacoreT100	(Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009)
	-	IgG1		Anticorps	300	Plateau	BiacoreT100	(Ferrara et al., 2011)
	-	IgG1		Anticorps	7.1	Plateau	BiacoreT100	(Ha et al., 2011)
	His		IgG1	Anticorps anti-His	-	Modèle 1:1	Biacore 3000	(Zeck et al., 2011)
	-	IgG1		Anticorps	502	Plateau	BiacoreT100	(Zhang, N. et al., 2011)
	-	IgG1-Fc		Protéine A	136	Plateau	BiacoreT100	(Zou et al., 2011)
	-	IgG1		Amine	850	Plateau	Biacore 3000	(Patel, R., Johnson, Andrien, & Tamburini, 2013)
	-		IgG1	Amine	110	Modèle 1:1	BiacoreT100	(Yu et al., 2013)
	His		IgG1	Anticorps anti-His	-	Modèle 1:1	BiacoreT200	(Hayes, Frostell, et al., 2014)
	-	IgG1-Fc		Amine	409	Plateau	BiacoreT100	(Subedi & Barb, 2016)
	Biotine		IgG1	Streptavidine	240	Modèle 1:1	IBIS MX96	(Dekkers et al., 2017)
	-	IgG1		Protéine A	131	Modèle 1:1	-	(Li, C., Zhu, Ma, & Wang, 2017)
	-	IgG1		Protéine A	114	Modèle 1:1	BiacoreT200	(Li, T. et al., 2017)
	-	IgG1		Protéine A	290	Plateau	BiacoreX100	(Tsukimura et al., 2017)
	Ecoil		IgG1	Kcoil	717	Plateau	BiacoreT100	(Cambay et al., 2019)
FcγRIIb	-		IgG1	Amine	769	-	Biacore	(Galon et al., 1997)
	-	IgG1		Amine	1570	Modèle 1:1	Biacore 2000	(Maenaka et al., 2001)
	-		IgG1	Amine	4545	Plateau	Biacore 2000	(Bruhns et al., 2009)
	His		IgG1	Anticorps anti-His	11000	Plateau	Biacore 3000	(Luo, Lu, Raso, Entrican, & Tangarone, 2009)
	His		IgG1	Anticorps anti-His	1431	Plateau	BiacoreT100	(Shibata-Koyama, Iida, Misaka, et al., 2009)
	-	IgG1		Anticorps	84	Plateau	BiacoreT100	(Ha et al., 2011)
	-	IgG1		Anticorps	774	Plateau	BiacoreT100	(Zhang, N. et al., 2011)
	-	IgG1		Amine	1900	Plateau	Biacore 3000	(Patel, R. et al., 2013)
	His		IgG1	Anticorps anti-His	3500	Plateau	BiacoreT200	(Hayes, Frostell, et al., 2014)
	-	IgG1-Fc		Amine	6250	Plateau	BiacoreT100	(Subedi & Barb, 2016)
	Biotine		IgG1	Streptavidine	2800	Modèle 1:1	IBIS MX96	(Dekkers et al., 2017)

FcγRIIa	-	IgG1		Amine	690	Modèle 1:1	Biacore 2000	(Maenaka et al., 2001)
	-	IgG1		Protéine A	850	Modèle 1:1	Biacore 3000	(Chu et al., 2008)
	-	IgG1		Protéine A	910	Modèle 1:1	Biacore 3000	(Richards et al., 2008)
	-		IgG1	Amine	286	Plateau	Biacore 2000	(Bruhns et al., 2009)
	His		IgG1	Anticorps anti-His	6000	Plateau	Biacore 3000	(Luo et al., 2009)
	-	IgG1		Anticorps	114	Plateau	BiacoreT100	(Ha et al., 2011)
	-	IgG1		Anticorps	203	Plateau	BiacoreT100	(Zhang, N. et al., 2011)
	-	IgG1		Amine	800	Plateau	Biacore 3000	(Patel, R. et al., 2013)
	His		IgG1	Anticorps anti-His	4200	Plateau	BiacoreT200	(Hayes, Frostell, et al., 2014)
	Biotine		IgG1	Streptavidine	600	Plateau	BiacoreT100	(Dorion-Thibaudeau et al., 2016)
	-	IgG1-Fc		Amine	1320	Plateau	BiacoreT100	(Subedi & Barb, 2016)
	Biotine		IgG1	Streptavidine	480	Modèle 1:1	IBIS MX96	(Dekkers et al., 2017)
FcγRIIb	-	IgG1		Protéine A	972	Modèle 1:1	BiacoreT200	(Li, T. et al., 2017)
	-	IgG1		Amine	3800	Plateau	Biacore 3000	(Mimura et al., 2001)
	-	IgG1		Amine	1670	Modèle 1:1	Biacore 2000	(Maenaka et al., 2001)
	-	IgG1		Amine	250	Modèle 1:1	Biacore 3000	(Kaneko, Nimmerjahn, & Ravetch, 2006)
	-	IgG1		Protéine A	1800	Modèle 1:1	Biacore 3000	(Chu et al., 2008)
	-	IgG1		Protéine A	2300	Modèle 1:1	Biacore 3000	(Richards et al., 2008)
	-		IgG1	Amine	8333	Plateau	Biacore 2000	(Bruhns et al., 2009)
	-	IgG1		Anticorps	260	Plateau	BiacoreT100	(Ha et al., 2011)
	-	IgG1		Anticorps	1274	Plateau	BiacoreT100	(Zhang, N. et al., 2011)
	-	IgG1-Fc		Protéine A	2100	Plateau	BiacoreT100	(Zou et al., 2011)
	-	IgG1		Amine	3100	Plateau	Biacore 3000	(Patel, R. et al., 2013)
	His		IgG1	Anticorps anti-His	6900	Plateau	BiacoreT200	(Hayes, Frostell, et al., 2014)
FcγRI	Biotine		IgG1	Streptavidine	1660	Plateau	BiacoreT100	(Dorion-Thibaudeau et al., 2016)
	-	IgG1-Fc		Amine	3740	Plateau	BiacoreT100	(Subedi & Barb, 2016)
	Biotine		IgG1	Streptavidine	2700	Modèle 1:1	IBIS MX96	(Dekkers et al., 2017)
	-	IgG1		Protéine A	1590	Modèle 1:1	BiacoreT200	(Li, T. et al., 2017)
	-	IgG1		Protéine A	0.28	Modèle 1:1	Biacore 3000	(Chu et al., 2008)
	-	IgG1		Protéine A	0.12	Modèle 1:1	Biacore 3000	(Richards et al., 2008)
	-		IgG1	Amine	15.4	Plateau	Biacore 2000	(Bruhns et al., 2009)
	His		IgG1	Anticorps anti-His	0.92	Modèle 1:1	Biacore 3000	(Luo et al., 2009)
	-	IgG1		Anticorps	0.23	Modèle 1:1	BiacoreT100	(Ha et al., 2011)
	-		IgG1	Amine	41	Modèle 1:1	Biacore 3000	(Lu et al., 2011)
	-	IgG1		Amine	20	Modèle 1:1	Biacore 3000	
	-	IgG1		Anticorps	0.2	Plateau	BiacoreT100	(Zhang, N. et al., 2011)
FcγRI	-	IgG1		Amine	0.26	Modèle 1:1	BiacoreT100	(Asaoka, Hatayama, Ide, Tsumoto, & Tomita, 2013)
	-	IgG1		Amine	0.123	Plateau	Biacore 3000	(Patel, R. et al., 2013)
	His		IgG1	Anticorps anti-His	52	Modèle 1:1	BiacoreT100	(Dorion-Thibaudeau et al., 2014)
	Biotine		IgG1	Streptavidine	0.55	Modèle 1:1	BiacoreT100	(Dorion-Thibaudeau et al., 2016)
	-	IgG1-Fc		Amine	0.48	Modèle 1:1	BiacoreT100	(Subedi & Barb, 2016)
	Biotine		IgG1	Streptavidine	3	Modèle 1:1	IBIS MX96	(Dekkers et al., 2017)

Plusieurs facteurs non répertoriés dans le Tableau 2-12 ont également un impact sur les constantes cinétiques et thermodynamiques. Dorion-Thibaut et collègues ont ainsi montré que l'agrégation de l'anticorps module les cinétiques d'interaction lorsqu'il est injecté. Plus précisément, une modification du profil cinétique a été observée avec des taux d'agrégation de l'anticorps ≥ 1.85 % (Dorion-Thibaut et al., 2014). C'est également le cas du type cellulaire utilisé pour l'expression des Fc γ R et des IgG ainsi que leur état de glycosylation. En effet, Hayes et collègues ont suggéré que la complexité du profil cinétique entre IgG et Fc γ RIIIa serait liée à l'hétérogénéité de la glycosylation de l'analyte (IgG) et du ligand (Fc γ R) (Hayes, Frostell, et al., 2014). L'influence de la glycosylation des IgG et des Fc γ R est abordée dans la suite de cette revue.

Comme abordé dans la partie 2.2.3, l'ensemble des études ayant recours à des techniques biophysiques telles que la SPR pour déterminer les constantes cinétiques et thermodynamiques de l'interaction IgG / Fc γ R ont utilisé des formes recombinantes de Fc γ R (expression en cellules CHO, HEK293 ou NS0). Or, le système physiologique n'est pas entièrement représenté et ces récepteurs recombinants ne prédisent pas adéquatement les interactions d'un anticorps thérapeutique avec les Fc γ R et les cellules du système immunitaire. En effet, les Fc γ R recombinants présentent des profils de glycosylation différents des Fc γ R du système immunitaire (Hayes et al., 2016). Ainsi, la conception et l'utilisation de Fc γ R recombinants avec des glycoprofiles physiologiquement proches des Fc γ R naturels dans des méthodes biophysiques s'avère être d'un intérêt notable pour la prédiction des effets *in vivo*.

2.4.1.3 Analyse en ligne de la qualité des anticorps

Comme expliqué précédemment, la glycosylation des IgG thérapeutiques est un CQA qui peut être fortement modifié durant le procédé de production en cellules de mammifères. Comme abordé dans la partie 2.3.4, les méthodes actuelles de caractérisation sont souvent fastidieuses et sont souvent réalisées à la fin de la culture quand l'IgG a déjà été synthétisée. Par conséquent, un suivi et un contrôle en ligne (c.-à-d. durant la culture) est essentiel. Cependant, étant donné la complexité d'une telle mesure, très peu d'approches ont été développées.

Très récemment, Li et collègues ont exploré et validé le potentiel d'une approche basée sur la spectroscopie Raman pour l'analyse en temps réel de la concentration des IgG et de leur macrohétérogénéité (c.-à-d. le taux d'occupation des sites de N-glycosylation) durant des cultures en cellules CHO en bioréacteur (Li, M. Y. et al., 2018). Ce même groupe a également exploré une

méthode basée sur la spectroscopie diélectrique pour l'estimation en ligne de μ (taux de croissance spécifique à la cellule) (Li, M. Y. et al., 2019). Ceci a permis la détection rapide du moment critique où μ diminue drastiquement et la mise en place d'une stratégie de renouvellement de milieu menant à un maintien de μ autour de sa valeur maximale. Avec cette approche, une meilleure performance du procédé a été obtenue que ce soit en termes de quantité et de qualité (occupation des sites de N-glycosylation).

D'autres approches de mesure en ligne basées sur la SPR ont également été développées pour la mesure en ligne de la concentration de protéines et du profil de glycosylation des IgG. Jacquemart et collègues ont ainsi développé une approche SPR permettant la mesure en ligne de la concentration et de la bioactivité de la MP-RIIIE-D-E, une protéine chimérique fusionnée avec un peptide E5. Cette méthode permet le prélèvement et la clarification du milieu de culture d'un bioréacteur (colonne de décantation suivi d'une étape de filtration) puis l'analyse du surnageant clarifié par SPR. Plus précisément, le surnageant est injecté sur une surface sur laquelle a été immobilisé de façon covalente le peptide K5, permettant ainsi la mesure de la concentration de l'échantillon. Une fois la protéine chimérique immobilisée, un anticorps présentant une spécificité pour une partie de la protéine était injecté permettant l'évaluation de sa bioactivité (Jacquemart et al., 2008). Plus tard, Chavane et collègues ont utilisé la même configuration pour mesurer en ligne la concentration d'anticorps (Chavane, Jacquemart, Hoemann, Jolicoeur, & De Crescenzo, 2008). Cependant, dans leur cas, les surnageants clarifiés contenant l'anticorps ont été analysés par SPR avec une surface sur laquelle l'antigène de l'anticorps était immobilisé de façon covalente. Par rapport à la méthode précédente, l'approche développée par Chavane et collègues permet la mesure de la concentration des anticorps bioactifs uniquement et ne nécessite pas l'ajout d'une étiquette sur la protéine d'intérêt (Chavane et al., 2008; Jacquemart et al., 2008).

Plus récemment, Dorion-Thibaudeau et collègues ont montré le potentiel de la SPR et des Fc γ R pour la mesure de paramètres tels que le taux d'agrégation (Dorion-Thibaudeau et al., 2014) ou encore la concentration et la bioactivité des anticorps à partir d'un surnageant (Dorion-Thibaudeau, Durocher, & De Crescenzo, 2017). Dans cette dernière étude, les surnageants clarifiés ont été injectés sur une surface saturée de Fc γ RI, permettant ainsi la mesure de la concentration des échantillons par rapport à une courbe étalon. Puis, l'injection de concentrations croissantes de Her2 (c.-à-d., l'antigène spécifique du Trastuzumab) sur les IgG immobilisées permettait d'évaluer la bioactivité.

Malgré l'utilisation intensive de la SPR pour la mesure en ligne de la concentration et de la bioactivité des IgG, peu de publications montrent l'application de cette approche pour la caractérisation des profils de glycosylation. Geuijen et collègues ont tout de même rapporté le développement d'une approche SPR pour la quantification du niveau de sialylation de l'EPO à l'aide de 22 lectines immobilisées à la surface du biocapteur (Geuijen et al., 2015). Concernant les anticorps, plusieurs études ont démontré que l'utilisation de la SPR associée à l'immobilisation des FcγR permettait d'obtenir des profils d'interaction différents selon les structures glycaniques présentes (Hayes et al., 2017; Zeck et al., 2011) ou avec des anticorps déglycosylés (Dorion-Thibaudeau et al., 2014; Hayes, Frostell, et al., 2014). Cependant, seuls Dorion-Thibaudeau et collègues ont amorcé le développement d'une méthode de discrimination des profils de glycosylation des anticorps basée sur la SPR et l'immobilisation des FcγRIIIa (Dorion-Thibaudeau et al., 2014). Leurs travaux ont permis l'optimisation de l'immobilisation des FcγR grâce à leur biotinylation couplée à l'utilisation du kit biotine/streptavidine de Biacore™. La caractérisation de la glycosylation de deux lots de trastuzumab avec des profils de glycosylation enrichis (G0F et G2F) a également été réalisée (Dorion-Thibaudeau et al., 2016). Cependant, comme expliqué précédemment, la méthode d'immobilisation reste à optimiser puisqu'elle est inappropriée pour une utilisation routinière. De plus, cette méthode n'a été testée qu'avec des anticorps purifiés. En effet, les surnageants clarifiés présentent une composition plus complexe pouvant influencer les profils cinétiques.

2.4.2 Impact de la N-glycosylation de la région Fc de l'IgG

La N-glycosylation a un impact critique sur la région Fc des IgG en affectant à la fois sa stabilité, ses propriétés pharmacocinétiques et sa structure quaternaire (Houde, Peng, Berkowitz, & Engen, 2010; Vidarsson et al., 2014). Comme expliqué précédemment, la N-glycosylation joue également un rôle direct dans l'interaction avec les FcγR comme c'est le cas pour l'interaction glycane-glycane avec le FcγRIIIa (Ferrara et al., 2011; Mizushima et al., 2011). Ainsi, étant donné ses implications, la N-glycosylation de la région Fc possède une influence majeure sur la fonction biologique de l'anticorps et sur son habilité à initier les fonctions effectrices.

2.4.2.1 Sur les propriétés des anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux possèdent des N-glycanes ayant une taille limitée, avec le plus souvent une structure complexe bi-antennaire et un taux de sialylation très faible. Ceci peut être expliqué par l'enfouissement du site de glycosylation du domaine C_{H2} dans la structure de la protéine (Higel, Seidl, Sörgel, & Friess, 2016). Plus précisément, le bras $\alpha(1,6)$ s'étend le long de la face hydrophobe du domaine C_{H2} et interagit de façon non covalente avec les acides aminés hydrophobes. Le bras $\alpha(1,3)$, pour sa part, n'interagit pas avec la surface de la protéine et s'étend vers l'espace interstitiel situé entre les deux domaines C_{H2} créant une structure tridimensionnelle en fer à cheval (Arnold, Wormald, Sim, Rudd, & Dwek, 2007). Ceci mène à des différences pour les deux bras au niveau de l'accessibilité et de la flexibilité pour la sialyltransférase (Barb et al., 2012).

Les multiples interactions non-covalentes entre les N-glycanes et la protéine impliquent une influence réciproque sur la conformation de chacun (Mimura et al., 2000). Par exemple, la structure GlcNAc₂Man₃GlcNAc prend part à 38 liens non-covalents avec le domaine C_{H2}. Ces interactions permettent la stabilisation de la région Fc et aident à maintenir la structure quaternaire (Arnold et al., 2007). Ainsi, la modification des motifs des N-glycanes affecte la stabilité thermique des domaines C_{H2} avec une réduction progressive de la stabilité corrélée à une diminution des sucres et à une perte des interactions glycane-protéine (Mimura et al., 2000; Zheng, Yarmarkovich, Bantog, Bayer, & Patapoff, 2014). D'ailleurs, de nombreuses études montrent que la déglycosylation de la région Fc mène à une perte de la stabilité du domaine C_{H2} (Higel et al., 2016; Hristodorov, Fischer, & Linden, 2013; Zheng, Bantog, & Bayer, 2011; Zheng et al., 2014).

Les N-glycanes jouent également un rôle dans la conformation des domaines C_{H2} et plus particulièrement dans leur degré d'ouverture. Ainsi, l'écart entre les domaines C_{H2} diminue avec des N-glycanes tronqués ou absents (Frank, Walker, Lanzilotta, Prestegard, & Barb, 2014; Krapp, Mimura, Jefferis, Huber, & Sondermann, 2003). Cependant, dans le cas d'IgG déglycosylées, des études plus récentes ont montré l'apparition de trois types de conformation : ouverte, semi-ouverte et fermée (Zhang, Y., 2015). À l'opposé, la présence de N-glycanes de grande taille favorise une conformation « ouverte » permettant l'interaction avec les FcγR (Krapp et al., 2003). D'après Houde et collègues, seule la galactosylation possède un impact majeur par rapport à la fucosylation qui n'en a aucune (Houde et al., 2010). Encore une fois, des études récentes critiquent le concept

de conformation unique des IgG glycosylées et supposent une dynamique de la conformation des domaines C_{H2}, avec une multitude de conformères reconnaissant les ligands individuellement (Frank et al., 2014; Jefferis, 2005). L'ouverture de ces conformères augmenterait avec la longueur du glycane et plus précisément avec les résidus de galactose et d'acide sialique (Frank et al., 2014).

Les IgG sont donc des molécules présentant trois degrés de flexibilité. Tout d'abord, leur partie charnière permet le mouvement des régions Fab par rapport à la région Fc. Ensuite, la taille des N-glycanes et leurs interactions avec la surface de la protéine permettent le changement de conformation des domaines C_{H2}. Finalement, des études récentes ont montré que les deux branches des N-glycanes sont également mobiles et présentent des mouvements importants à des températures physiologiques. D'un côté, le bras $\alpha(1,3)$ présente un seul état hautement mobile tandis que le bras $\alpha(1,6)$ expose à la fois un état dominant hautement mobile et un état minoritaire de liaison avec la protéine (Barb et al., 2012).

En plus de son rôle structural, la N-glycosylation de la région Fc influence les propriétés pharmacocinétiques des IgG en telles que le temps de demi-vie de la protéine dans la circulation (Liu, L., 2015). Deux types de récepteurs sont impliqués dans l'élimination des IgG. D'un côté, les récepteurs du mannose, présents à la surface des cellules immunitaires, reconnaissent les glycoprotéines présentant des résidus mannose et GlcNAc. De l'autre, les glycoprotéines exposant une galactosylation terminale accessible sont éliminées par les récepteurs des asialoglycoprotéines exprimés dans le foie (Higel et al., 2016). Ce mécanisme de vieillissement et de renouvellement des glycoprotéines est permis par l'élimination séquentielle des monosaccharides par les glycosidases endogènes (Yang, W. H. et al., 2015). De nombreuses études ont démontré que les structures oligomannosidiques et hybrides présentent un temps de demi-vie plus court (Goetze et al., 2011; Kanda et al., 2006) même si certaines études récentes tendent à relativiser ces conclusions (Liu, Y. D. & Flynn, 2016; Yang, J. et al., 2015). Concernant les anticorps déglycosylés, une étude préliminaire concluait que la déglycosylation menait à une élimination plus rapide (Wawrzynczak, Cumber, Parnell, Jones, & Winter, 1992). Cependant, certaines études montrent que les IgG glycosylées et déglycosylées présentent des pharmacocinétiques similaires, suggérant que le facteur primaire de la pharmacocinétique des IgG (le recyclage par le FcRn) n'est pas affecté par la N-glycosylation (Hristodorov et al., 2013; Liu, L., 2015).

Finalement, la N-glycosylation augmente la résistance à la protéolyse en stabilisant l'IgG contre les protéases et permet la diminution de l'agrégation. En effet, les anticorps déglycosylés et avec des structures oligomannosidiques présentent une plus faible stabilité thermique pour le domaine C_H2 (Zheng et al., 2011; Zheng et al., 2014). De plus, les anticorps déglycosylés sont plus sensibles à l'agrégation (Kayser et al., 2011; Zheng et al., 2011) et à l'action de protéases telles que la papaïne, la trypsine et chymotrypsine (Hristodorov et al., 2013; Zheng et al., 2011; Zheng et al., 2014). D'ailleurs la sensibilité à la papaïne dépend également des résidus de sucres terminaux sur les N-glycanes (Hristodorov et al., 2013). Récemment, Wada et collègues ont montré que, contrairement à la galactosylation terminale, la défucosylation et un niveau élevé de sialylation terminale diminuait également la stabilité thermique du domaine C_H2 et accélérerait la vitesse d'agrégation (Wada et al., 2019).

2.4.2.2 Sur l'interaction avec les récepteurs Fcγ et les fonctions effectrices

Suite aux études liées à l'impact de la N-glycosylation sur la structure de la région Fc de l'IgG, de nombreuses recherches ont été réalisées afin de définir les impacts de la variation des structures oligosaccharidiques sur les interactions avec les récepteurs Fc (FcγR, FcRn et C1q) et *a fortiori* sur les fonctions effectrices (ADCC et la CDC) (Spearman et al., 2011). Les résultats de ces études ont été rassemblés dans le Tableau annexe A - 1.

Pour résumé, la N-glycosylation est nécessaire pour l'interaction avec les récepteurs Fc et l'activation des fonctions effectrices. Ensuite, selon la présence ou non de certains monosaccharides, les effets sur les interactions et les fonctions effectrices varient. L'un des effets les plus étudiés est l'influence positive de l'absence de α1,6-fucose sur l'interaction avec le FcγRIIIa et l'ADCC, permise selon certaines études par l'interaction glycane-glycane entre le glycane sur l'Asn-297 de la région Fc de l'IgG et le glycane sur l'Asn-162 du FcγRIIIa (Ferrara et al., 2011; Mizushima et al., 2011; Shields et al., 2002; Shinkawa et al., 2003). Les effets des autres monosaccharides tels que le galactose et de l'acide sialique et le GlcNAc bissecteur restent ambigus au vu des divergences de conclusion de certaines études. Comme mentionné précédemment, une telle variabilité est majoritairement attribuable à des conditions opératoires variables, l'hétérogénéité des glycoformes d'IgG ainsi que dans certains cas à un manque de caractérisation de la glycosylation des IgG. Brièvement, plusieurs études rapportent que les différences dans les niveaux de galactosylation terminale ne sont pas corrélées à une augmentation de l'activité ADCC

(Boyd et al., 1995; Shinkawa et al., 2003) alors que d'autres études décrivent un impact positif (Dekkers et al., 2017; Thomann et al., 2015; Wada et al., 2019). Récemment, plusieurs études ont montré que la galactosylation terminale influence positivement l'affinité entre l'IgG et les FcγR de faible affinité et plus particulièrement FcγRIIIa (Dashivets et al., 2015; Dekkers et al., 2017; Dorion-Thibaudeau et al., 2016; Subedi & Barb, 2016; Thomann et al., 2015; Wada et al., 2019; Yamaguchi et al., 2006). La plus grande ambiguïté concerne l'impact de la sialylation terminale puisque d'un côté, il a été démontré qu'elle confère des propriétés anti-inflammatoires aux IVIg (Anthony et al., 2008; Kaneko et al., 2006) et qu'elle réduit l'affinité pour le FcγRIIIa et conséquemment l'induction de ADCC (Dekkers et al., 2017; Li, T. et al., 2017). Plusieurs études ont également observé l'influence négative de la sialylation sur l'interaction avec le FcγRIIIa (Naso et al., 2010; Scallon et al., 2007; Wada et al., 2019). Au contraire, d'autres études ont démontré que l'activité anti-inflammatoire des IVIg est indépendante de la sialylation (Campbell et al., 2014) et que l'α2,6-sialylation ne présente aucune influence significative sur l'interaction IgG / FcγRIIIa par rapport à la galactosylation terminale (Dashivets et al., 2015; Peipp et al., 2008; Shivatare et al., 2018; Subedi & Barb, 2016; Thomann et al., 2015).

Concernant l'activation de la CDC, plusieurs études ont récemment montré une influence positive de la galactosylation et la sialylation terminales (Dekkers et al., 2017; Hodoniczky et al., 2005; Peschke et al., 2017; Wada et al., 2019).

2.4.3 Impact de la N-glycosylation des récepteurs Fcγ

En parallèle de l'impact de la glycosylation des IgG1 sur leurs interactions avec les FcγR, des études pionnières ont mis en évidence une complexité supplémentaire liée aux N-glycanes des FcγR, que ce soit au travers de leur macrohétérogénéité ou de leur microhétérogénéité. Cette complexité concerne principalement les deux variants du FcγRIIIa (F158 et V158) puisqu'aucune étude n'a encore montré une influence des N-glycanes des FcγRIIIb, FcγRIIa/b et FcγRI sur leurs interactions avec les IgG. Par ailleurs, peu d'études se sont consacrées à l'analyse conjointe de la macrohétérogénéité et de la microhétérogénéité. Enfin, des divergences ont été observées sur l'influence de certains glycanes sur l'interaction avec les glycoformes d'IgG et sont rapportées dans le Table 6-1.

Concernant la macrohétérogénéité, plusieurs études se sont concentrées sur l'impact respectifs des glycanes du FcγRIIIa. Ces études ont ainsi mis en évidence l'influence de glycanes

du Fc γ RIIIa sur son interaction avec l'IgG1 en éliminant séquentiellement les sites de glycosylation du récepteur (Ferrara, Stuart, et al., 2006; Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009). Ces travaux ont permis de démontrer une diminution de plus d'un ordre de grandeur de l'affinité des IgG1 afucosylées pour le Fc γ RIIIa sans glycane au résidu Asn-162 (N162). Initialement, deux études indépendantes ont montré que le glycane au résidu N162 du Fc γ RIIIa est impliquée dans une interaction glycane-glycane avec le glycane au résidu N297 de la région Fc de l'IgG (Ferrara et al., 2011; Mizushima et al., 2011). Ces interactions combinées à des interactions glycanes-protéines et protéines-protéines seraient responsables de la forte affinité entre l'IgG1 afucosylée et le Fc γ RIIIa. Selon ces études, l'absence du fucose sur les glycanes de la région Fc des IgG réduirait la gêne stérique. Cependant, une étude récente propose un autre mécanisme sans interactions intermoléculaires avec la région Fc de l'IgG1 (Falconer et al., 2018). Brièvement, le fucose du N-glycane de la région Fc de l'IgG limiterait les conformations échantillonnées par le glycane à la position N162 du Fc γ RIIIa et inhiberait partiellement la liaison avec le Fc γ RIIIa. Concernant les autres glycanes, Shibata-Koyama et collègues ont démontré que le N-glycane présent sur le résidu N45 possède un rôle inhibiteur puisque sa suppression favorise l'interaction IgG afucosylée / Fc γ RIIIa (Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009). Cette inhibition pourrait être due à la gêne stérique du N-glycane en position N45 avec la chaîne B (celle n'interagissant pas avec le récepteur) de la région Fc (Hanson & Barb, 2015). Les trois autres glycanes du Fc γ RIIIa (N38, N74 et N169) n'ont montré aucune influence sur l'interaction avec l'IgG. Finalement, Hayes et collègues ont observé que la déglycosylation des deux variants du Fc γ RIIIa mène à une augmentation du taux de dissociation des anticorps et à un profil cinétique plus simple et monophasique (Hayes, Frostell, et al., 2014). Cette même étude a également montré que la déglycosylation du Fc γ RI mène à une diminution de 50 % du taux de liaison.

Concernant la microhétérogénéité, des études ont montré que les variations de la glycosylation résultant de l'expression des Fc γ R dans différents types cellulaires mènent à des cinétiques d'interaction différentes (Cambay et al., 2019; Hayes et al., 2017; Zeck et al., 2011). Ainsi, le Fc γ RIIIa produit dans les cellules HEK-293 présente une dissociation plus lente que celui exprimé dans les cellules CHO. Hayes et collègues ont suggéré que les glycanes tétra-antennaires et/ou les glycanes sialylés obtenus avec les cellules CHO influencent négativement la liaison avec l'IgG (Hayes et al., 2017). Plusieurs autres études ont démontré que le Fc γ RIIIa avec des structures

oligomannosidiques présente une affinité plus élevée pour l'IgG1 (Edberg et al., 1990; Falconer et al., 2018; Ferrara et al., 2011).

Finalement, une étude très récente a combiné la substitution de sites de N-glycosylation et la modification du profil des N-glycanes du Fc γ RIIIa (Subedi & Barb, 2018). L'influence des glycanes aux résidus N45 et N162 sur l'interaction avec des Fc (fucosylés ou afucosylés) a été analysée en les comparant aux interactions obtenues avec le Fc γ RIIIa non muté. En parallèle, les glycanes de type complexe ou Man5 ont été comparés que ce soit pour les récepteurs mutés et non mutés. Ces travaux ont d'abord démontré que les glycanes aux résidus N162 et N45 sont essentiels pour l'interaction de haute affinité avec les IgG1 afucosylées puisque leur élimination réduit fortement l'affinité. Ces résultats contrastent avec l'impact négatif du glycanes au résidu N45 du Fc γ RIIIa suggéré par Shibata-Koyama et collègues (Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009). Concernant l'effet du Man5, comparé à une structure glycanique complexe, Subedi et collègues ont montré que le Fc γ RIIIa avec une structure oligomannosidique possède une affinité 10 à 50 fois plus élevée selon le glycoforme d'IgG et suggère que le glycanes au résidu N162 est impliqué. L'effet positif de la structure oligomannosidique est en accord avec les études citées précédemment (Edberg et al., 1990; Falconer et al., 2018; Ferrara et al., 2011) même si l'augmentation de l'affinité suggérée est beaucoup plus élevée. Par ailleurs, les effets respectifs des structures glycaniques complexes et oligomannosidiques sont en contradiction dans cette étude. Les détails de ces contradictions sont discutés dans le Chapitre 6 et résumés dans le Table 6-1. Bien qu'il soit possible qu'une partie de leurs résultats contradictoires puissent être dus à la différence de profil des glycanes du Fc γ RIIIa, il est plus probable que leurs résultats soient biaisés par l'utilisation de valeurs de K_D provenant d'une étude précédente (interactions faisant intervenir le Fc γ RIIIa non muté avec structure glycanique complexe) (Subedi & Barb, 2016). Il est critique que la comparaison des valeurs d'affinité s'effectue avec des valeurs obtenues sur la même surface, en particulier lorsque le ligand (ici, l'IgG-Fc) est immobilisé de manière covalente sur la surface du capteur. En effet, cette méthode d'immobilisation non optimale conduit à une capture hétérogène. Par conséquent, chaque surface d'IgG-Fc sera différente (Dorion-Thibaut et al., 2014; Myszk, 1999). Cette hypothèse est soutenue par leur affinité de l'interaction Fc γ RIIIa-N162Q / Fc afucosylée qui n'a montré aucune diminution, ce qui contraste avec plusieurs études (Ferrara, Stuart, et al., 2006; Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009). Ainsi, si les valeurs de K_D de Fc γ RIIIa pour les glycanes de type complexe ne sont pas pertinentes et s'avèrent trop élevées, alors

les différences proposées entre les glycanes complexes et Man5 sont très probablement surestimées.

Toutes ces études valident l'hypothèse proposée par Edberg et collègues selon laquelle la réponse des anticorps médiée par les Fc γ R serait réglée par le glycome spécifique de la cellule. En effet, plusieurs de leurs travaux ont montré que les glycoformes de Fc γ RIIIa varient selon le type cellulaire (macrophage vs monocyte) et que ces différences mènent à des affinités différentes pour les IgG ainsi qu'à des réponses différentes suite au stimulus d'IgG (Edberg et al., 1990; Edberg & Kimberly, 1997; Kimberly et al., 1989). D'ailleurs, Hayes et collègues ont soulevé la nécessité de déterminer les formes naturelles des glycanes des Fc γ R sur chaque cellule immunitaire ainsi que dans des états sains et pathologiques. Ceci permettrait de comprendre comment le système immunitaire utilise les N-glycanes des Fc γ R comme mécanisme pour moduler finement la réponse immunitaire liée aux anticorps (Hayes et al., 2016). En effet, l'activation du système immunitaire pourrait induire l'expression de Fc γ R possédant une affinité optimisée avec des altérations de la glycosylation. Cela a des implications importantes dans le cadre des anticorps monoclonaux thérapeutiques puisque leurs réponses peuvent varier selon la glycosylation des récepteurs. D'ailleurs, dans ce contexte, l'utilisation dans les évaluations biophysiques de formes recombinantes des Fc γ R avec des glycoprofiles similaires aux Fc γ R naturels permettrait d'obtenir des données cinétiques et ultimement des prévisions des résultats physiologiques des anticorps plus précises (Hayes et al., 2016).

•

CHAPITRE 3 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL

Les IgG1 et l'influence critique de leurs N-glycanes sur l'interaction avec les FcγR, sur les fonctions effectrices et *in fine* sur l'efficacité thérapeutique des AcM ont été mises en contexte. Nous avons également présenté les diverses technologies utilisées au cours de ce projet : la résonance des plasmons de surface et l'interaction superhélice EK. Nous nous sommes attardés sur la SPR puisqu'il s'agit de la méthode la plus largement utilisée pour la mesure des interactions IgG/FcγR. Particulièrement, nous avons démontré que la divergence des procédés opératoires a mené à une ambiguïté concernant l'influence de glycoformes d'IgG1 sur leurs interactions avec les FcγR. Finalement, nous avons montré l'engouement croissant pour la N-glycosylation des FcγR et son influence complexe sur leurs interactions avec les IgG1. Cependant, nous avons pu constater qu'une majorité étudie indépendamment la macrohétérogénéité et la microhétérogénéité, ne permettant pas une compréhension globale de l'influence de la N-glycosylation des FcγR.

À la suite de cette revue, plusieurs chapitres sont consacrés à la présentation des travaux expérimentaux que nous avons conçus, réalisés, analysés et discutés. Dans un premier temps, le **Chapitre 4** présente le développement d'une approche d'immobilisation des FcγR à la surface du biocapteur SPR. Plusieurs études ont été préalablement réalisées au sein de notre laboratoire sur les différentes méthodes d'immobilisation des FcγR utilisées dans les études d'interaction entre FcγR et glycoformes d'IgG1. Les résultats de ces travaux ont montré que l'ensemble des méthodes existantes présentaient des inconvénients ne permettant pas une évaluation rigoureuse et sensible de l'influence des N-glycanes d'IgG1. Dans ce contexte, nous avons développé une méthode d'immobilisation des FcγR basée sur l'interaction superhélice EK, une expertise de notre laboratoire. Plus précisément, les FcγR ont été étiquetés avec le peptide E5 pour les immobiliser de façon stable et orientée sur une surface de K5, préalablement immobilisé de façon covalente à la surface du biocapteur. Nous avons pu démontrer que cette nouvelle méthode d'immobilisation des FcγR surpasse toutes les autres méthodes d'immobilisation et permet la mesure de l'impact de la N-glycosylation des IgG1 et des FcγR sur leurs interactions. Ces travaux ont été publiés dans la revue *mAbs* en mars 2019. Les résultats concluants obtenus avec cette nouvelle méthode d'immobilisation des FcγR nous ont permis d'atteindre notre objectif (i) et ont mené à deux autres études dédiées aux objectifs (ii) et (iii).

La seconde étude est présentée dans le **Chapitre 5** et l'**Annexe B**. Elle porte sur l'évaluation de l'influence de la N-glycosylation d'une IgG1 sur son interaction avec les FcγR. Plus précisément nous avons évalué l'impact de la fucosylation, de la galactosylation et de la sialylation d'une IgG1 sur son interaction avec les FcγR et sur l'ADCC. Nous avons généré un panel de dix glycoformes d'IgG1 par coexpression d'enzyme combinée à un remodelage *in vitro* puis nous avons réalisé une fine caractérisation. Nous avons utilisé notre essai pour l'analyse cinétique tandis qu'un essai cellulaire nous a permis d'évaluer l'ADCC. Nous avons démontré que les glycoprofiles de l'IgG1 influencent différemment l'affinité pour les FcγR et l'ADCC. Plus précisément, nous avons observé une influence positive de l'afucosylation et de la galactosylation terminale au contraire de la sialylation terminale. Ces travaux ont fait l'objet d'un article scientifique soumis dans le journal *Scientific Reports* en juin 2019 et permettent de valider l'objectif (ii).

La dernière étude, présentée dans le **Chapitre 6** et l'**Annexe C**, rapporte les travaux sur l'évaluation de l'influence de la N-glycosylation des FcγR et se divise en deux volets : influence de la macrohétérogénéité puis de la microhétérogénéité des FcγR. Pour cette étude, nous avons utilisé l'essai SPR basé sur notre méthode d'immobilisation des FcγR et l'influence de la N-glycosylation des FcγR a été évaluée sur plusieurs glycoformes d'IgG1. Pour l'analyse de la macrohétérogénéité, nous avons muté les sites de N-glycosylation des FcγR par mutagenèse dirigée afin de définir précisément l'impact de chaque glycane. Les analyses cinétiques nous ont permis de démontrer que seul le FcγRIIIa possède des glycanes ayant une influence significative sur l'interaction avec les glycoformes d'IgG1 (N162 et N45). Dans une seconde partie, nous avons modifié la glycosylation des FcγR non mutés et des mutants de FcγRIIIa_{V158} ne possédant qu'un seul site de N-glycosylation à l'aide d'inhibiteurs ou par remodelage *in vitro*. Ceci nous a permis d'étudier la microhétérogénéité de chaque site du FcγRIIIa et d'observer que le FcγRIIIa a une affinité plus élevée pour les glycoformes d'IgG1 lorsque le glycane à la position N162 possède une structure oligomannosidique. Ces travaux font l'objet d'un article soumis dans le journal *Molecular Immunology* en décembre 2019 et permettent de valider l'objectif (iii).

À la suite de ces travaux expérimentaux, le **Chapitre 7** et le **Chapitre 8** présentent respectivement la discussion générale et les conclusions et recommandations de ce projet.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1: IMPACT OF N-GLYCOSYLATION ON FCY RECEPTOR / IGG INTERACTIONS: UNRAVELLING DIFFERENCES WITH AN ENHANCED SURFACE PLASMON RESONANCE BIOSENSOR ASSAY BASED ON COILED-COIL INTERACTIONS

4.1 Article presentation

Dans cette section est repris l'article intitulé *Impact of N-glycosylation on Fcγ receptor / IgG interactions: unravelling differences with an enhanced surface plasmon resonance biosensor assay based on coiled-coil interactions*, qui a été publié dans le journal *mAbs* (Volume 11, Issue 3, p. 435-452) en Mars 2019.

La résonance des plasmons de surface est la méthode la plus utilisée pour l'analyse des interactions entre les glycoformes d'IgG1 et les FcγR. Cependant, des conditions opératoires différentes et parfois non adaptées ont mené à une disparité des affinités. Parmi ces conditions opératoires, la méthode d'immobilisation des ligands est un paramètre critique. Or, les études traitant de l'analyse de l'interaction IgG1 / FcγR par SPR ont montré une forte disparité des méthodes d'immobilisation. De plus, toutes ces méthodes d'immobilisation présentent des inconvénients empêchant une analyse à la fois reproductible, rapide et peu coûteuse. Dans ce contexte, nous avons développé une méthode d'immobilisation rassemblant tous les avantages nécessaires pour une étude cinétique globale de l'influence des glycanes des IgG1 et des FcγR sur leurs interactions. Notre stratégie est basée sur l'interaction superhélice spécifique entre le ligand (FcγR) étiqueté du peptide E5 et la surface du biocapteur fonctionnalisée avec le peptide complémentaire (K5). Nous rapportons comme preuve de concept la mesure de l'affinité de l'interaction IgG1 / FcγRIIIa et l'évaluation de l'influence de la N-glycosylation des FcγRIIIa dont le glycoprofil a été modifié par diverses approches. L'interaction superhélice a permis une immobilisation des FcγR orientée, non biaisée, stable et facilement régénérable menant à des analyses cinétiques reproductibles, rapides et peu coûteuses.

4.2 Impact of N-glycosylation on Fc γ receptor / IgG interactions: Unravelling differences with an enhanced surface plasmon resonance biosensor assay based on coiled-coil interactions

Florian Cambay^{a,b}, Olivier Henry^a, Yves Durocher^{b,c} and Gregory De Crescenzo^{a*}

^aDepartment of Chemical Engineering, Polytechnique Montréal, P.O. Box 6079, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3A7, Canada;

^bHuman Health Therapeutics Research Center, National Research Council Canada, Building Montreal-Royalmount, Montréal, Québec H4P 2R2, Canada;

^cDépartement de Biochimie et Médecine Moléculaire, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

*Corresponding author: gregory.decrescenzo@polymtl.ca

DOI: 10.1080/19420862.2019.1581017

4.2.1 Abstract

The N-glycosylation profile of immunoglobulin G (IgG) is considered a critical quality attribute due to its impact on IgG-Fc gamma receptor (Fc γ R) interactions, which subsequently affect antibody-dependent cell-based immune responses. In this study, we investigated the impact of the Fc γ R capture method, as well as Fc γ R N-glycosylation, on the kinetics of interaction with various glycoforms of trastuzumab (TzM) in a surface plasmon resonance (SPR) biosensor assay. More specifically, we developed a novel strategy based on coiled-coil interactions for the stable and oriented capture of coil-tagged Fc γ Rs at the biosensor surface. Coil-tagged Fc γ R capture outperformed all other capture strategies applied to the SPR study of IgG-Fc γ R interactions, as the robustness and reproducibility of the assay and the shelf life of the biosensor chip were excellent (> 1,000 IgG injections with the same biosensor surface). Coil-tagged Fc γ Rs displaying different N-glycosylation profiles were generated either by different expression systems, *in vitro*

glycoengineering or by size-exclusion chromatography, and roughly characterized by lectin blotting. Of salient interest, the overlay of their kinetics of interaction with several TZM glycoforms revealed key differences on both association and dissociation kinetics, confirming a complex influence of the Fc γ R N-glycosylation and its inherent heterogeneity upon receptor interaction with mAbs. This work is thus an important step towards better understanding of the impact of glycosylation upon binding of IgGs, either natural or engineered, to their receptors.

4.2.2 Keywords

Fc γ receptors; IgG; N-glycosylation; Surface plasmon resonance; E/K coiled-coil interactions

4.2.3 Introduction

The development of therapeutic monoclonal antibodies (mAbs), and more specifically immunoglobulins G (IgG), has grown substantially over the last few decades (Kaplon & Reichert, 2018). In their natural form, IgGs are composed of two identical heavy chains (~ 50 kDa) and two identical light chains (~ 25 kDa) linked by disulfide bridges (Jefferis, 2010). Their association forms three independent moieties: two antigen-binding fragments (Fabs), structurally identical and each recognizing a specific antigen; and one crystallizable fragment (Fc) displaying sites of interactions for several binding partners, such as the complement component C1q and the Fc γ receptors (Fc γ Rs) (Jefferis, 2007).

Fc γ Rs are glycoproteins present at the surface of immune cells; they are divided into three types. The type I receptor (Fc γ RI or CD64) is considered a high affinity receptor (apparent K_D of $10^{-8} - 10^{-9}$ M) (Lu et al., 2015). In contrast, the type II (Fc γ RIIa-c or CD32a-c) and type III (Fc γ RIIIa/b or CD16a/b) receptors display lower affinities for IgGs (apparent K_D s of $\approx 10^{-6} - 10^{-7}$ M) (Radaev & Sun, 2002). Depending on the immune cell type and the receptors engaged, interactions between IgGs and Fc γ Rs trigger effector functions such as phagocytosis, antigen presentation, secretion of soluble factors (e.g. cytokines) and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (Lejeune et al., 2010).

N-glycosylation is a co- and post-translational modification that is considered a critical quality attribute (CQA) for therapeutic IgGs (Zhang, P. et al., 2016). The IgG Fc region contains two highly conserved N-glycosylation sites at the asparagine residues 297 (Asn-297) (Spearman et

al., 2011). The type of glycans they harbor greatly affects their interactions with Fc γ Rs, and, in turn, the effector functions. That is, IgG deglycosylation abrogates IgG interactions with Fc γ RIIIa and drastically diminishes the IgG affinity for Fc γ RI (Dorion-Thibaudieu et al., 2016). Oppositely, the lack of a core fucose in the Fc glycan increases IgG affinity for Fc γ RIIIa (Ferrara et al., 2011; Houde et al., 2010; Kanda et al., 2006). This knowledge has facilitated the development of therapeutic IgGs with superior biological and biophysical properties (Li, T. et al., 2017; Sondermann & Szymkowski, 2016) via *in vivo* (Haryadi et al., 2013; Raymond et al., 2015; Yamane-Ohnuki et al., 2004) or *in vitro* glycoengineering (Thomann et al., 2015; Warnock et al., 2005).

Of interest, Fc γ R N-glycosylation also affects IgG binding. For example, the removal of the N-glycan on Fc γ RIIIa Asn-162 reduces its affinity for afucosylated IgGs by over one order of magnitude due to the abrogation of carbohydrate-carbohydrate interactions between Fc γ RIIIa Asn-162 glycan and IgG's Fc Asn-297 glycan (Ferrara et al., 2011; Ferrara, Stuart, et al., 2006). On the contrary, the Fc γ RIIIa Asn-45 glycan has been shown to reduce its binding affinity for IgGs (Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009). More recently, Hayes and colleagues concluded that the removal of the Fc γ Rs glycans resulted in a decrease in the binding levels and an increase in the dissociation rate of antibodies (Hayes, Frostell, et al., 2014). Also, variations in N-glycosylation resulting from the expression of Fc γ Rs in different cell systems lead to distinct IgG binding kinetics (Hayes et al., 2017; Zeck et al., 2011). Large and sialylated glycans of Fc γ RI and Fc γ RIIIa produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells were suggested to negatively impact rituximab binding (Hayes et al., 2017).

Surface plasmon resonance (SPR)-based assays have been extensively applied to characterize Fc γ R-IgG interactions and assess the effect of glycosylation on binding (Bruhns et al., 2009; Dorion-Thibaudieu et al., 2014; Dorion-Thibaudieu et al., 2016; Ferrara et al., 2011; Ferrara, Stuart, et al., 2006; Hayes, Frostell, et al., 2014; Hayes et al., 2017; Houde et al., 2010; Kanda et al., 2006; Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009; Zeck et al., 2011). However, up to now, the use of diverse SPR assays has led to the recording of kinetic and affinity constants that are hard to compare and interpret from one report to another (Bruhns et al., 2009; Shibata-Koyama, Iida, Misaka, et al., 2009). Indeed, these differences may be attributed to variations in IgG and Fc γ R glycosylation profiles, IgG aggregation state, as well as to biases emanating from biosensor surface preparation. We have previously demonstrated that Fc γ R covalent immobilization by random

amine coupling chemistry led to heterogeneous FcγR biosensor surfaces that may in turn translate into complex kinetics deviating from a simple interaction model (Dorion-Thibaudeau et al., 2014). To address this issue, various capture strategies aiming at controlling receptor display at the biosensor surface have been tested. First, anti-histidine antibody was assessed to capture His-tagged FcγRs (Hayes, Frostell, et al., 2014; Hayes et al., 2017; Kanda et al., 2006; Okazaki et al., 2004; Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009; Zeck et al., 2011); however, the approach was suboptimal because it led to artefactual kinetic profiles harboring a downward slope, rather than a plateau, when IgGs were injected over tethered FcγRIIIa_{F158} (Dorion-Thibaudeau et al., 2014; Hayes, Frostell, et al., 2014; Hayes et al., 2017; Zeck et al., 2011). We demonstrated that a capture approach relying on the recruitment of biotinylated FcγRs on streptavidin-decorated biosensor surfaces eliminated this artifact, but the numerous sequential injections required for the assay negatively impacted reproducibility (Dorion-Thibaudeau et al., 2016). Altogether, these studies have highlighted the critical importance of an appropriate FcγR tethering strategy for the development of a standardized SPR-based biosensor assay for routine and robust analysis.

In that endeavor, we now describe a stable FcγR tethering approach relying on two complementary *de novo* designed 5 heptad-long (i.e., 35 amino acid-long, ~ 5 kDa) coil peptides denoted the E5 and K5 peptides. While monomeric on their own, these two peptides are known to heterodimerize to form the canonical coiled-coil motif through hydrophobic and electrostatic interactions mediated by the side chains of the leucine/valine residues and lysine/glutamate residues within each peptide heptad (De Crescenzo, Litowski, et al., 2003). The E5/K5 coiled-coil system has already been employed to dimerize or capture proteins in a stable and oriented manner on various surfaces for several biotechnology and biomedical applications, including biosensing (De Crescenzo, Pham, et al., 2003), inhibitor design (De Crescenzo et al., 2004), Western blotting and ELISA development (Boucher, St-Laurent, et al., 2010; Liberelle et al., 2010), nanocarrier targeting (Fortier et al., 2013) as well as cell culture and tissue engineering (Boucher, Ruiz, et al., 2010; Murschel et al., 2013). More specifically, we here report the production of E5-tagged FcγRIIIa_{F158} and FcγRIIIa_{V158} in mammalian cells by transient gene expression, their purification and their stable and oriented capture on SPR surfaces. This has been achieved on surfaces on which the complementary K5 coil peptide had been covalently immobilized via its single engineered cysteine. We then demonstrate the superiority of this approach compared to other capture strategies

relying on histidine or biotin tags. Finally, we apply this optimized assay to quantify the influence of Fc γ R and IgG N-glycosylation on their interactions.

4.2.4 Results

4.2.4.1 E5-tagged Fc γ RIIIa production and purification

To design a highly reproducible SPR assay for the study of IgG/Fc γ RIIIa interactions, we first compared the performances of the E5/K5 coiled-coil system to those of other capturing approaches for SPR biosensor surface preparation (Figure 4-1) using the sensorgram comparison procedure recently described by Karlsson *et al.* (Karlsson *et al.*, 2016). In that effort, the chimeric proteins corresponding to the extracellular domains of the Fc γ RIIIa_{F158} and Fc γ RIIIa_{V158} fused to the E5 peptide and to a 10-histidine tag at their C-termini were produced by transient transfection in CHO cells. Purification was then achieved by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) followed by size-exclusion chromatography (SEC) to remove soluble protein aggregates from the purified material. The performance of the purification process was evaluated by Coomassie staining and Western blotting with Penta-HisTM Alexa Fluor® 488 Conjugate of SDS-PAGE performed under non-reducing conditions (Figure 4-2A,B, left and right panels, respectively). The molecular weight of the purified products was estimated to be 40-50 kDa, which is consistent with a Fc γ RIIIa-E5/H₁₀ chimera (28.8 kDa) bearing about 11-21 kDa of N-glycan structures (Hayes, Frostell, *et al.*, 2014). Furthermore, Western blots indicated that our last purification step yielded an almost pure monomeric form of E5-tagged Fc γ Rs. These results were supported by analytical SEC, as the percentage of remaining aggregates for each E5-tagged Fc γ Rs were 3% and 0% for E5-tagged Fc γ RIIIa_{F158} and E5-tagged Fc γ RIIIa_{V158}, respectively (Figure 4-2C,D), hence validating the efficiency of our purification process. In the final preparation, receptor concentration was calculated to be 15 mg/L for each E5-tagged Fc γ RIIIa.

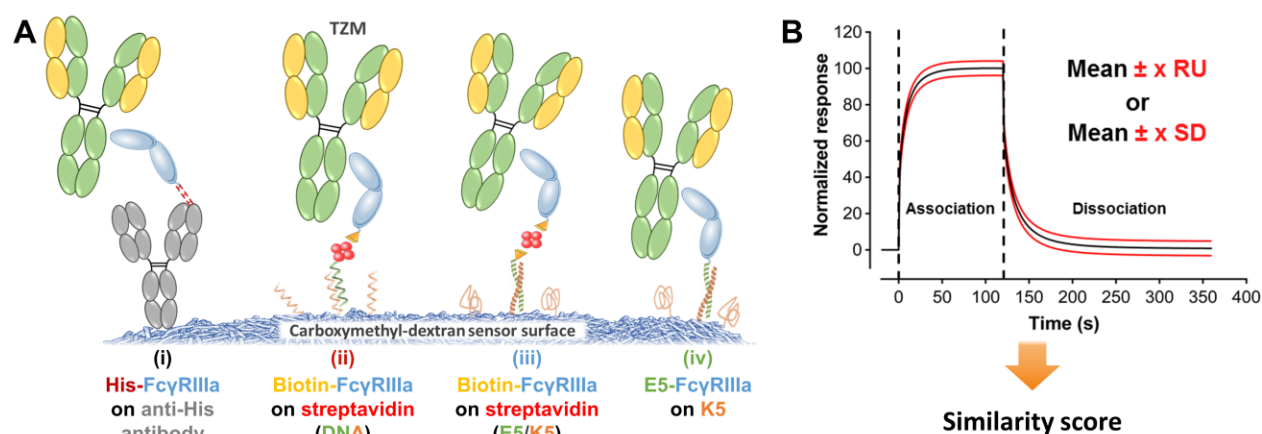


Figure 4-1: Comparison of FcγR capture strategies on SPR biosensor surfaces. (A) Schematic representation of the FcγR tethering approaches compared in this study: anti-His antibody mediated FcγR capture (i), DNA-mediated biotin-tagged FcγR capture (ii), coiled-coil-mediated biotin-tagged FcγR capture (iii) and coiled-coil-mediated E5-tagged FcγR capture (iv). (B) Assay performance has been assessed by defining a ‘similarity window’ (upper and lower curves in red) and calculating similarity scores, as recently proposed by Karlsson *et al.* (sensorgram comparison procedure - see ref. (Karlsson *et al.*, 2016)). The more similar the sensorgrams are, the higher similarity scores are.

4.2.4.2 E5-tagged FcγRIIIa characterization

SPR assays were then performed to characterize the binding kinetics between captured E5-tagged FcγRs and injected trastuzumab (TzM). Each experiment consisted of repeated cycles of sequential injections performed on biosensor surfaces on which the K5 peptide had been covalently immobilized (1500 response units (RUs)). First, E5-tagged receptor injections were performed, leading to the capture of 25 RUs or 35 RUs of FcγRIII_{V158} or FcγRIII_{F158}, respectively. After baseline stabilization, TzM solutions were injected and TzM/receptor complex formation was recorded in real time. IgG/receptor dissociation was then followed by performing buffer injection. Finally, surface regeneration, i.e., removal of remaining IgGs and E5-tagged receptors, was performed with several pulses of a 6 M guanidium chloride solution.

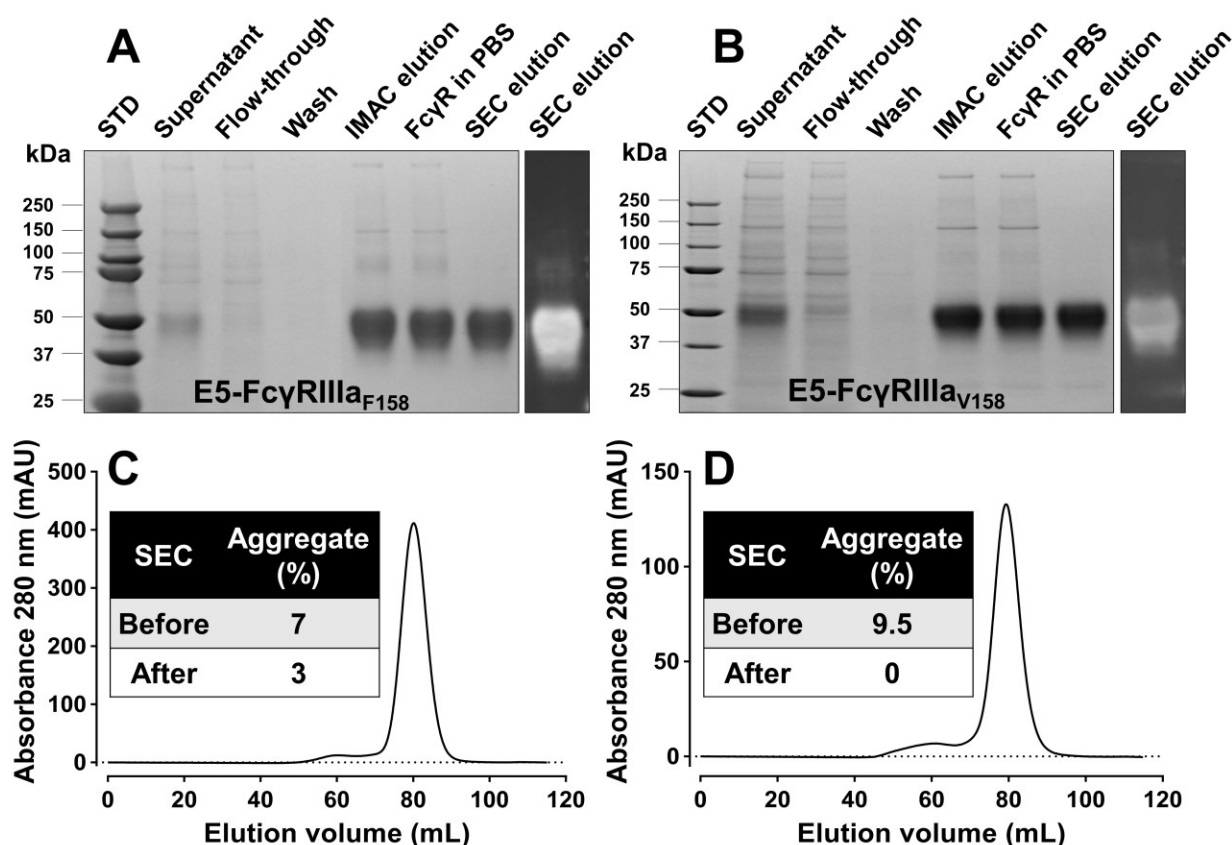


Figure 4-2: E5-tagged FcγRIIIa production and purification. SDS-PAGE analysis (non-reducing conditions) of E5-tagged FcγRIIIa_{F158} (A) and E5-tagged FcγRIIIa_{V158} (B) production and purification (Coomassie Blue staining or transfer to nitrocellulose membrane and probing with Penta-HisTM Alexa Fluor[®] 488 Conjugate). Chromatograms corresponding to the SEC of E5-tagged FcγRIIIa_{F158} (C) and E5-tagged FcγRIIIa_{V158} (D) using a HiLoad 16/600 Superdex 200 Prep grade. Fractions from 74 to 87 mL were pooled, then aggregate contents were assessed by analytical SEC (see insets).

The sensorgrams corresponding to triplicate injections of TZM at concentrations ranging from 40 to 4,000 nM for FcγRIIIa_{F158} and from 20 to 2,000 nM for FcγRIIIa_{V158}, are shown in Figure 4-3A,B. For each TZM injection, close inspection of the sensorgrams revealed that the baseline was stable before the IgG injections, and, at the end of the dissociation phase, the signal went back to 0 RU. This indicated that the oriented capture of the E5-tagged FcγRs at the K5 surface was very stable (no net dissociation of the E5-tagged receptor over the duration of the TZM and buffer injections). Moreover, triplicate injections were perfectly superimposed, thus further

validating the experimental approach (regeneration of the sensor chip surfaces). The Fc γ RIIIa/TZM dissociation occurred within less than 180 s (F158) and 480 s (V158) and were biphasic, in excellent agreement with other studies (Dorion-Thibaudau et al., 2016; Hayes, Frostell, et al., 2014). Steady-state analysis (insets in Figure 4-3A,B) of the TZM/Fc γ RIIIa interactions (three independent repetitions for both F158 and V158 variants) was performed, assuming a one-to-one interaction for the sake of comparison with values reported in the literature. The apparent K_D values ($4,015 \pm 214$ nM for Fc γ RIIIa_{F158} and 717 ± 27 nM for Fc γ RIIIa_{V158}) were within the same order of magnitude as those previously reported (Table 4-1) (Bruhns et al., 2009; Dorion-Thibaudau et al., 2009; Dorion-Thibaudau et al., 2014; Dorion-Thibaudau et al., 2016; Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009; Subedi & Barb, 2016).

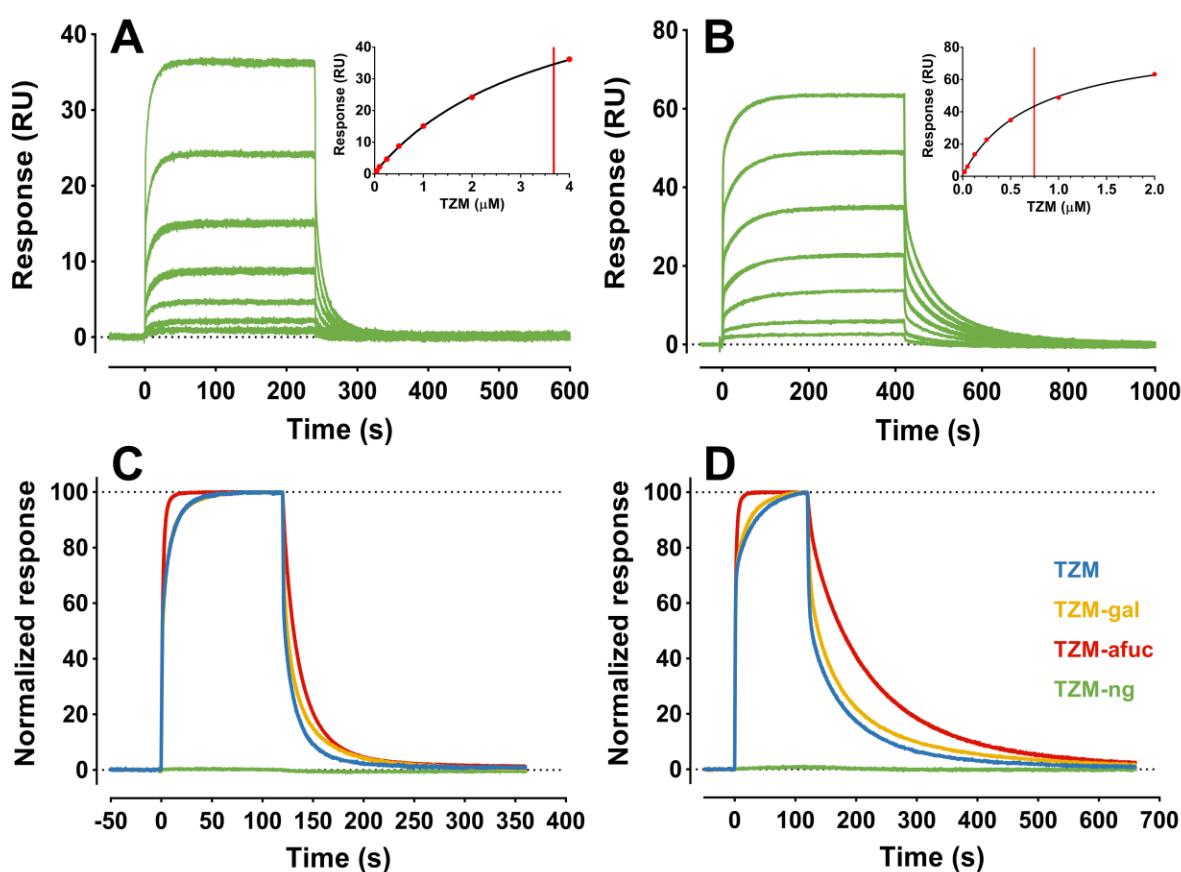


Figure 4-3: E5-tagged Fc γ RIIIa characterization. (A, B) SPR control-corrected sensorgrams corresponding to the interactions between injected TZM (triplicate injections, 40-4,000 nM for Fc γ RIIIa_{F158} and 20-2,000 nM for Fc γ RIIIa_{V158}) and E5-tagged Fc γ RIIIa_{F158} (A) or E5-tagged Fc γ RIIIa_{V158} (B) previously captured on a K5 surface (approximately 30 RUs of captured receptor).

The steady-state responses of the sensorgram data and the corresponding data fit are shown in the inset figures with the vertical line marking the respective calculated K_D values: 3.7 μM for Fc γ RIIIa_{F158} and 0.75 μM for Fc γ RIIIa_{V158}. (C, D) Normalized control-corrected sensorgrams of non galactosylated TZM (blue - TZM), galactosylated TZM (yellow – TZM-gal), afucosylated TZM (red – TZM-afuc) and non-glycosylated TZM (TZM-ng – green) injected at 1,000 nM in triplicate on E5-tagged Fc γ RIIIa_{F158} (C) or E5-tagged Fc γ RIIIa_{V158} (D) previously captured on a K5 surface.

Differences in binding kinetics between captured E5-tagged Fc γ Rs and several TZM glycoform preparations were then assessed. To this end, our reference TZM (a TZM preparation with low galactosylation level), TZM-gal (a TZM preparation with high galactosylation level), TZM-afuc (a TZM preparation with low fucosylation level) and TZM-ng (an aglycosylated N297Q TZM mutant) were injected in triplicate at 1,000 nM over captured E5-tagged Fc γ Rs (Dorion-Thibaudieu et al., 2014). As expected, TZM-ng did not interact with both Fc γ RIIIa variants, and the kinetics of interaction between both Fc γ RIIIa and the various TZM glycoforms were distinct (especially during the dissociation of the Fc γ RIIIa / TZM complex, Figure 4-3C,D). Indeed, the low-fucose variant (TZM-afuc) and, to a lesser extent, the high-galactose variant (TZM-gal) were characterized by slower dissociation rates than our reference TZM preparation.

Table 4-1: Apparent K_D values reported in the literature for FcγRIIIa-IgG interactions.

Apparent K_D values (steady-state only) were obtained by surface plasmon resonance biosensing.

Capture strategy		K_D (nM)		Ref.
Immobilization/capture	Ligand	FcγRIIIa _{F158}	FcγRIIIa _{V158}	
K5 coil peptide	E5-FcγR	4015 ± 214	717 ± 27	-
ssDNA-streptavidin	Biotin-FcγR	2290 ± 270	n.d.	(Dorion-Thibaudeau et al., 2016)
Anti-His antibody	His-FcγR	533	129.5	(Kanda et al., 2006)
		n.d.	2166	(Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009)
		1970	n.d.	(Dorion-Thibaudeau et al., 2014)
Amine coupling	FcγR	1590	n.d.	(Dorion-Thibaudeau et al., 2014)
		855 ± 140	500 ± 50	(Bruhns et al., 2009)
	Fc	n.d.	409 ± 32	(Subedi & Barb, 2016)
	IgG1	5000 ± 590	750 ± 80	(Ferrara, Stuart, et al., 2006)
Anti-Fab antibody	IgG1	n.d.	300	(Ferrara et al., 2011)

n.d. – not determined

4.2.4.3 In-depth comparison of various SPR assays based on FcγR capture

We first compared the kinetic profiles recorded with our strategy that relies on E5-tagged receptor capture to those of various SPR assays for which FcγR capture is achieved either via His/anti-His antibody or biotin/streptavidin interactions. In that endeavor, real-time monitoring of the interactions between TZM (duplicate injections at 1,000 nM) and FcγRIIIa_{F158} being captured with each one of the four approaches schematized in Figure 4-1A was performed. The normalized control-corrected sensorgrams were then overlaid. For all assays, duplicate injections were perfectly superimposed, and the baseline was stable before TZM injection (Figure 4-4A). The kinetic profiles, and more particularly the end of the IgG injection phase (Figure 4-4B), were,

however, slightly different from one FcγR capture method to the other. As expected from previous reports, the most important bias occurred with the anti-histidine capture method for which a decrease in the SPR signal at the end of the TzM injection was observed, in stark contrast with other capture methods (Dorion-Thibaudieu et al., 2014; Hayes, Frostell, et al., 2014; Hayes et al., 2017). This capture approach was thus excluded from the rest of the study. Of interest, the approach relying on E5-tagged FcγR capture was the only one leading to a true plateau (apparent steady state) at the end of the TzM injection phase. Indeed, both capture strategies relying on streptavidin-coated surfaces, previously tethered either via DNA-DNA or coiled-coil interactions, were characterized by the same slight increase in the signal at the end of the TzM injection phase (Figure 4-4B).

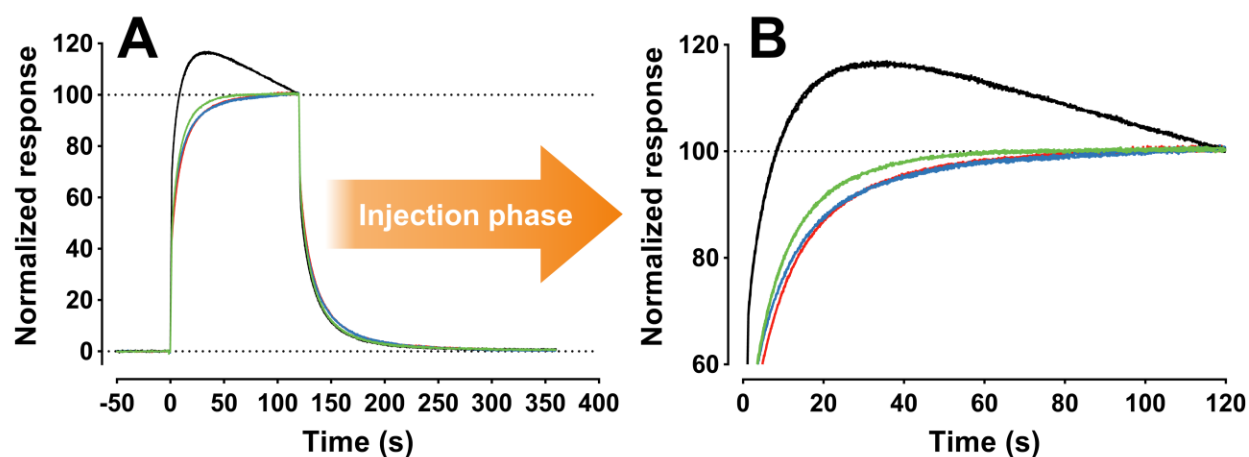


Figure 4-4: Impact of receptor capture strategy on the TzM/FcγRIIIa kinetic profiles. Overlay of normalized control-corrected sensorgrams for TzM interactions with FcγRIIIa_{F158} that had been captured with different methods (A) and magnification of the end of the TzM injection phases (B). Black: anti-His antibody-mediated His-tagged FcγR immobilization. Red: DNA-mediated streptavidin capture followed by biotin-tagged FcγR tethering. Blue: coiled-coil mediated streptavidin capture followed by biotin-tagged FcγR tethering. Green: coiled-coil mediated E5-tagged FcγR tethering.

We then investigated the reproducibility of each capture approach. To this end, cycles corresponding to FcγRIIIa_{F158} capture followed by TzM injection at fixed concentration (300 nM) and surface regeneration were repeated 91 times for each capture strategy. Overlays of control-

corrected sensorgrams corresponding to TZM / FcγR interactions are shown in Figure 4-5A-C, and the corresponding amounts of captured FcγR over cycles are shown in Figure 4-5D-F. Data were further analyzed taking advantage of the similarity score approach (Figure 4-5G-J). That is, for each tethering method, the 91 control-corrected curves were first averaged. Then, similarity scores were calculated for association and dissociation phases in two ways. The first method involved adding ± 0.1 to 1 RU to the average curve values for several comparison windows (Figure 4-5G,I). With this approach, similarity scores indicated the superiority of the coiled-coil mediated capture strategy. Indeed, for this capture strategy, almost 100% of the experimental data points fluctuated around the mean sensorgram values within ± 0.5 RU for both TZM injection and dissociation phases (Figure 4-5G,I). In contrast, lower similarity scores were systematically observed for the TZM injection phases recorded with the two other capture methods (Figure 4-5G). Variations within the dissociation phase were, however, found to be similar (Figure 4-5I). In the second method, similarity scores were calculated by increasing the number of experimental sensorgrams included in the average calculation while setting the value of the comparison window to ± 0.5 RU (Figure 4-5H,J). This analytical approach indicated that the reproducibility of the sensorgrams was linked to variation of the amounts of captured FcγR over cycles. In the case of biotinylated receptors, similarity scores followed an inverted-U curve over cycles for the injection phases. Indeed, given that the amount of captured FcγR increased (DNA interactions) or decreased (coiled-coil interactions) over cycles (Figure 4-5D,E), the maximal response recorded during the TZM injection phase increased or decreased over cycles, accordingly. This led to the observed inverted-U curve as the increase of similarity scores up to half cycles, followed by their decrease, corresponded to sensorgrams getting closer and then moving away from the mean curve (Figure 4-5H).

We then assessed the transposability of a TZM binding assay relying on the coiled-coil mediated capture of the E5-tagged FcγR by performing triplicate injections of TZM at 1,000 nM within four distinct experiments corresponding to varying E5-tagged FcγRIIIa_{F158} production lots (two distinct lots tested) and the length of the carboxymethylated dextran chains on the sensor chips (i.e., CM5 vs CM3 sensor chips). As can be seen in Figure 4-6A (orange), the normalized control-corrected sensorgrams of the four series of experiments (12 sensorgrams total) perfectly overlaid. Also, duplicate injections of TZM over all K5 surfaces (no captured receptor) indicated no non-specific binding of TZM to the K5 coil peptide as deduced from Figure 4-6A (black).

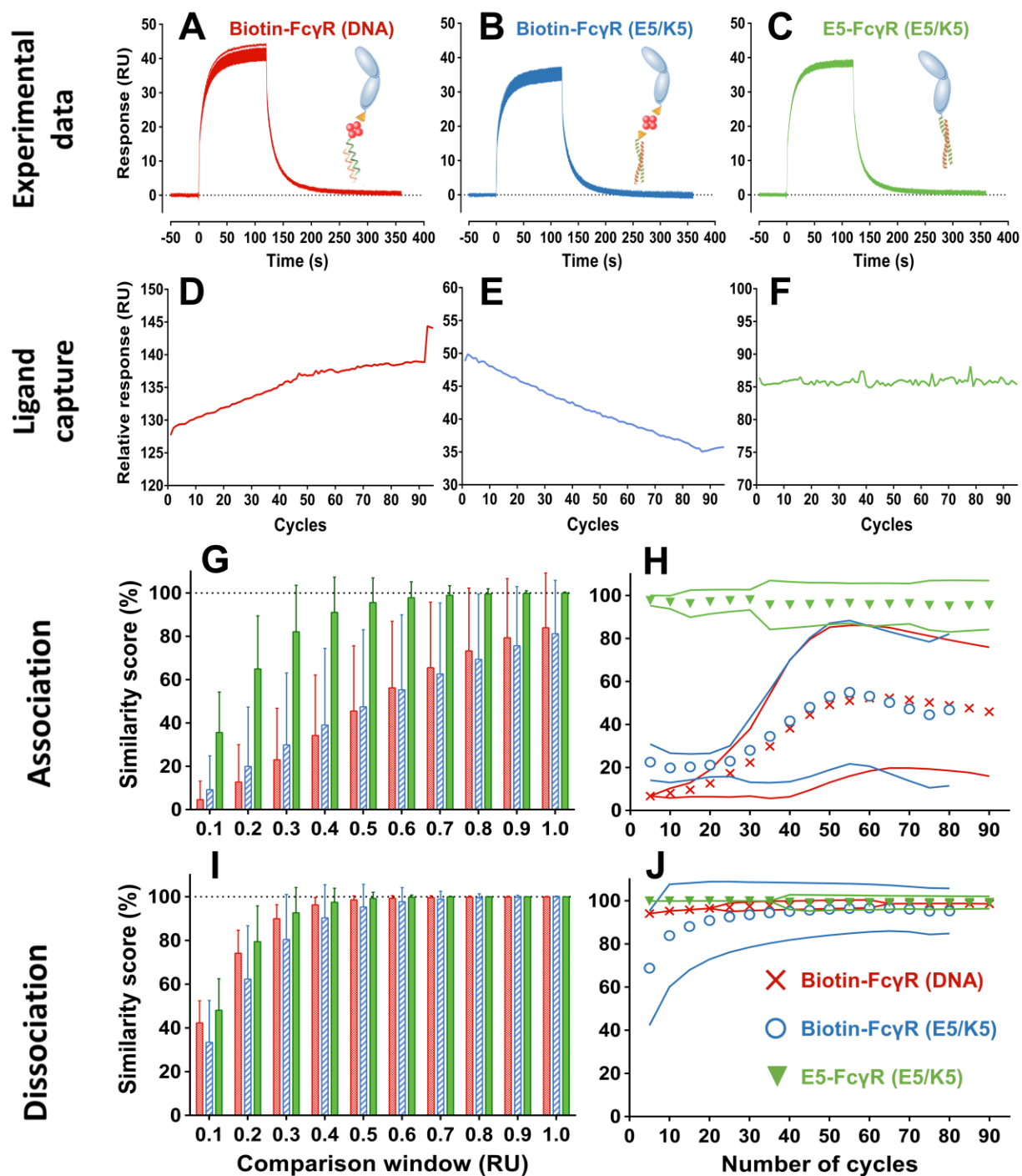


Figure 4-5: Reproducibility assessment of FcγR capture strategy. A cycle corresponding to a FcγRIIIa_{F158} capture followed by a single injection of TZM has been repeated using either DNA-mediated biotin-tagged FcγR capture (red), coiled-coil mediated biotin-tagged FcγR capture (blue) or coiled-coil mediated E5-tagged FcγR capture (green). More specifically, 300 nM TZM solutions were injected over control and FcγRIIIa_{F158} surfaces at a flow rate of 50 μL/min for 120 s. The

receptor/IgG dissociation was monitored by injecting running buffer for 240 s. (A-C) Control-corrected sensorgrams for TZM interactions with captured FcγRIIIa. (D-F) Variation of the amount of captured FcγRIIIa. Similarity scores have been calculated for the association (G, H) and the dissociation phases (I, J) varying the comparison window between ± 0.1 and ± 1 RU (G, I) or increasing number of cycles at a fixed comparison window of 0.5 RU with standard deviations displayed as solid lines (H, J).

Finally, to further evaluate the robustness of our capture approach, we repeated 50 times the same assay on the same K5 surface. This assay consisted of triplicate injections of TZM at 7 concentrations (0, 0, 10, 30, 100, 300 and 1,000 nM) over captured E5-tagged FcγRIIIa_{F158} for a total of 1,050 receptor capture/TZM injection/surface regeneration cycles over the same K5 and mock surfaces. Of further interest, to extensively test the K5 surface stability, the chip was stored at 4 °C for 1 month between the 19th and 20th assay cycles. For each assay cycle, control-corrected sensorgrams were normalized relative to the highest data point of each set, then superimposed (Figure 4-6B). Once again, similarity scores were used to assess reproducibility. To this end, one mean curve per concentration was calculated, then comparison windows were set as before (Figure 4-6C,D). The overlay of the normalized control-corrected sensorgrams and the high similarity scores confirmed the very robustness of the method. More precisely, assay reproducibility was judged excellent for the dissociation phase, with a similarity score equal to 90% for a comparison window of ± 0.5 RU, and adequate for the TZM injection phase with similarity scores of about 65%. Moreover, the 1-month storage seemed to only weakly affect the K5 surface, and consequently FcγR capture, since similarity scores and related standard deviations were similar before and after storage (Figure 4-6D).

Altogether, our experimental approach, based on the capture of E5-tagged FcγRs over a K5 surface for the real-time monitoring of their interactions with TZM surpasses other capture strategies in terms of reproducibility, transposability and robustness. This method was then applied to the study of the effect of the FcγRIIIa N-glycosylation upon binding to several TZM lots displaying distinct glycosylation profiles.

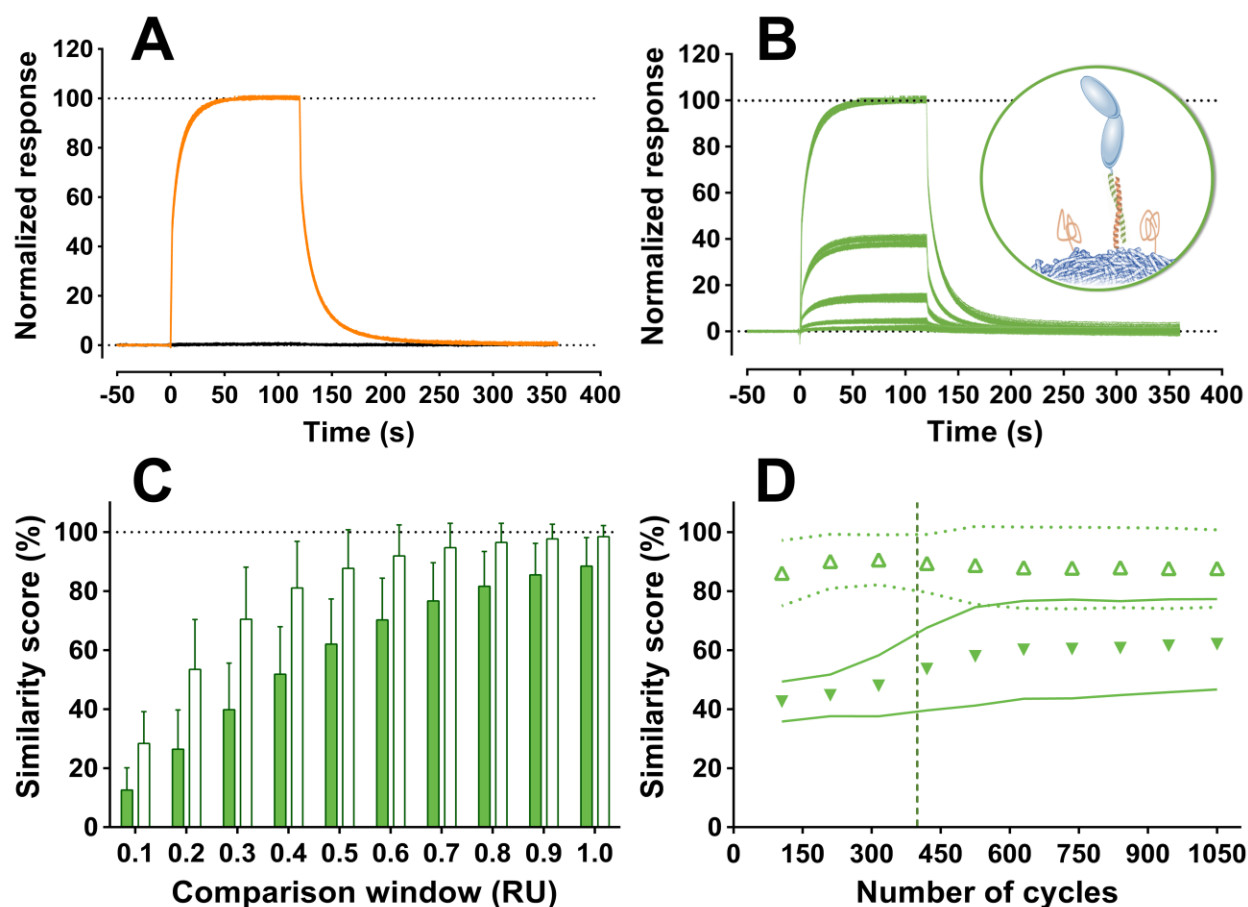


Figure 4-6: Evaluation of the robustness of the E5-tagged Fc γ R capture, the assay reproducibility and the K5 surface stability. (A, orange) Overlay of four normalized control-corrected triplicate injections of TBM (1,000 nM) on four distinct types of surfaces generated with two different lots of E5-tagged Fc γ RIIIa_{F158} (from independent cell cultures) captured on two K5 surfaces (CM5 or a CM3 sensor chip surfaces). (A, black) Overlay of control-corrected sensorgrams corresponding to the triplicate injections of TBM (1,000 nM) over the same K5 surfaces (no captured receptor). (B) Overlay of 50 normalized control-corrected assays (1050 cycles) repeated on the same K5 surface. An assay corresponds to the triplicate injection of TBM at 7 concentrations (0, 0, 10, 30, 100, 300 and 1,000 nM) over E5-tagged Fc γ RIIIa_{F158} previously captured on the K5 surface. Each set was normalized by defining the highest data point as 100%. Calculated similarity scores for increasing comparison windows (C) and for increasing number of cycles at a comparison window of 0.5 RU (D) for both association (closed columns and triangles) and dissociation (empty columns and triangles) phases. In Figure 4-6D, the vertical dotted line indicate a chip storage at 4 °C for 1 month.

4.2.4.4 Characterization of FcγRIIIa N-glycosylation

We studied three types of FcγRIIIa N-glycosylation heterogeneity that can influence the IgG-FcγRIIIa interactions. The characterization of the N-glycosylation profile of the various FcγRIIIa used for this study was performed by lectin blot using *Sambucus nigra* lectin (SNA), *Erythrina cristagalli* agglutinin (ECL), *Maackia amurensis* lectin II (MALII) and *Lens culinaris* agglutinin (LCA) for the detection of α 2,6-sialylation, terminal galactose, α 2,3-sialylation and core fucose, respectively (Figure 4-7). We first produced E5-tagged FcγRIIIa_{F158/V158} in CHO and human embryonic kidney 293 (HEK293) cell lines to evaluate the impact of N-glycosylation emanating from the use of different expression systems for their synthesis. The SDS-PAGE corresponding to both FcγRIIIa produced either in CHO (CHO-FcγRs) or HEK293 (HEK-FcγRs) cells indicated a slightly lower molecular weight for HEK-FcγRs (Figure 4-7A,D). ECL blot indicated that the terminal galactosylation level was higher for HEK-FcγRs, while SNA and MALII blots showed that only the HEK-FcγRs were α 2,6-sialylated, with a low level of α 2,3-sialylation compared to CHO-FcγRs. At last, both FcγRIIIas had similar terminal galactosylation, sialylation and fucosylation levels when produced in HEK293, while differences were more marked for CHO-FcγRIIIas (a weaker LCA signal level was observed for the V158 variant).

CHO-FcγRIIIas were further fractionated by SEC, and TZM binding kinetics were assessed for various fractions. SDS-PAGE analysis confirmed that the SEC pools we collected (at both ends of the SEC peak) were dissimilar in terms of glycosylation: differences in molecular weight, more likely resulting from different amounts/types of N-glycans, as well as larger smears for low molecular weight FcγRs (tail pool), were observed (Figure 4-7B,E) without any detectable aglycosylated FcγR. SDS-PAGE also indicated the presence of a slight proportion of aggregates for FcγRIIIa_{F158}, within the SEC front pool, despite previous SEC purification (Figure 4-7B) whereas no aggregate was detectable for FcγRIIIa_{V158}. The lectin blots for the FcγRIIIa SEC tail pool (red fractions in Figure 4-7B,E) showed almost no sialylation and a low level of galactosylation, which could partly explain the lower molecular weight (see above). In contrast, FcγRIIIa SEC front pool (blue fractions) were characterized by a higher level of α 2,3-sialylation.

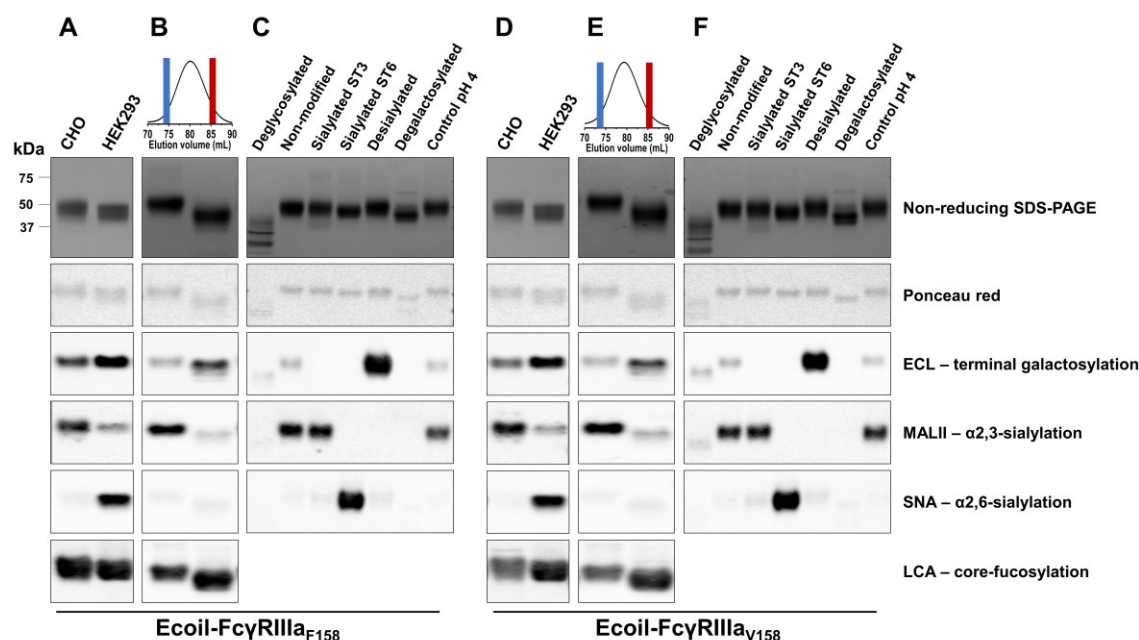


Figure 4-7: SDS-PAGE and lectin-blots analysis of FcγRIIIa N-glycans. (A, D) Coil-tagged FcγRIIIa_{F158/V158} were produced in either CHO or HEK-293 cells. (B, E) High (blue fraction) and low (red fraction) molecular weight glycosylated monomeric coil-tagged FcγRIIIa_{F158/V158} were obtained by size-exclusion chromatography. (C, F) N-glycans of coil-tagged FcγRIIIa_{F158/V158} were either enzymatically modified or removed. Non-reducing SDS-PAGE was used to assess the FcγR molecular weight changes and aggregation level. Ponceau red staining was used to control the protein load. ECL, MALII, SNA and LCA were used to detect terminal galactosylation, α2,3-sialylation, α2,6-sialylation and core-fucosylation, respectively.

Our range of receptor glycoform variants was further extended to study the effect of terminal sugars, and more precisely sialylation, by enzymatic modification of the FcγRIIIa_{F158/V158} SEC front pool fractions (blue fractions in Figure 4-7B,E). The SDS-PAGE and lectin-blots corresponding to the enzymatically modified FcγRIIIa_{F158/V158} are shown in Figure 4-7C,F. FcγR treatment with α2,3-sialyltransferase (ST3Gal4) led to complete α2,3-sialylation, as deduced from the disappearance of terminal galactose signal (ECL band in Figure 4-7C,F). Also, as expected, the SNA-reactive bands were only observed for FcγRs treated with ST6Gal1. For desialylated receptors, the absence of significant MALII and SNA bands, combined with a higher ECL signal than that for non-modified FcγRs, validated the desialylation of FcγRs with sialidase A. Then, the degalactosylation of desialylated FcγRs with the β(1-3,4)-galactosidase was confirmed by the

absence of MALII, SNA and ECL bands. Finally, our FcγR deglycosylation with PNGase F was only partial, as deduced from the persistence of low-intensity bands for ECL and MALII. Altogether, the lectin blots validated our enzymatic treatment protocols.

4.2.4.5 Influence of FcγR N-glycosylation upon IgG-FcγR interaction

Due to the complex binding kinetics of IgG-FcγRIIIa interactions, the comparison of the kinetic constants derived from the global analysis of the recorded sensorgrams with a one-to-one binding model was not possible (data not shown). The method we used for reproducibility evaluation was thus adapted to compare binding curves and assess the FcγR N-glycosylation influence, as explained by Hayes and colleagues (Hayes et al., 2017). More precisely, a mean curve was calculated from a minimum of two normalized curves of a standard sample, then upper and lower limits were obtained by adding or subtracting n times the standard deviation to the mean curve. As previously, a similarity score of 100% is expected for sensorgrams falling between upper and lower limit. On the contrary, the lower the similarity score is, the more distant the other curve. In addition, deviation plots were obtained by subtracting the average of the standard from limits and sample curves, and by dividing with the 1-standard deviation (SD) curve (Karlsson et al., 2016). With these plots, the differences between samples and standards are easier to identify since sample data are displayed between horizontal SD borders.

For the comparison of the interactions between IgG glycoforms and FcγRIIIa_{F158/V158} from different expression systems, the level of captured FcγRs was similar for both CHO-FcγR and HEK-FcγR. Moreover, the same concentration series of TzM (from the same preparation) was used for each comparison, to ensure that the receptor would be the only parameter varying in the experiment. To focus on the curve shapes and to compare the sensorgrams, each set of 5 concentrations was normalized by defining the highest data point as 100% and the sensorgrams were overlayed (Figure 4-8). The inset panels show the deviation plots corresponding to the CHO-FcγR/TzM glycoform interactions selected as the standard sensorgrams and with a comparison window of 5 SD. The comparison of the sensorgrams and the deviation plots indicated that, during the injection phase, the binding of the TzM glycoforms to CHO-FcγRs led more rapidly to equilibrium when compared to TzM glycoforms binding to HEK-FcγRs (red curves and points shown in Figure 4-8). In addition, TzM glycoforms were characterized by slower dissociations from HEK-FcγRs. The similarity scores, applied for each TzM glycoform to both binding and

dissociation phases with a comparison window of 5 SD, were 85% (TZM), 59% (TZM-gal) and 36% (TZM-afuc) for HEK-FcγRIIIa_{F158} compared to CHO-FcγRIIIa_{F158} and 75% (TZM), 36% (TZM-gal) and 28% (TZM-afuc) for HEK-FcγRIIIa_{V158} compared to CHO-FcγRIIIa_{V158}.

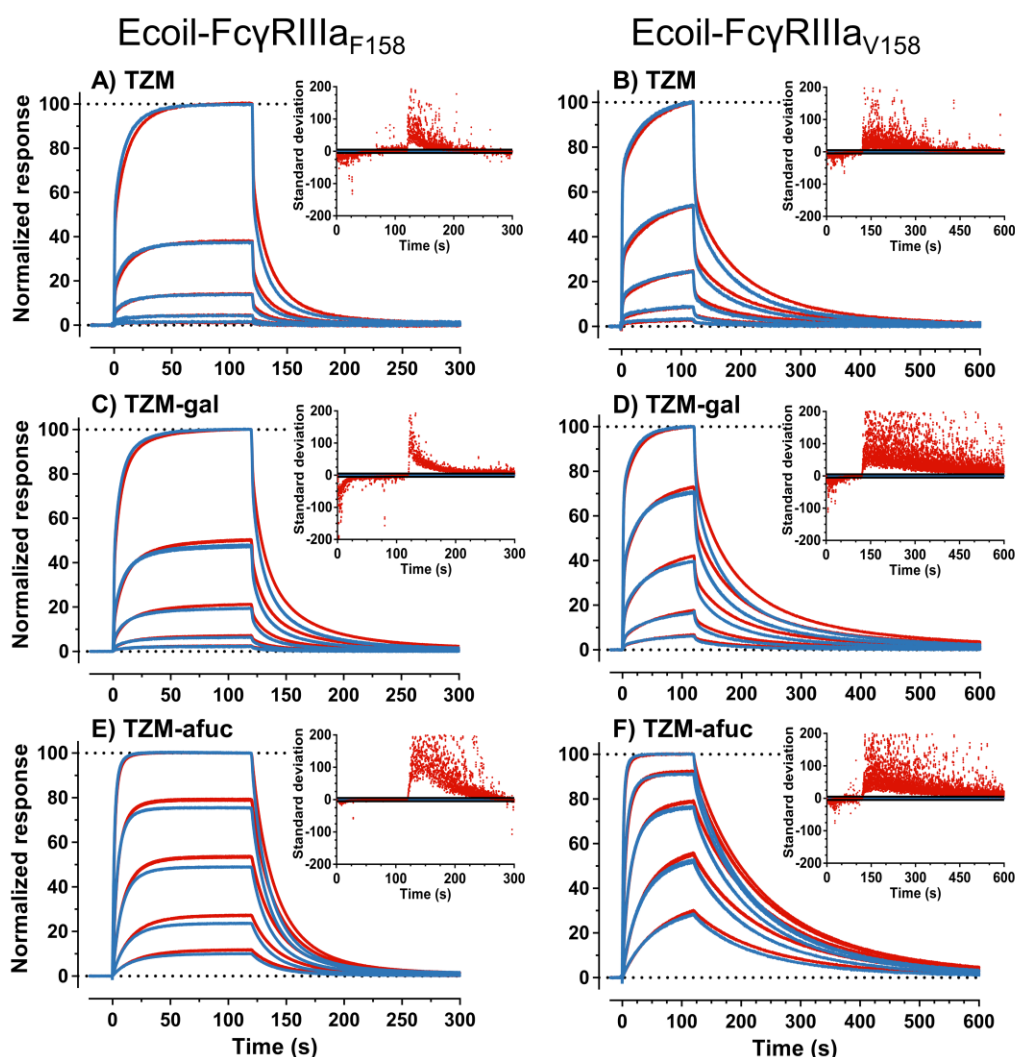


Figure 4-8: Influence of the FcγRIIIa expression system upon binding kinetics of trastuzumab glycoforms. Overlay of normalized control-corrected sensorgrams corresponding to the interactions between injected TzM (A, B), TzM-gal (C, D) or TzM-afuc (E, F) at 5 concentrations (10; 30; 100; 300; 1,000 nM, triplicate injections) and monomeric coil-tagged FcγRIIIa_{F158/V158} produced either in CHO (blue) or HEK-293 cells (red). Deviation plots on an SD versus time scale are shown in the inset figures. The standard data (FcγRIIIa produced in CHO cells – blue) fall between the sensorgram comparison window (in this case ± 5 SD). The dotted lines indicate that the figure displays normalized response data.

The same assay set up was applied to compare TzM glycoforms binding to the two distal SEC fractions (front and tail SEC pools) of FcγRIIIa_{F158/V158} from the same production lot (shown in Figure 4-7B,E). Comparison of TzM glycoform binding to FcγRIIIa is shown in Figure 4-9 where the inset panels show the deviation plots obtained with the binding of TzM glycoforms to high glycosylation FcγRIIIa selected as the standard sensorgrams and with a comparison window of 5 SD. First, the superimposed normalized sensorgrams demonstrated that the N-glycosylation level of FcγRIIIa_{F158/V158} from a same production lot influences the interaction with TzM glycoforms, and more importantly for the V158 variant. More precisely, the deviation plots showed that the equilibrium is reached more rapidly for low glycosylation FcγRIIIa (red curves and points shown in Figure 4-9). For the dissociation phases, TzM glycoforms dissociated more rapidly from low glycosylation FcγRIIIa_{F158/V158}. Similarity scores applied to both binding and dissociation phases were 82 % (TzM), 72 % (TzM-gal) and 35 % (TzM-afuc) for low glycosylation FcγRIIIa_{F158} and 74 % (TzM), 64 % (TzM-gal) and 72 % (TzM-afuc) for low glycosylation FcγRIIIa_{V158}.

Finally, the interactions of TzM glycoforms to FcγRIIIa_{F158/V158} displaying different N-glycan terminal sugars were also compared using this method (Figure 4-10). The deviation plots corresponding to the binding of TzM glycoforms to α2,3-sialylated-FcγRIIIa were selected as the standard sensorgrams with a comparison window of 10 SD. As expected, the most important effect upon kinetics was observed for deglycosylated FcγRIIIa with faster association and dissociation. For other FcγRIIIa glycoforms, the effect was not as drastic, with a slight difference at the dissociation phase. More precisely, for all the TzM glycoforms interacting with FcγRIIIa_{V158}, α2,6-sialylation led to slower dissociation. This effect was more obvious for both FcγRIIIa_{F158/V158} when desialylated. In the case of TzM, similarity scores applied to dissociation phases were 91 % (α2,6-sialylated), 57 % (desialylated) and 12 % (deglycosylated) for FcγRIIIa_{F158} and 67 % (α2,6-sialylated), 43 % (desialylated) and 4 % (deglycosylated) for FcγRIIIa_{V158}. For clarity's sake, the profiles corresponding to degalactosylated receptors have not been added. However, it should be noted that degalactosylation treatment at a low pH led to a strong decrease in binding (data not shown).

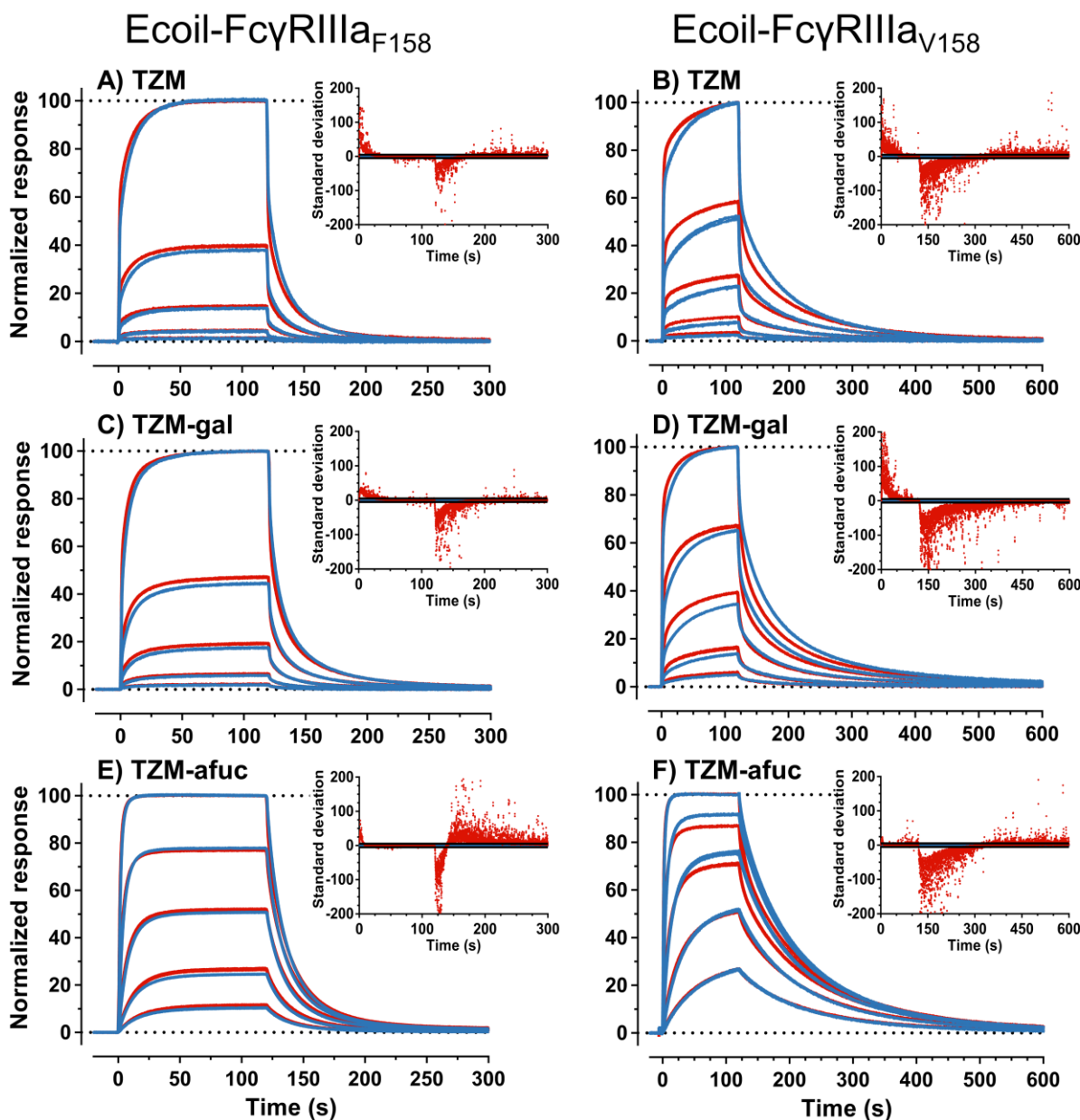


Figure 4-9: Influence of FcγRIIIa N-glycosylation level on binding kinetics of trastuzumab glycoforms. Overlay of normalized control-corrected sensorgrams corresponding to the interactions between injected TZM (A, B), TZM-gal (C, D) or TZM-afuc (E, F) at 5 concentrations (10; 30; 100; 300; 1,000 nM, triplicate injections) with the high (blue) or the low (red) glycosylation pools of monomeric coil-tagged FcγRIIIa_{F158/V158}. Deviation plots on an SD versus time scale are shown in the inset. The standard data (highly glycosylated FcγRIIIa – blue) fall between the sensorgram comparison window (in this case ± 5 SD). The dotted line indicates that the figure displays normalized response data.

4.2.5 Discussion

4.2.5.1 Development of the coil-tagged FcγR capture strategy for SPR biosensing

Many studies have used SPR biosensing to assess the kinetics constants of IgG/FcγR interactions (Bruhns et al., 2009; Dorion-Thibaudeau et al., 2014; Dorion-Thibaudeau et al., 2016; Galon et al., 1997; Hayes, Frostell, et al., 2014; Hayes et al., 2017; Li, P. et al., 2007; Li, T. et al., 2017; Subedi & Barb, 2016). Among them, the reported kinetic constant and affinity values have shown important discrepancies, in part due to the complexity of the recorded kinetic profiles and the inability of simple kinetic models to fit the data (Karlsson et al., 2016). This can be attributed to the complexity of the biological interaction itself, e.g., the presence of various glycoforms for both antibody and receptor preparations. Alternatively, the various experimental procedures reported in the literature may be suboptimal, biasing the conclusions drawn about the interactions. Indeed, experimental parameters, such as the choice of the interactant to be immobilized at the biosensor surface, the capture strategy and resulting density, and the injection flow rate, may create several artifacts (e.g., surface heterogeneity, mass transfer limitation) (Myszka, 1997), adding complexity to the recorded kinetics. On that note, it has been demonstrated that the oriented FcγR capture influences the kinetics of interaction when compared to a random (non-oriented) immobilization approach (Ahmed et al., 2014). It has also been highlighted that the oriented capture of His-tagged FcγR via anti-histidine antibodies, which is a standard approach in SPR biosensing, is not optimal (Figure 4-4), most likely due to interactions between FcγR and the Fc region of the anti-histidine antibodies.

To eliminate the use of a capture antibody, a strategy based on streptavidin/biotin interaction has been developed by our group (Dorion-Thibaudeau et al., 2016). This approach required the production of FcγR being biotinylated at a specific site, which was achieved by co-expressing a biotin acceptor peptide (BAP)-tagged receptor and the biotinylating enzyme BirA. As shown here, we have improved our biosensing strategy now based on the oriented capture of Ecoil-tagged FcγR on Kcoil-decorated biosensor surfaces (Figure 4-1). The Ecoil-tagged FcγRIIIa_{F158/V158} variants were first produced in CHO cells and subsequently purified to get monomeric FcγRIIIa ectodomains (Figure 4-2A-D). The Ecoil-tagged FcγRs were then captured through their interactions with the Kcoil peptide that had been covalently immobilized at the biosensor surface and their binding kinetics to injected IgGs were measured (Figure 4-3A,B). A comparison of the

biosensing strategies relying on biotin-mediated and coiled-coil-mediated capture (Figure 4-1) indicated that the biotin-streptavidin approach slightly affects the recorded antibody/receptor binding profiles (steady state is not achieved, which contrasts with the coiled-coil approach results, Figure 4-4), and thus bears the potential to bias the subsequent analyses. The bias most likely results from the streptavidin/biotinylated receptor capture step since similar sensorgrams were recorded when replacing ssDNA-mediated capture by coiled-coil-mediated streptavidin capture (see Figure 4-1 (ii) and (iii) and related experimental results in Figure 4-4). Because of its tetrameric (tetravalent) nature, the capture of several biotinylated receptors upon the same streptavidin molecule might have occurred, leading to local crowding or rebinding artifacts.

Of salient interest, our coiled-coil based approach reduces the number of steps for receptor capture (a single peptide-peptide interaction versus ssDNA-ssDNA followed by biotin-streptavidin interactions, Figure 4-1). This increases the throughput of the assay, its robustness and reproducibility, as well as its applicability to SPR surfaces with distinct dextran lengths as extensively demonstrated (Figure 4-5 and Figure 4-6). These benefits in turn increase the level of confidence one could have about the kinetic differences observed when studying antibody and receptor glycosylation profiles (Figure 4-8, Figure 4-9 and Figure 4-10).

Despite our oriented capture approach and the great care taken to optimize SPR experimental conditions (double referencing, high working flow rate, low level of receptor capture), the recorded kinetic profiles corresponding to the interactions of our various glycoforms of TZM and Fc γ RIIIa_{F158/V158} variants still deviated from simple binding kinetics. A rough estimation of the apparent K_D values of several interactions by steady-state analysis was performed (Figure 4-3A,B). These values were in agreement with the literature (Table 4-1) (Bruhns et al., 2009; Dorion-Thibaudeau et al., 2014; Dorion-Thibaudeau et al., 2016; Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009; Subedi & Barb, 2016), once again strongly suggesting that: 1) the Ecoil tag does not influence the bioactivity of the receptor; and 2) the kinetic profile deviation from a simple model is due to the N-glycosylation heterogeneity of TZM (Dorion-Thibaudeau et al., 2014) and/or Fc γ RIIIa (Hayes, Frostell, et al., 2014; Zeck et al., 2011).

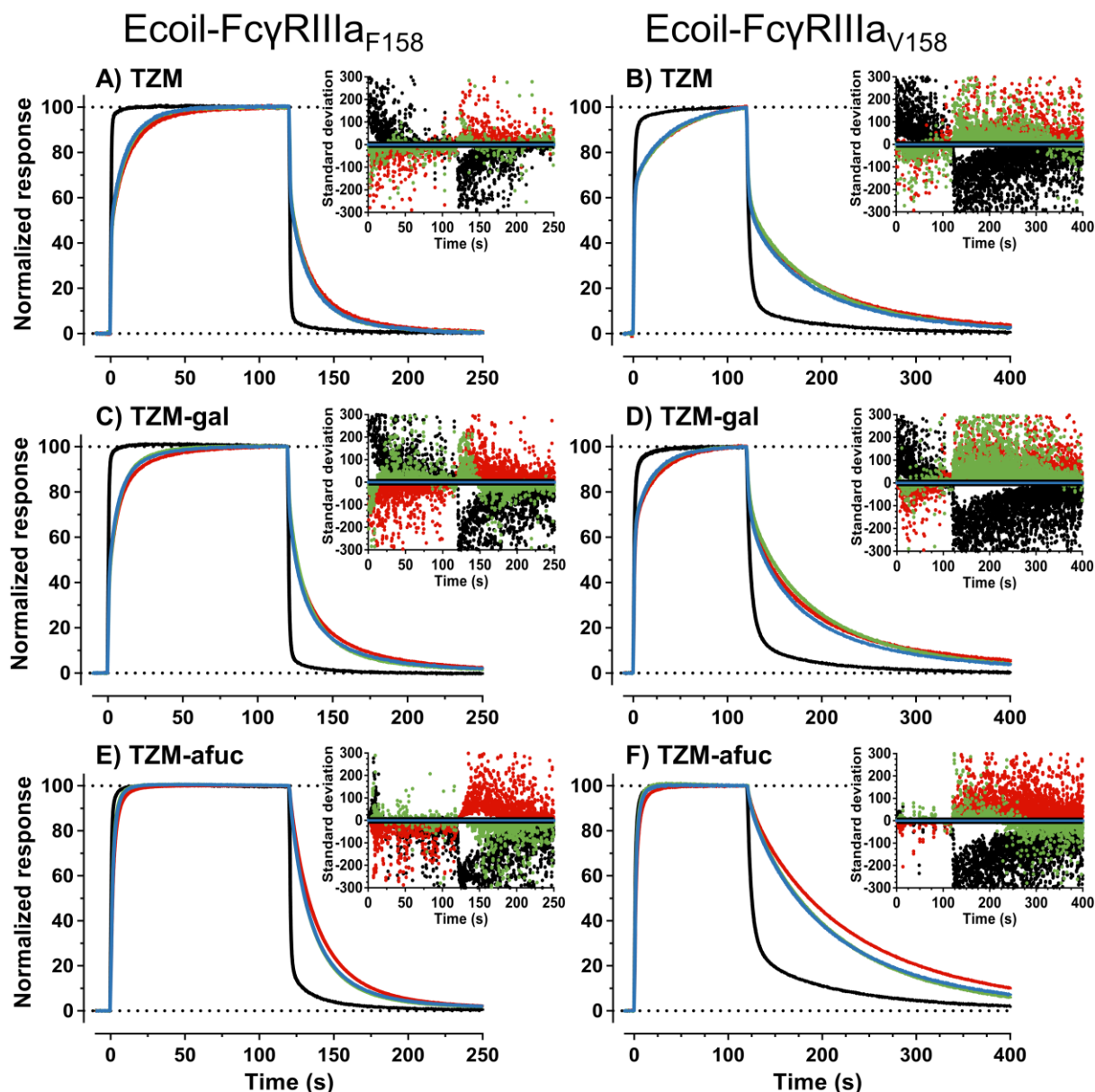


Figure 4-10: Influence of Fc γ RIIIa terminal N-glycans upon binding to trastuzumab glycoforms. Overlay of normalized control-corrected sensorgrams corresponding to the interactions between injected TZA (A, B), TZA-gal (C, D) or TZA-afuc (E, F) at 1000 nM (duplicate injections) and coil-tagged Fc γ RIIIa_{F158/V158} glycoforms. Black: deglycosylated. Blue: sialylated ST3. Green: sialylated ST6. Red: desialylated. Deviation plots on an SD versus time scale are shown in the inset. The standard data (sialylated ST3 Fc γ RIIIa – blue) fall between the sensorgram comparison window (in this case ± 10 SD). The dotted line indicates that the figure displays normalized response data.

We then evaluated the ability of the Ecoil-tagged FcγRIIIa_{F158/V158} to distinguish various TZM glycoforms (Figure 4-3C,D). TZM fractions enriched in either galactosylated or afucosylated glycoforms were characterized by distinct SPR kinetic profiles. As expected, enrichment in galactosylated and afucosylated forms resulted in slower dissociation rates from the FcγRIIIa variants (see dissociation phases in Figure 4-3C,D). These results are consistent with the very specific role of the core fucose in the IgG1-FcγRIIIa interactions (Ferrara et al., 2011; Mizushima et al., 2011), as well as with the effect of galactose on Fc conformation (Frank et al., 2014; Subedi, Hanson, & Barb, 2014). They are in agreement with the kinetic profiles generated with biotin or His-tag captured FcγRIIIa (Dorion-Thibadeau et al., 2014; Dorion-Thibadeau et al., 2016; Shibata-Koyama, Iida, Misaka, et al., 2009). Altogether, we thus demonstrated that our FcγR production protocols, combined to our coiled-coil based oriented capture strategy, provides a highly reproducible and robust method for a semi-quantitative analysis of the glycoprofile of IgGs by SPR biosensing.

4.2.5.2 Influence of FcγR N-glycosylation

Several studies have established that receptor N-glycosylation was partially responsible for the heterogeneous binding kinetics of human IgG to FcγRIIIa (Ferrara et al., 2011; Ferrara, Stuart, et al., 2006; Hayes, Frostell, et al., 2014; Hayes et al., 2017; Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009; Zeck et al., 2011). The development of a SPR biosensor assay relying on the binding kinetic of the IgG/FcγRIIIa interaction for the identification of the various glycovariants present in a given IgG pool may thus be dependent on receptor glycosylation. Therefore, we reasoned that homogenizing FcγRIIIa glycovariant preparations may results in simpler kinetic profiles for their interactions with IgGs (and thus a simpler interpretation). We thus applied our now well-characterized E5-tagged FcγRIIIa capture strategy to perform a preliminary study on the influence of FcγR N-glycosylation upon TZM binding kinetics. This study included our three TZM glycoforms preparations (TZM, galactosylated TZM and afucosylated TZM) to assess the concomitant impact of TZM and FcγRIIIa glycosylation upon their interactions. The N-glycosylation heterogeneity of our FcγRs was highlighted by the large bands we observed on SDS-PAGE gels and the subsequent qualitative analysis by lectin blotting (Figure 4-7). Other studies have also highlighted the complexity of FcγR glycosylation and its impact on IgG binding either by sequentially knocking out FcγR glycosylation sites (Ferrara, Stuart, et al., 2006; Shibata-

Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009) or by expressing FcγRs in different cell types (glycosylation being characterized by overall (Cosgrave et al., 2013; Hayes, Frostell, et al., 2014; Hayes et al., 2017; Takahashi et al., 2002) or site-directed analyses (Yagi et al., 2018; Zeck et al., 2011)). We first confirmed the impact of the N-glycosylation differences resulting from the use of E5-tagged FcγRIIIa_{F158/V158} produced either in CHO or HEK293 cell lines. As previously reported by Zeck *et al.* and Hayes *et al.*, we observed different TZM binding profiles for CHO- and HEK-produced FcγRIIIa, with faster dissociation rates for the CHO-FcγRIIIa_{V158} (Figure 4-8) (Hayes et al., 2017; Zeck et al., 2011). In contrast, unlike Hayes *et al.*, the same conclusions were also drawn for the CHO-FcγRIIIa_{F158} variant (Figure 4-8), suggesting that the cell culture parameters may influence FcγRIIIa glycosylation as much as the cell expression system itself (Hayes et al., 2017).

As suggested by our results (Figure 4-8) and those of Hayes *et al.*, the higher affinity of HEK-produced FcγRIIIa may be due in part to its higher level of terminal galactosylation as well as the presence of α2,6-sialylation, when compared to CHO-produced FcγRIIIa. In addition, given the lower apparent molecular weight of the HEK293-produced FcγRIIIa, these receptors may have glycans with lower levels of antennarity, a trait associated to destabilizing effect (Hayes et al., 2017).

As deduced from our SDS-PAGE gels and related lectin blots (Figure 4-7B,D), the production of FcγRIIIa in both cell lines led to significant N-glycosylation differences (Hayes, Frostell, et al., 2014; Hayes et al., 2017; Yagi et al., 2018; Zeck et al., 2011). Therefore, we refined our analysis of the effect of FcγRIIIa N-glycosylation by measuring the binding kinetics between TZM and FcγRIIIa glycoforms (Figure 4-9) corresponding to distinct fractions collected at each end (front and tail) of the SEC peak for FcγRIIIa (Figure 4-7B,E). Here again, the FcγRIIIa N-glycosylation differences translated into kinetic profile differences, especially for the V158 variant. These differences more likely result from a combination of macroheterogeneity (N-glycosylation of each individual site), and microheterogeneity (type of the N-glycans and terminal sugar identity). More precisely, as suggested by the SDS-PAGE and the lectin blot analysis showing a decrease of the degree of sialylation, the FcγRIIIa front pool presumably corresponded to more extensively glycosylated receptors with large (tri- and tetra-antennary structures) and highly sialylated N-glycan profiles. On the contrary, the FcγRIIIa tail pool were more likely related to receptors with smaller glycans (bi- and tri-antennary structures) and low sialylation levels. Moreover, based on the observation of Zeck *et al.*, it is highly probable that the small molecular weight fraction

contained receptors with unoccupied N-glycosylation sites (Zeck et al., 2011). This assumption is also supported by the multiple bands on the ECL lectin blot (Figure 4-7B,E).

The lectin blots also showed that the FcγRIIIa glycoforms within both fractions were different in their terminal sugars, which may influence IgG/FcγRIIIa interactions. We investigated the influence of FcγRIIIa terminal N-glycans, and more precisely sialylation, on the variations observed in Figure 4-8 and Figure 4-9. For this, a SEC fraction corresponding to monomeric coil-tagged receptor was enzymatically treated to homogenize glycans terminal sugar moieties. We did not observe a drastic influence of terminal sugars on the interaction with TZM, in contrast with the marked effect of receptor deglycosylation (Figure 4-10). Nevertheless, for each interaction, receptor desialylation led to a slight increase in the stability of the FcγRIIIa/IgG complex. Accordingly, Hayes *et al.* suggested that higher amounts of sialylation and higher-order sialylated structures are associated with less stable IgG binding (Hayes et al., 2017).

Overall, our results highlighted the complexity of the FcγRIIIa N-glycosylation influence upon IgG1 binding. The effect of FcγRIIIa N-glycosylation is indeed more complex than for IgG1, given the presence of five N-glycosylation sites, with Asn-45 and Asn-162 glycosylation being critical (Ferrara et al., 2011; Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009). The influence of the FcγRIIIa N-glycosylation on its interaction with IgG1 is highly multifactorial, except for the afucosylated IgG/FcγRIIIa binding that mainly involve carbohydrate-carbohydrate interactions. As already outlined by Yagi *et al.* for the FcγRIIIb (Yagi et al., 2018), it is thus important to investigate IgG binding to the natural glycoforms of the FcγRs in their healthy or disease states. Presently, global and site-specific N-glycosylation profiles analyses have revealed that the FcγRIIIa N-glycans are different from one N-glycosylation site to another (Yagi et al., 2018; Zeck et al., 2011). These studies investigated the influence of either N-glycosylation patterns or sites (Hayes et al., 2017; Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009). By combining both approaches, it would be interesting to determine whether a glycosylation profile at a particular site may also influence the interaction with different mAb glycoforms. Such studies would greatly benefit from the SPR experimental approach we describe here.

Indeed, our results demonstrated that our experimental SPR strategy relying on E5-tagged FcγRIIIa outperformed all other capture strategies in terms of experimental robustness, reproducibility, cost and duration. This assay is thus a significant improvement compared to the

His-tag and biotin/streptavidin based capture protocols that have been commonly used up to now (Dorion-Thibaudeau et al., 2014; Hayes, Frostell, et al., 2014; Hayes et al., 2017; Zeck et al., 2011). The assay may be further improved by rationally homogenizing FcγRIIIa preparation in order to draw refined IgG glycoform/binding relationships.

4.2.6 Materials and Methods

4.2.6.1 Plasmids and DNA

The codon-optimized sequences encoding the human ectodomains of FcγRIIIa_{F158} and FcγRIIIa_{V158} were cloned into pTT5TM vectors (Dorion-Thibaudeau et al., 2014). Both constructs contained a ten-histidine C-terminal tag. The resulting plasmids were digested and a sequence encoding BAP was inserted to give the plasmids pTT5TM-CD16aF-Bap-His and pTT5TM-CD16aV-Bap-His (Dorion-Thibaudeau et al., 2016). These were then double-digested with AgeI to remove the BAP sequence and replace it by the E5 sequence, i.e., the cDNA coding for the (EVSALEK)₅ peptide sequence, giving the final plasmids pTT5TM-CD16aF-E5-His and pTT5TM-CD16aV-E5-His. The E5 sequence was previously amplified by PCR from the plasmid pTT5TM-IL2-Ecoil-H8-VEGF constructed by Boucher *et al.*, then double digested with AgeI (Boucher et al., 2008). The optimized sequence encoding the secreted BirA enzyme (residues 1 to 359 in-frame with the bovine prolactin signal peptide) was cloned into the pTT5TM vector resulting in the plasmid pTT5TM-BirA described in Dorion-Thibaudeau *et al.* (Dorion-Thibaudeau et al., 2016).

TZM is a humanized IgG1 directed against the human epidermal growth factor receptor-2 (HER2 or Erb2), consisting of a heavy chain (HC) of the G1m17 allotype and a kappa light chain (LC) of the Km3 allotype. The non-glycosylated TZM mutant (N297Q) corresponded to the LC coupled to a TZM HC variant of the G1m17,1 allotype, with a N297Q substitution. cDNA coding for LC, HC and HC N297Q were cloned into individual pTT5TM vectors (Zhang, J. et al., 2009), as well as the cDNA corresponding to the human glycosyltransferase β1,4-galactosyltransferase 1 (GT), the bacterial enzyme GDP-4-dehydro-6-deoxy-D-mannose reductase (RMD) and a truncated human ST6Gal1 lacking its N-terminal cytoplasmic tail and its transmembrane domain. The truncated ST6Gal1 sequence was flanked by a signal peptide from vascular endothelial growth factor A for secretion and a ten-histidine tag inserted at the C-terminus to facilitate its purification. cDNA coding for the green fluorescent protein (GFP) cloned into the pTTTM vector was used as a

reporter gene to evaluate transfection efficiency, and was incorporated as 5% in weight for all transfections as described elsewhere (Durocher, Perret, & Kamen, 2002). The pTT22TM-AKT-DD plasmid is derived from pTTTM vector and encodes constitutively active bovine AKT (Alessi et al., 1996).

4.2.6.2 Cell lines

The CHO-3E7 and the HEK293-6E cell lines, stably expressing a truncated Epstein-Barr virus Nuclear Antigen-1 (EBNA1), were grown in suspension in serum-free FreeStyleTM F17 medium (Invitrogen, cat# A13835-01) supplemented with 4 mM glutamine (Sigma-Aldrich, cat# G8540), 0.1% v/v Kolliphor® P 188 (Sigma-Aldrich, cat# K4894). The HEK293-6E medium was also supplemented with 25 µg/mL of G418-Sulfate (Wisent, cat# 400-130-IG). Cultures were maintained between 0.1 and 2 x 10⁶ cells/mL in 125 mL Erlenmeyer ventilated flasks shaken at 120 rpm in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO₂. Cell density and viability were determined using a Cedex Innovatis automated cell counter (Roche), relying on a counting method based on the trypan blue exclusion method.

4.2.6.3 Monoclonal antibodies

4.2.6.3.1 Production

TZM and its non-glycosylated form (TZM-ng) were produced in CHO-3E7 by transient co-expression of the heavy and light chains at a 6:4 LC:HC ratio (Raymond et al., 2012). To enhance galactosylation (TZM-gal) or reduce core fucosylation (TZM-afuc) of the Fc N-glycans, the heavy and light chains of TZM were co-expressed with 5% in weight of GT or RMD plasmid, respectively, as described elsewhere (Raymond et al., 2015; von Horsten et al., 2010).

4.2.6.3.2 Purification

Cell cultures were centrifuged at 3300 x g for 20 min 4 days post-transfection (dpt) at a viability superior to 80%, then supernatants were filtered through 0.45 µm membranes. The clarified supernatants were loaded onto 4 mL MabSelectTM SuReTM columns (GE Healthcare, cat# 17-5438-02) equilibrated in phosphate-buffered saline (PBS). The columns were washed with PBS and antibodies were eluted with 100 mM citrate buffer at pH 3. The fractions containing the IgGs

were pooled and the citrate buffer was exchanged against PBS with a CentriPure P100 column (Emp Biotech, cat# CP-0119-Z001.0-001). Purified mAbs were concentrated on Amicon Ultra-4 30K centrifugal filter units (Millipore, cat# UFC803024) and were purified by SEC using a Superdex200 column (GE Healthcare, cat# 28-9893-35) to remove aggregates (Dorion-Thibaudeau et al., 2014). The column was equilibrated with HBS (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.2) and 5 mL of sample was loaded onto the column at 1.5 mL/min. HBS buffer was used to elute the proteins. The aggregate-free mAbs were individually pooled and quantified by absorbance at 280 nm using a NanodropTM spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), sterile-filtered, aliquoted and stored at -80 °C.

4.2.6.4 Fcγ receptors

4.2.6.4.1 Production

Biotin-tagged FcγRIIIa_{F158} was produced by transient co-expression with BirA enzyme in CHO-3E7 as described elsewhere (Dorion-Thibaudeau et al., 2016). For E5-tagged FcγRIIIa_{F158/V158}, CHO-3E7 cells were transfected at densities between 1.5 and 2 x 10⁶ cells/mL. DNA and transfection reagents were prepared as follows: 1 µg/mL of plasmids (25% w/w pTT5TM-CD16F-E5-His or pTT5TM-CD16V-E5-His, 5% pTToTM-GFP, 15% pTT22TM-AKT-DD and 55% ssDNA) and 5 µg/mL of linear deacylated polyethylenimine (L-PEI_{max}, Polysciences, cat# 24765) were diluted in F17 medium then L-PEI_{max} was added to DNA. The mixtures were immediately vortexed and incubated for 5 min at room temperature prior to addition to the cells. One dpt, cells were fed with TN1 peptone and valproic acid to final concentrations of 1% (w/v) and 0.5 mM, respectively. The temperature was shifted to 32 °C, and the glucose concentration was adjusted to a final concentration of 30 mM. Transfection efficiency was assessed two dpt by determining the percentage of GFP-positive cells using a Cellometer® K2 instrument (Nexcelom Bioscience). E5-tagged FcγRIIIa_{F158/V158} were also produced by transient expression in HEK293-6E as described elsewhere (Dorion-Thibaudeau et al., 2016).

4.2.6.4.2 Purification

Fc γ receptors were harvested 5 dpt, centrifuged at 3300 x g for 20 min and supernatants were filtered through 0.45 μ m membranes. The clarified supernatants were purified by IMAC with 4 mL Ni Sepharose[®] Excel columns (GE Healthcare, cat# 17-3712-03). The fractions containing the receptors were pooled and the elution buffer was exchanged against PBS with a CentriPure P100 column (Emp Biotech, cat# CP-0119-Z001.0-001). Purified Fc γ Rs were concentrated on Amicon Ultra-4 10K centrifugal filter units (Millipore, cat# UFC801024) and further purified by SEC as described above. The aggregate-free Fc γ RIIIa fractions (74 mL-to-87 mL elution fractions) were pooled, then quantified by absorbance at 280 nm using a Nanodrop[™] spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) based on their respective molar extinction coefficients, sterile-filtered, aliquoted and stored at -80 °C. For Fc γ RIIIa_{F158/V158} N-glycans analysis, two SEC were performed for each Fc γ R to remove as much aggregate as possible. At the end of the second SEC, only fractions from 74 mL to 80 mL were pooled to have highly glycosylated Fc γ Rs (non-modified).

4.2.6.4.3 Glycosidases digestions

Terminal sialic acids in all linkages (α (2,3), α (2,6), α (2,8) and α (2,9)) were removed from non-modified Fc γ RIIIa_{F158/V158} (500 μ g, 1.5 mg/mL) by the *Arthrobacter ureafaciens* Glyko[®] Sialidase A[™] (Prozyme, cat# GK80040) at 0.5 U/mL (24 h at 37 °C in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0, designated as ‘desialylated Fc γ Rs’ in the text). Desialylated Fc γ RIIIa_{F158/V158} were purified using 1 mL Ni Sepharose[®] Excel columns (GE Healthcare, cat# 17-3712-03). The elution buffer was exchanged against PBS with NAP[™]-5 columns (GE Healthcare, cat# 17-0853-02), then purified desialylated Fc γ RIIIa_{F158/V158} were concentrated on Amicon Ultra-0.5 3K centrifugal filter units (Millipore, cat# UFC500324). Terminal galactose were removed from the purified desialylated Fc γ RIIIa_{F158/V158} (150 μ g, 2 mg/mL) with the bovine testis Glyko[®] β (1-3,4)-Galactosidase (Prozyme, cat# GKX-5013) at 1 U/mL (24 h at 37 °C in 100 mM sodium citrate/phosphate pH 4.0, designated as ‘degalactosylated Fc γ Rs’ in the text). Fifty micrograms of non-modified Fc γ RIIIa_{F158/V158} (1 mg/mL) were also incubated for 24 h at 37 °C in 100 mM sodium citrate/phosphate pH 4.0 acetate (Control pH 4). N-glycans were removed from Fc γ RIIIa_{F158/V158} (40 μ g, 1 mg/mL) by PNGaseF (New England BioLabs, cat# P0704S) at 75 U/ μ L (24 h at 37 °C in 50 mM sodium phosphate pH 7.5 (designated as ‘deglycosylated Fc γ Rs’ in the text).

4.2.6.4.4 *In vitro* sialylation

Desialylated FcγRIIIa_{F158/V158} were *in vitro* α(2,6)-sialylated using a truncated human ST6Gal1 (designated as ‘sialylated ST6 FcγRs’ in the text) expressed in HEK293-6E and purified by IMAC (data not shown). The *in vitro* sialylation method was adapted from the protocol published by Barb *et al.* (Barb *et al.*, 2012). A ratio of 1:6 enzyme:FcγRIIIa (w/w) was used. The FcγRIIIa at 1-1.5 mg/mL was sialylated with ST6Gal1 in presence of CMP-N-acetylneuraminic acid (CMP-NANA, Roche, cat# 05974003103) at 1 mM in 25 mM MOPS buffer, KCl 100 mM at pH 7.2, at 37 °C. After 24 hours, the reaction mixture was concentrated 10-fold on Amicon Ultra-0.5 mL with a 3 kDa cut-off (Millipore, cat#UFC500324) to eliminate the free CMP. The volume was readjusted to its initial value and a fresh aliquot of CMP-NANA was added to a final concentration of 1 mM. This 24-hours cycle was repeated three times. The same protocol was used to *in vitro* α(2,3)-sialylate the non-modified FcγRIIIa_{F158/V158} using an α-2,3-sialyltransferase (Roche, cat# 07429916103) (designated as ‘sialylated ST3 FcγRs’ in the text).

4.2.6.5 Coomassie-stained gels and Western blots

Samples corresponding to each purification step as well as purified FcγRs were loaded onto NuPAGE Novex 4-12% gels (Invitrogen, cat# NP0329BOX) under non-reducing conditions and ran in MES buffer at 170 V for 60 min. Excepted for supernatants, flow-throughs and wash samples, 1.5 µg of proteins per well were loaded. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue for 15 minutes, then destained for 3 h in a solution made of acetic acid 7.5% (v/v) and ethanol 20% (v/v). For Western blotting, proteins were transferred to a 0.2 µm nitrocellulose membrane for 7 min using Trans-Blot® Turbo™ RTA Kit (Bio-Rad, cat# 170-4271) and Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, cat# 170-4150). The membranes were incubated one hour in blocking reagent (Sigma-Aldrich, cat# 11921673001), and then probed with Penta-His™ Alexa Fluor® 488 Conjugate (Qiagen, cat# 35310) for one hour. Pictures were recorded with a Chemidoc MP Imaging System (Bio-Rad).

4.2.6.6 Lectin blots

Biotinylated ECL, MALII, SNA and LCA (Vector Laboratories, cat# ECL: B-1145, MALII: B-1265, SNA: B-1305, LCA: B-1045, respectively) were used to evaluate N-glycosylation of FcγRIIIa_{F158/V158}. Samples were treated with dithiothreitol (10 min at 70 °C) and 1 µg were loaded

onto NuPAGE Novex 4-12% gels (Invitrogen, cat# NP0329BOX). After protein transfer, the nitrocellulose membrane was incubated one hour in blocking reagent, then with a given lectin for two hours (5 µg/mL ECL, 5 µg/mL MALII, 2 µg/mL SNA or 10 µg/mL LCA), followed by incubation with 1:2000 Streptavidin-horseradish peroxidase (BD Biosciences, cat# 554066) for one hour. The membranes were thoroughly washed with PBS-Tween 0.1% before each incubation step. Ponceau red staining was performed to control the amount of protein loaded. Signal was revealed with the ImmunStar™ Western C™ Substrate Kit (Bio-Rad, cat# 170-5070) and the images recorded with a Chemidoc MP Imaging System (Bio-Rad).

4.2.6.7 Surface plasmon resonance analysis

4.2.6.7.1 General

SPR data experiments were performed with a Biacore T100 system (GE Healthcare) and HBS-EP+ (10 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM ethylenediaminetetraacetic acid, and 0.05 % [v/v] surfactant P20, pH 7.4) as running buffer. Analysis and sample compartment temperatures were set to 25 °C and 4 °C, respectively. The SPR experiments were performed on research-grade CM5 and CM3 sensor chips. HBS-EP+ (cat# BR100669), Biotin CAPture kit (cat# 28920234), His Capture kit (cat# 28995056), Series S Sensor chip CM5 (cat# 29104988) and Series S Sensor chip CM3 (cat# 29104990) were all from GE Healthcare.

4.2.6.7.2 Fcγ receptor capture

His Capture kit was used to capture His-tagged FcγR as described elsewhere (Dorion-Thibaudau et al., 2014). Biotin-tagged FcγR was captured using the biotin CAPture kit, which relied on a streptavidin coating mediated by oligonucleotide interactions, as described by Dorion-Thibaudau *et al.* (Dorion-Thibaudau et al., 2016), or two alternate approaches relying on the E5/K5 peptide interactions (see below for detailed methods and Figure 4-1A).

4.2.6.7.2.1 K5 immobilization on SPR surfaces

Cysteine-tagged K5 (CGG-[KVSALKE]₅) and E5 ([EVSALEK]₅) peptides were synthesized by the peptide facility at University of Colorado (Litowski & Hodges, 2001). Cysteine-tagged K5

peptides were covalently immobilized on carboxymethyl-dextran sensor surface at about 1500 RUs on mock and experiment flow cells as described by Murschel *et al.* (Murschel *et al.*, 2013).

4.2.6.7.2.2 Biotinylated Fc γ receptor capture on K5 surfaces

Biotinylated E5 peptide was generated by mixing 100 μ L of phosphate buffer (100 mM, pH 7.0), 20 μ L of biotin-maleimide (Sigma-Aldrich, cat# B1267, at 5 mg/mL diluted in DMSO) and 200 μ L of cysteine-tagged E5 peptide (110 μ M) for 2 h under agitation and in the dark. The resulting biotinylated E5 peptide was dialyzed against milliQ water (cut-off 1 kDa). Tethering of the biotinylated Fc γ RIIIa_{F158} was performed by injecting *i*) the biotinylated E5 peptide (1 nM, flow rate of 10 μ L/min for 2 min) over a K5 peptide surface (see above), which resulted in $\approx$ 8 RUs accumulation, *ii*) streptavidin (Sigma-Aldrich, cat# S4762) at a concentration of 100 nM at a flow rate of 10 μ L/min for 30 s ($\approx$ 60 RUs accumulation), and *iii*) biotin-tagged Fc γ RIIIa_{F158} (5 μ g/mL) at a flow rate of 10 μ L/min for 150 s ($\approx$ 50 RUs accumulation). The surfaces were regenerated (through the dissociation of the coiled-coil interactions) with three 30 s injections of 6 M guanidine/HCl at 100 μ L/min. No receptor was injected over the reference surface used for kinetic studies.

4.2.6.7.2.3 E5-tagged Fc γ receptor capture on K5 surfaces

E5-tagged Fc γ RIIIa_{F158/V158} were injected over the K5 surfaces at a flow rate of 10 μ L/min for 15 s (Fc γ RIIIa_{F158} at 1 μ g/mL resulted in $\approx$ 85 RUs accumulation; Fc γ RIII_{V158} at 0.5 μ g/mL resulted in $\approx$ 50 RUs accumulation), while no receptor was injected over the reference surface used for kinetic studies. The surfaces were regenerated with one 15 s injection of 6 M guanidine/HCl at 100 μ L/min.

4.2.6.7.3 TZM/Receptor analysis

For steady-state analyses, TZM solutions were injected over captured Fc γ RIIIa (approximately 30 RUs captured in this case) and control surfaces at concentrations from 40 to 4,000 nM (F158) and from 20 to 2,000 nM (V158) at a flow rate of 50 μ L/min. The complex was allowed to associate for 240 s (F158) or 420 s (V158) and dissociate for 360 s (F158) or 580 s (V158). Unless otherwise stated, to compare Fc γ R capture methods, TZM solutions were injected over captured Fc γ RIIIa_{F158} and control surfaces either at five concentrations (10, 30, 100, 300 and

1,000 nM) or one concentration (1,000 nM) at a flow rate of 50 μ L/min. The complex was allowed to associate for 120 s and dissociate for 240 s. Triplicate injections (random) of each sample and buffer blank were performed over the two surfaces. Assays were performed with freshly thawed capture reagents, ligand and analyte.

4.2.6.8 Data analysis

4.2.6.8.1 General

Data were collected at a rate of 10 Hz. Prior to analysis, sensorgrams were double-referenced using BiaEvaluation 3.1 software, by subtracting data from the reference flow cell, and then subtracting a blank cycle where buffer was injected instead of protein sample. To reduce the influence of spikes in data analysis, 1 s of data was removed at injection start and stop.

4.2.6.8.2 Similarity score

To mathematically assess sensorgrams reproducibility, similarity scores were calculated for each experiment using distance measurements by adapting the procedure described by Karlsson *et al.* (Figure 4-1B and Equation 1) (Karlsson et al., 2016). More specifically, similarity scores were calculated for the TZM injection and dissociation phases. Double-referenced data were used to assess capture stability while double-referenced normalized data were used to assess assay reproducibility and K5 surface stability.

Similarity score = % points inside limits + % points outside limits * (SSQ_{limit} distance to average / SSQ_{sample} distance to average) (1)

4.2.7 Disclosure of potential conflicts of interest

The authors report no conflict of interest.

4.2.8 Acknowledgement

We thank Gilles Saint-Laurent and Christian Gervais for technical support and fruitful discussions. Figure 1 was produced using Servier Medical Art.

4.2.9 Funding

This work was initially supported by the Canada Research Chair on Protein-Enhanced Biomaterials (GDC), the NSERC discovery program (GDC) and the National Research Council Canada: Human Health Therapeutics Research Center (YD).

4.2.10 References

- Ahmed, A. A., Giddens, J., Pincetic, A., Lomino, J. V., Ravetch, J. V., Wang, L.-X., & Bjorkman, P. J. (2014). Structural characterization of anti-inflammatory immunoglobulin G Fc proteins. *J. Mol. Biol.*, 426(18), 3166-3179. doi:10.1016/j.jmb.2014.07.006
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., & Hemmings, B. A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.*, 15(23), 6541-6551. doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb01045.x
- Barb, A. W., Meng, L., Gao, Z., Johnson, R. W., Moremen, K. W., & Prestegard, J. H. (2012). NMR characterization of immunoglobulin G Fc glycan motion on enzymatic sialylation. *Biochemistry*, 51(22), 4618-4626. doi:10.1021/bi300319q
- Boucher, C., Ruiz, J.-C., Thibault, M., Buschmann, M. D., Wertheimer, M. R., Jolicoeur, M., . . . De Crescenzo, G. (2010). Human corneal epithelial cell response to epidermal growth factor tethered via coiled-coil interactions. *Biomaterials*, 31(27), 7021-7031. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.072
- Boucher, C., St-Laurent, G., Jolicoeur, M., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2010). Protein detection by Western blot via coiled-coil interactions. *Analytical biochemistry*, 399(1), 138-140. doi:10.1016/j.ab.2009.12.007
- Boucher, C., St-Laurent, G., Loignon, M., Jolicoeur, M., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2008). The bioactivity and receptor affinity of recombinant tagged EGF designed for tissue engineering applications is defined by the nature and position of the tags. *Tissue Eng Part A*, 14(12), 2069-2077. doi:10.1089/ten.tea.2008.0037
- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D. A., Fernandez, N., Jorieux, S., & Daëron, M. (2009). Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, 113(16), 3716-3725. doi:10.1182/blood-2008-09-179754
- Cosgrave, E. F. J., Struwe, W. B., Hayes, J. M., Harvey, D. J., Wormald, M. R., & Rudd, P. M. (2013). N-linked glycan structures of the human Fcγ receptors produced in NS0 cells. *J. Proteome Res.*, 12(8), 3721-3737. doi:10.1021/pr400344h
- De Crescenzo, G., Litowski, J. R., Hodges, R. S., & O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain

- length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. *Biochemistry*, 42(6), 1754-1763. doi:10.1021/bi0268450
- De Crescenzo, G., Pham, P. L., Durocher, Y., Chao, H., & O'Connor-McCourt, M. D. (2004). Enhancement of the antagonistic potency of transforming growth factor- β receptor extracellular domains by coiled coil-induced homo-and heterodimerization. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26013-26018. doi:10.1074/jbc.M400655200
- De Crescenzo, G., Pham, P. L., Durocher, Y., & D O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Transforming growth factor-beta (TGF- β) binding to the extracellular domain of the type II TGF- β receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding. *Journal of molecular biology*, 328(5), 1173-1183. doi:10.1016/S0022-2836(03)00360-7
- Dorion-Thibaudeau, J., Raymond, C., Lattova, E., Perreault, H., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2014). Towards the development of a surface plasmon resonance assay to evaluate the glycosylation pattern of monoclonal antibodies using the extracellular domains of CD16a and CD64. *J. Immunol. Methods*, 408, 24-34. doi:10.1016/j.jim.2014.04.010
- Dorion-Thibaudeau, J., St-Laurent, G., Raymond, C., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2016). Biotinylation of the Fc gamma receptor ectodomains by mammalian cell co-transfection: application to the development of a surface plasmon resonance-based assay. *J. Mol. Recognit.*, 29(2), 60-69. doi:10.1002/jmr.2495
- Durocher, Y., Perret, S., & Kamen, A. (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.*, 30(2), E9. doi:10.1093/nar/30.2.e9
- Ferrara, C., Grau, S., Jager, C., Sondermann, P., Brunker, P., Waldhauer, I., . . . Benz, J. (2011). Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcgammaRIII and antibodies lacking core fucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(31), 12669-12674. doi:10.1073/pnas.1108455108
- Ferrara, C., Stuart, F., Sondermann, P., Brunker, P., & Umana, P. (2006). The carbohydrate at FcgammaRIIIa Asn-162. An element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms. *J. Biol. Chem.*, 281(8), 5032-5036. doi:10.1074/jbc.M510171200
- Fortier, C., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2013). A versatile coiled-coil tethering system for the oriented display of ligands on nanocarriers for targeted gene delivery. *Biomaterials*, 34(4), 1344-1353. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.10.047
- Frank, M., Walker, R. C., Lanzilotta, W. N., Prestegard, J. H., & Barb, A. W. (2014). Immunoglobulin G1 Fc domain motions: implications for Fc engineering. *J. Mol. Biol.*, 426(8), 1799-1811. doi:10.1016/j.jmb.2014.01.011
- Galon, J., Robertson, M. W., Galinha, A., Mazières, N., Spagnoli, R., Fridman, W. H., & Sautès, C. (1997). Affinity of the interaction between Fcgamma receptor type III (Fc γ RIII) and

- monomeric human IgG subclasses. Role of Fc γ RIII glycosylation. *European journal of immunology*, 27(8), 1928-1932. doi:10.1002/eji.1830270816
- Haryadi, R., Zhang, P., Chan, K. F., & Song, Z. (2013). CHO-gmt5, a novel CHO glycosylation mutant for producing afucosylated and asialylated recombinant antibodies. *Bioengineered*, 4(2), 90-94. doi:10.4161/bioe.22262
- Hayes, J. M., Frostell, A., Cosgrave, E. F., Struwe, W. B., Potter, O., Davey, G. P., . . . Rudd, P. M. (2014). Fc gamma receptor glycosylation modulates the binding of IgG glycoforms: a requirement for stable antibody interactions. *J. Proteome Res.*, 13(12), 5471-5485. doi:10.1021/pr500414q
- Hayes, J. M., Frostell, A., Karlsson, R., Muller, S., Martin, S. M., Pauers, M., . . . Rudd, P. M. (2017). Identification of Fc Gamma Receptor Glycoforms That Produce Differential Binding Kinetics for Rituximab. *Mol. Cell. Proteomics*, 16(10), 1770-1788. doi:10.1074/mcp.M117.066944
- Houde, D., Peng, Y., Berkowitz, S. A., & Engen, J. R. (2010). Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *Mol. Cell. Proteomics*, 9(8), 1716-1728. doi:10.1074/mcp.M900540-MCP200
- Jefferis, R. (2007). Antibody therapeutics: isotype and glycoform selection. *Expert Opin Biol Ther*, 7(9), 1401-1413. doi:10.1517/14712598.7.9.1401
- Jefferis, R. (2010). The antibody paradigm: present and future development as a scaffold for biopharmaceutical drugs. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 26, 1-42. doi:10.5661/bger-26-1
- Kanda, Y., Yamada, T., Mori, K., Okazaki, A., Inoue, M., Kitajima-Miyama, K., . . . Kakita, S. (2006). Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types. *Glycobiology*, 17(1), 104-118. doi:10.1093/glycob/cwl057
- Kaplon, H., & Reichert, J. M. (2018). Antibodies to watch in 2019. *MAbs*. doi:10.1080/19420862.2018.1556465
- Karlsson, R., Pol, E., & Frostell, A. (2016). Comparison of surface plasmon resonance binding curves for characterization of protein interactions and analysis of screening data. *Anal. Biochem.*, 502, 53-63. doi:10.1016/j.ab.2016.03.007
- Lejeune, J., Thibault, G., Cartron, G., Ohresser, M., & Watier, H. (2010). [Implications of receptors for the Fc portion of IgG (Fc γ Rs) in mechanism of action of therapeutic antibodies]. *Bull Cancer*, 97(5), 511-522. doi:10.1684/bdc.2010.1077
- Li, P., Jiang, N., Nagarajan, S., Wohlueter, R., Selvaraj, P., & Zhu, C. (2007). Affinity and kinetic analysis of Fc γ receptor IIIa (CD16a) binding to IgG ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 282(9), 6210-6221. doi:10.1074/jbc.M609064200

- Li, T., DiLillo, D. J., Bournazos, S., Giddens, J. P., Ravetch, J. V., & Wang, L. X. (2017). Modulating IgG effector function by Fc glycan engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(13), 3485-3490. doi:doi:10.1073/pnas.1702173114
- Liberelle, B., Bartholin, L., Boucher, C., Murschel, F., Jolicoeur, M., Durocher, Y., . . . De Crescenzo, G. (2010). New ELISA approach based on coiled-coil interactions. *Journal of immunological methods*, 362(1), 161-167. doi:10.1016/j.jim.2010.09.027
- Litowski, J. R., & Hodges, R. S. (2001). Designing heterodimeric two-stranded α -helical coiled-coils: the effect of chain length on protein folding, stability and specificity. *The Journal of peptide research*, 58(6), 477-492. doi:10.1034/j.1399-3011.2001.10972.x
- Lu, J., Chu, J., Zou, Z., Hamacher, N. B., Rixon, M. W., & Sun, P. D. (2015). Structure of Fc γ RI in complex with Fc reveals the importance of glycan recognition for high-affinity IgG binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(3), 833-838. doi:doi:10.1073/pnas.1418812112
- Mizushima, T., Yagi, H., Takemoto, E., Shibata-Koyama, M., Isoda, Y., Iida, S., . . . Kato, K. (2011). Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans. *Genes Cells*, 16(11), 1071-1080. doi:10.1111/j.1365-2443.2011.01552.x
- Murschel, F., Liberelle, B., St-Laurent, G., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2013). Coiled-coil-mediated grafting of bioactive vascular endothelial growth factor. *Acta Biomater*, 9(6), 6806-6813. doi:10.1016/j.actbio.2013.02.032
- Myszka, D. G. (1997). Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Current opinion in biotechnology*, 8(1), 50-57. doi:10.1016/S0958-1669(97)80157-7
- Okazaki, A., Shoji-Hosaka, E., Nakamura, K., Wakitani, M., Uchida, K., Kakita, S., . . . Shitara, K. (2004). Fucose depletion from human IgG1 oligosaccharide enhances binding enthalpy and association rate between IgG1 and Fc γ RIIIa. *J. Mol. Biol.*, 336(5), 1239-1249. doi:10.1016/j.jmb.2004.01.007
- Radaev, S., & Sun, P. (2002). Recognition of immunoglobulins by Fc γ receptors. *Mol Immunol*, 38(14), 1073-1083. doi:10.1016/S0161-5890(02)00036-6
- Raymond, C., Robotham, A., Kelly, J., Lattova, E., Perreault, H., & Durocher, Y. (2012). Production of highly sialylated monoclonal antibodies. Dans S. Petrescu (édit.), *Glycosylation*: IntechOpen Publisher.
- Raymond, C., Robotham, A., Spearman, M., Butler, M., Kelly, J., & Durocher, Y. (2015). Production of alpha2,6-sialylated IgG1 in CHO cells. *MAbs*, 7(3), 571-583. doi:10.1080/19420862.2015.1029215
- Shibata-Koyama, M., Iida, S., Misaka, H., Mori, K., Yano, K., Shitara, K., & Satoh, M. (2009). Nonfucosylated rituximab potentiates human neutrophil phagocytosis through its high binding

- for FcγRIIIb and MHC class II expression on the phagocytotic neutrophils. *Exp Hematol*, 37(3), 309-321. doi:10.1016/j.exphem.2008.11.006
- Shibata-Koyama, M., Iida, S., Okazaki, A., Mori, K., Kitajima-Miyama, K., Saitou, S., . . . Satoh, M. (2009). The N-linked oligosaccharide at Fc gamma RIIIa Asn-45: an inhibitory element for high Fc gamma RIIIa binding affinity to IgG glycoforms lacking core fucosylation. *Glycobiology*, 19(2), 126-134. doi:10.1093/glycob/cwn110
- Sondermann, P., & Szymkowski, D. E. (2016). Harnessing Fc receptor biology in the design of therapeutic antibodies. *Curr Opin Immunol*, 40, 78-87. doi:10.1016/j.coi.2016.03.005
- Spearman, M., Dionne, B., & Butler, M. (2011). The Role of Glycosylation in Therapeutic Antibodies. Dans M. Al-Rubeai (édit.), *Antibody Expression and Production* (vol. 7, p. 251-292): Springer.
- Subedi, G. P., & Barb, A. W. (2016). The immunoglobulin G1 N-glycan composition affects binding to each low affinity Fc gamma receptor. *MAbs*, 8(8), 1512-1524. doi:10.1080/19420862.2016.1218586
- Subedi, G. P., Hanson, Q. M., & Barb, A. W. (2014). Restricted motion of the conserved immunoglobulin G1 N-glycan is essential for efficient FcγRIIIa binding. *Structure*, 22(10), 1478-1488. doi:10.1016/j.str.2014.08.002
- Takahashi, N., Cohen-Solal, J., Galinha, A., Fridman, W. H., Sautes-Fridman, C., & Kato, K. (2002). N-glycosylation profile of recombinant human soluble Fcγgamma receptor III. *Glycobiology*, 12(8), 507-515. doi:10.1093/glycob/cwf063
- Thomann, M., Schlothauer, T., Dashivets, T., Malik, S., Avenal, C., Bulau, P., . . . Reusch, D. (2015). In vitro glycoengineering of IgG1 and its effect on Fc receptor binding and ADCC activity. *Plos One*, 10(8). doi:10.1371/journal.pone.0134949
- von Horsten, H. H., Ogorek, C., Blanchard, V., Demmler, C., Giese, C., Winkler, K., . . . Sandig, V. (2010). Production of non-fucosylated antibodies by co-expression of heterologous GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase. *Glycobiology*, 20(12), 1607-1618. doi:10.1093/glycob/cwq109
- Warnock, D., Bai, X., Autote, K., Gonzales, J., Kinealy, K., Yan, B., . . . Bayer, R. J. (2005). In vitro galactosylation of human IgG at 1 kg scale using recombinant galactosyltransferase. *Biotechnology and bioengineering*, 92(7), 831-842. doi:10.1002/bit.20658
- Yagi, H., Takakura, D., Roumenina, L. T., Fridman, W. H., Sautes-Fridman, C., Kawasaki, N., & Kato, K. (2018). Site-specific N-glycosylation analysis of soluble Fcγgamma receptor IIIb in human serum. *Sci. Rep.*, 8(1), 2719. doi:10.1038/s41598-018-21145-y
- Yamane-Ohnuki, N., Kinoshita, S., Inoue-Urakubo, M., Kusunoki, M., Iida, S., Nakano, R., . . . Satoh, M. (2004). Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnol. Bioeng.*, 87(5), 614-622. doi:10.1002/bit.20151

- Zeck, A., Pohlentz, G., Schlothauer, T., Peter-Katalinic, J., & Regula, J. T. (2011). Cell type-specific and site directed N-glycosylation pattern of FcγRIIIa. *J. Proteome Res.*, *10*(7), 3031-3039. doi:10.1021/pr1012653
- Zhang, J., Liu, X., Bell, A., To, R., Baral, T. N., Azizi, A., . . . Durocher, Y. (2009). Transient expression and purification of chimeric heavy chain antibodies. *Protein Expr. Purif.*, *65*(1), 77-82. doi:10.1016/j.pep.2008.10.011
- Zhang, P., Woen, S., Wang, T., Liao, B., Zhao, S., Chen, C., . . . Rudd, P. M. (2016). Challenges of glycosylation analysis and control: an integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs. *Drug Discov. Today*, *21*(5), 740-765. doi:10.1016/j.drudis.2016.01.006

CHAPITRE 5 ARTICLE 2: IMPACT OF IGG1 N-GLYCOSYLATION ON THEIR INTERACTION WITH FC GAMMA RECEPTORS

5.1 Article presentation

Dans cette section est repris l'article intitulé *Impact of IgG1 N-glycosylation on their interaction with Fc gamma receptors*, qui a été soumis dans le journal *Scientific Reports* en juin 2019.

La N-glycosylation des anticorps monoclonaux est considérée comme un attribut de qualité critique. En effet, il est parfaitement établi que le profil de N-glycosylation des anticorps monoclonaux impacte leurs propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. En particulier, il a été démontré que la N-glycosylation des IgG1 est essentielle pour l'interaction avec les FcγR. De plus, le glycoprofil de l'IgG1 influence l'affinité pour le FcγRIIIa et conséquemment les fonctions effectrices et l'efficacité thérapeutique des anticorps monoclonaux. Néanmoins, les impacts respectifs de la galactosylation et la sialylation restent ambigus. Cette ambiguïté est attribuable entre autres à la diversité des méthodes utilisées pour évaluer les affinités et les activités biologiques ainsi que le manque de caractérisation précise des glycanes. Dans ce contexte, nous avons généré et finement caractérisé un large panel de glycoformes d'IgG1 dont les différences reposent sur les niveaux de fucosylation, de galactosylation terminale et de sialylation terminale (α2,6). Puis, nous avons analysé l'interaction des glycoformes d'IgG1 pour les FcγR à l'aide de l'essai SPR développé précédemment ainsi que par un essai cellulaire permettant de mesurer le niveau d'activation de l'ADCC. Globalement, nous avons observé que les glycoformes d'IgG1 ayant un niveau réduit de fucosylation ont une affinité plus élevée pour le FcγRIIIa, menant à une augmentation significative de la réponse ADCC. Dans une moindre mesure, nous avons montré que l'ajout de deux galactoses terminaux augmente légèrement l'affinité pour le FcγRIIIa. Finalement, nous avons observé que les résultats obtenus avec l'analyse SPR sont parfaitement retranscrits dans les réponses ADCC obtenues avec l'essai cellulaire.

5.2 Impact of IgG1 N-glycosylation on their interaction with Fc gamma receptors

Florian Cambay^{1,2}, Céline Raymond^{2,3,5}, Denis Brochu⁴, Michel Gilbert⁴, The Minh Tu², Christiane Cantin², Anne Lenferink², Maxime Grail¹, Olivier Henry¹, Gregory De Crescenzo^{1*} and Yves Durocher^{2,3*}

¹Department of Chemical Engineering, Polytechnique Montréal; Montreal, Canada

²Human Health Therapeutics Research Centre, National Research Council of Canada; Montreal, Canada

³Department of Biochemistry and Molecular Medicine; University of Montreal; Montreal, Canada

⁴Human Health Therapeutics Research Centre, National Research Council of Canada; Ottawa, Canada

⁵Current address: Merck Biodevelopment, 33650 Martillac, France

*Corresponding authors: Yves.Durocher@cnrc-nrc.gc.ca and gregory.decrescenzo@polymtl.ca

5.2.1 Abstract

It is well-known that the N-glycosylation of an antibody's Fc portion alters its effector functions. Particularly, the absence of core fucosylation is known to increase the affinity of human IgGs (hIgGs) for the human Fcγ receptor (FcγR) IIIa expressed by immune cells, in turn translating in an improvement in the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). However, the impact of galactosylation and sialylation upon IgG binding is still unclear. In this study, we have investigated the influence of high and low levels of core fucosylation, terminal galactosylation and terminal α2,6-sialylation of the Fc N-glycan on its affinity for the FcγRIIIa. To this end, a large panel of monoclonal antibody glycoforms (i.e., highly α2,6-sialylated or galactosylated IgGs, with high or low levels of core fucosylation), were generated and their glycoprofiles were thoroughly

characterized, while their interactions with the Fc γ Rs were analysed by a robust surface plasmon resonance (SPR)-based assay as well as in a surrogate cell-based ADCC assay. Overall, IgG glycoforms with reduced fucosylation display a stronger affinity for the Fc γ RIIIa, which translates into a significant improvement in ADCC response. In addition, fucosylation, and the presence of terminal galactose and sialic acids in the IgG Fc portion are shown to increase the affinity for the Fc γ RIIIa as compared to agalactosylated forms. These observations perfectly translate in the cellular response observed in the ADCC assay.

5.2.2 Introduction

Monoclonal antibodies (mAbs) represent a major class of biotherapeutics. They are mostly recombinant IgG1 produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells (Walsh, 2018). Their efficacy relies in part on the ability to trigger cellular effector functions by binding, through their Fc region, to the Fc γ receptors (Fc γ Rs) present at the surface of the immune cells (Jiang et al., 2011). There are three distinct types of Fc γ Rs: the type I receptor (Fc γ RI) which is a high affinity receptor for hIgGs (apparent K_D of $10^{-8} - 10^{-9}$ M) while the type II (Fc γ RIIa-c) and type III (Fc γ RIIIa/b) receptors display much lower affinities (apparent K_{DS} of $\approx 10^{-6} - 10^{-7}$ M) (Bruhns et al., 2009; Lu et al., 2015). The triggering of cellular effector functions such as antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP), and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) depends on the immune cells and the type(s) of Fc γ Rs they express and that are involved in the interaction with the Fc region of a hIgG. The ADCC is mediated by the interaction of a hIgG-Fc with the activating Fc γ RIIIa expressed on the cell surface of primarily natural killer (NK) cells, although monocytes, macrophages, neutrophils, eosinophils and dendritic cells also express this receptor. The Fc γ RIIIa has two polymorphic variants, with the residue at position 158 either being a valine (V158) or a phenylalanine (F158), with the V158 variant displaying a much higher affinity for hIgGs than the F158 variant (Bruhns et al., 2009; Dekkers et al., 2017). The expression of the high-affinity V158 variant (genotype V/V158) is present in $\sim 10-15$ %, while the low-affinity F158 variant is found in > 85 % of the population (genotypes V/F158 or F/F158). Of these variants, the V/V158 genotype has been associated *in vivo* with a better anti-CD20 antibody-induced ADCC (Cartron et al., 2002).

Human IgG1 possesses two N-glycans on the asparagine 297 of each of the heavy chain and their presence are necessary for Fc binding to Fc γ RIIIa (Dorion-Thibaudeau et al., 2014; Dorion-

Thibaudeau et al., 2016; Yamaguchi et al., 2006). Moreover, the affinity of hIgGs for both FcγRIIIa variants is particularly sensitive to the absence of fucosylation on the Fc N297 glycan, which drastically increases its affinity for the FcγRIIIa receptor (Shields et al., 2002; Shinkawa et al., 2003), which consequently translates in an increased capacity to elicit an ADCC response (Shields et al., 2002). This interaction is particularly complex, as it depends on protein-protein, protein-glycan and glycan-glycan contacts (Ferrara et al., 2011; Mizushima et al., 2011). More precisely, the FcγRIIIa N162 glycan is directly involved in the interaction with the afucosylated hIgG1 (Ferrara et al., 2011) while other studies have also highlighted the influence of FcγRIIIa N-glycans on IgG binding kinetics (Edberg & Kimberly, 1997; Hayes et al., 2017; Subedi & Barb, 2018; Zeck et al., 2011). Over 70% of all hIgGs in circulation are fucosylated and the cells used for the production of recombinant protein mainly produce highly fucosylated IgGs. For example, fucosylation levels of 90-95 % is typically achieved in CHO cell-produced IgG1s (Arnold et al., 2007; Raju, 2008). Therefore, afucosylated antibodies must be obtained through process and cellular engineering strategies. These include kifunensine supplementation (van Berkel et al., 2010), GDP-fucose synthesis-defective cells (CHO Lec13) (Shields et al., 2002), the use of fucosyltransferase VIII (FUT8) gene knockout cells (Yamane-Ohnuki et al., 2004), FUT8 inhibitors (Rillahan et al., 2012), and through the co-expression of β-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase (GnTIII) and Golgi α-mannosidase (ManII) (Ferrara, Brunker, et al., 2006) or enzymes deflecting the GDP-fucose biosynthesis pathway (e.g., bacterial GDP-6-deoxy-D-talose synthetase [GTS] (Kelly et al., 2018) or GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase [RMD] (von Horsten et al., 2010)).

Unlike fucosylation, the respective effects of terminal galactose or sialic acid on FcγR binding are still rather ambiguous. For example it has been reported that differences in terminal galactosylation levels do not correlate with an increased ADCC activity (Boyd et al., 1995; Shinkawa et al., 2003) whereas other studies described a positive influence (Dekkers et al., 2017; Thomann et al., 2015; Wada et al., 2019). In parallel, several recent studies have demonstrated the beneficial effect of terminal galactose on the affinity of hIgG1 for the FcγRIIIa as well as other low-affinity FcγRs (Ahmed et al., 2014; Dashivets et al., 2015; Dekkers et al., 2017; Dorion-Thibaudeau et al., 2016; Subedi & Barb, 2016; Thomann et al., 2015; Wada et al., 2019; Yamaguchi et al., 2006). In contrast, interactions with FcγRI were reported to be unaffected by the

IgG N-glycan variations (Dashivets et al., 2015; Dekkers et al., 2017; Subedi & Barb, 2016; Thomann et al., 2015).

Terminal sialylation may confer anti-inflammatory properties to hIgGs while reducing their affinity for Fc γ RIIIa and their ability to induce ADCC activity (Anthony et al., 2008; Dekkers et al., 2017; Kaneko et al., 2006; Li, T. et al., 2017). This negative correlation between sialylation and Fc γ RIIIa binding has also been observed by others (Naso et al., 2010; Scallon et al., 2007; Wada et al., 2019). In contrast, some recent studies reported that α 2,6-sialylation has almost no influence on IgG/Fc γ RIIIa interactions when compared to hIgG galactosylation (Dashivets et al., 2015; Peipp et al., 2008; Shivatare et al., 2018; Subedi & Barb, 2016; Thomann et al., 2015). On the other hand, it has been suggested that galactosylation and sialylation positively influences the complement-dependent cytotoxicity (CDC) response (Dekkers et al., 2017; Peschke et al., 2017; Wada et al., 2019).

These ambiguities are largely attributable to the discrepancies in the methods used for evaluating affinities and biological activity (Dekkers et al., 2017; Li, T. et al., 2017; Subedi & Barb, 2016; Thomann et al., 2015), the lack of a systematic in-depth glycan characterization as well as the variability in the type and level of sialylation. For example, in CHO cells, glycoproteins are typically undergalactosylated and only traces of sialic acids can be detected (Jefferis, 2009b). In addition, given that N-glycosylation is cell-type dependent, specific glycan epitopes can be favoured depending on the expression system used. For example, N-glycans from CHO cells display only α 2,3-sialylation whereas α 2,6- and to a lesser extent α 2,3-sialylation are found in mouse and human cell lines (Anthony et al., 2008; Arnold et al., 2007; Durocher & Butler, 2009; Lalonde & Durocher, 2017; Lee, Roth, & Paulson, 1989).

Three major approaches have been used to enhance the terminal galactosylation and α 2,6-sialylation of hIgGs: (i) *in vitro* enzymatic glycan remodelling, (ii) chemoenzymatic glycoengineering and, (iii) transient over-expression of glycosyltransferases such as β 4GT1 and ST6Gal1. The *in vitro* enzymatic addition of galactose and sialic acid residues on purified mAbs leads to the enrichment of digalactosylated or disialylated N-glycans but does not improve the heterogeneity of the final product. This approach is also very time-consuming and expensive (Anthony et al., 2008; Barb et al., 2012; Dashivets et al., 2015; Peipp et al., 2008; Peschke et al., 2017; Raju et al., 2001; Subedi & Barb, 2016; Thomann et al., 2015; Yamaguchi et al., 2006).

Chemoenzymatic glycoengineering is a much less time-consuming method which also leads to a more homogeneous product in terms of glycosylation (Kuroguchi et al., 2015; Li, T. et al., 2017; Lin et al., 2015; Shivatare et al., 2018; Tsukimura et al., 2017; Wada et al., 2019). Lastly, glycoengineering by transient over-expression of human β 4GT1 and ST6Gal1 allows for a fast production of hIgGs enriched in galactose and α 2,6-sialylated residues (Dekkers et al., 2016; Raymond et al., 2015). Nonetheless, the drawback of this approach is that it results in a final product with some degree of heterogeneity and a low level of mono- α 2,6-sialylation.

To unravel the influence of IgG-Fc N-glycans on their affinity for the Fc γ Rs, we generated eight hIgG1 Trastuzumab (TzM) glycovariants displaying well-characterized levels of core fucose, terminal galactosylation and terminal α 2,6-sialylation on the N-glycans present in the IgG's Fc portion. These TzM glycoforms were produced in CHO cells by transient co-expression of various combinations of human β 4GT1 and ST6Gal1, and bacterial GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase (RMD), as well as *in vitro* sialylation using a soluble human ST6Gal1 construct. TzM glycoprofiles were characterized by lectin blots, capillary isoelectric focusing (cIEF) and hydrophilic interaction chromatography (HILIC), while binding to the Fc γ Rs was analysed through a robust SPR-based assay (Cambay et al., 2019) and a surrogate cell-based ADCC reporter assay. Our results demonstrate a sharp increase in Fc γ RIIIa affinity of the TzM variant with reduced fucosylation, which translated in a strong improvement of the cellular ADCC response. In addition, terminal sialylation and galactosylation of TzM possessing high or low core fucose levels had a small, yet noteworthy, effect on the apparent thermodynamic dissociation constants (K_D) of all Fc γ Rs, including Fc γ RI binding. This effect of galactosylation and terminal α 2,6-sialylation (mono- and disialylation), compared to the agalactosylated TzM forms was confirmed in a surrogate cell-based ADCC reporter assay for both Fc γ RIIIa variants. Of interest, in comparison to what was observed for the digalactosylated forms, a slight loss of affinity for Fc γ RIIIa and a concomitant decrease of the ADCC activity was observed when the IgG disialylation levels increased.

5.2.3 Results

5.2.3.1 Generation of TzM glycoforms

5.2.3.1.1 Production of 6 different TzM glycoforms in CHO cells

The glycoprofile of TzM expressed in CHO cells is essentially composed of fucosylated di-antennary agalactosylated glycan (G0F), and some monogalactosylated glycans (G1F) (Raymond et al., 2015). To obtain distinct TzM glycoforms, the light (LC) and heavy (HC) chains of TzM were co-expressed in CHO cells together with various combinations of enzymes affecting the IgG glycosylation. Culture conditions were similar to those described previously (Raymond et al., 2015). CHO-3E7 cells were transfected with cocktails of plasmids separately encoding TzM LC and HC, human β 1,4-galactosyltransferase 1 (β 4GT1) and β -galactoside α 2,6-sialyltransferase 1 (ST6Gal1) and bacterial GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase (RMD). This enzyme converts the precursor of GDP-fucose into GDP-rhamnose, which in turn inhibits the addition of core fucose on glycans (von Horsten et al., 2010). TzM was either expressed alone (TzM) or co-expressed with β 4GT1 (TzM GT), RMD (TzM RMD), β 4GT1 and RMD (TzM GT RMD), β 4GT1 and ST6Gal1 (TzM GT ST6), and β 4GT1, RMD and ST6Gal1 (TzM GT RMD ST6). The antibodies were then purified on a protein A-column followed by size exclusion chromatography (SEC) to remove aggregates.

5.2.3.1.2 Generation of two additional glycoforms by *in vitro* enzymatic sialylation

Fucosylated and afucosylated disialylated TzM were generated by *in vitro* enzymatic sialylation using TzM GT, TzM GT RMD, TzM GT ST6 and TzM GT RMD ST6 as substrates, in presence of a soluble human ST6Gal1 construct and activated CMP-NANA sugar.

Truncated his-tagged ST6Gal1 devoid of its cytoplasmic and transmembrane domain was expressed by culturing 293-6E cells for five days at 37 °C and purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). Performance of the purification process was evaluated by Coomassie Blue staining of SDS-PAGE performed under non-reducing conditions (Figure annexe B - 1), which showed almost pure ST6Gal1 with a yield of 22 mg of enzyme/L of culture. Antibodies with disialylated glycans were obtained through an *in vitro* sialylation (IVS) reaction, conducted over four days at 37 °C, using TzM glycovariants as substrates for purified ST6Gal1.

Reaction mixtures were exchanged every 24 hours to eliminate the free CMP resulting from the transfer of sialic acid from CMP-NANA to the protein, after which fresh CMP-NANA was added. Antibodies were then purified on a protein-A column and the efficacy of ST6Gal1 for *in vitro* sialylation was assessed. To this end, fractions were collected every day for lectin blot analysis and the level of sialylation was evaluated using the $\alpha 2,6$ -sialylation-specific SNA lectin, while the terminal galactosylation was evaluated using the ECL lectin. The TZM GT IVS, TZM GT ST6 IVS, TZM GT RMD IVS and TZM GT RMD ST6 IVS glycovariants showed increased $\alpha 2,6$ -sialylation over time while their terminal galactosylation gradually decreased to undetectable levels (Figure annexe B - 1), confirming that the soluble ST6Gal1 was active and that the sialylation process was completed.

5.2.3.2 Characterization of the various TZM glycoforms

5.2.3.2.1 Lectin blots

Lectin blots were performed using LCA, ECL, SNA and MALII for the detection of core fucosylation, terminal galactosylation, $\alpha 2,6$ -sialylation and $\alpha 2,3$ -sialylation respectively (Figure 5-1). The LCA blot showed a strong decrease of the LCA signal for mAbs co-expressed with the RMD enzyme, indicating that the inhibition of the core fucosylation was effective but not complete (Figure 5-1a). Co-expression of GT led to an increase in galactosylation level as shown by the strong ECL signals of TZM GT and TZM GT RMD compared to those of TZM and TZM RMD, respectively (Figure 5-1b). For the antibodies co-expressed with ST6, the ECL signals were lower than those for TZM GT and TZM GT RMD, suggesting that some but not all galactose residues provided by GT were capped by a sialic acid (Raymond et al., 2015). In contrast, the undetectable ECL signals for the *in vitro* sialylated TZM glycoforms suggests that our sialylation increases the sialylation level in such way that the galactose residues are masked by terminal sialic acid. These results were supported by the SNA signals corresponding to the antibodies co-expressed with ST6 and *in vitro* sialylated with ST6Gal1 (Figure 5-1c). Moreover, the SNA signals were higher for the *in vitro* sialylated TZM glycoforms compared to antibodies co-expressed with ST6. Noteworthy, the signals were weaker for antibodies co-expressed with RMD. Finally, the MALII blot indicated that none of the antibody samples contained detectable amounts of $\alpha 2,3$ sialic acids (Figure 5-1d). We thus concluded that the presence of $\alpha 2,3$ -sialylation was not significant.

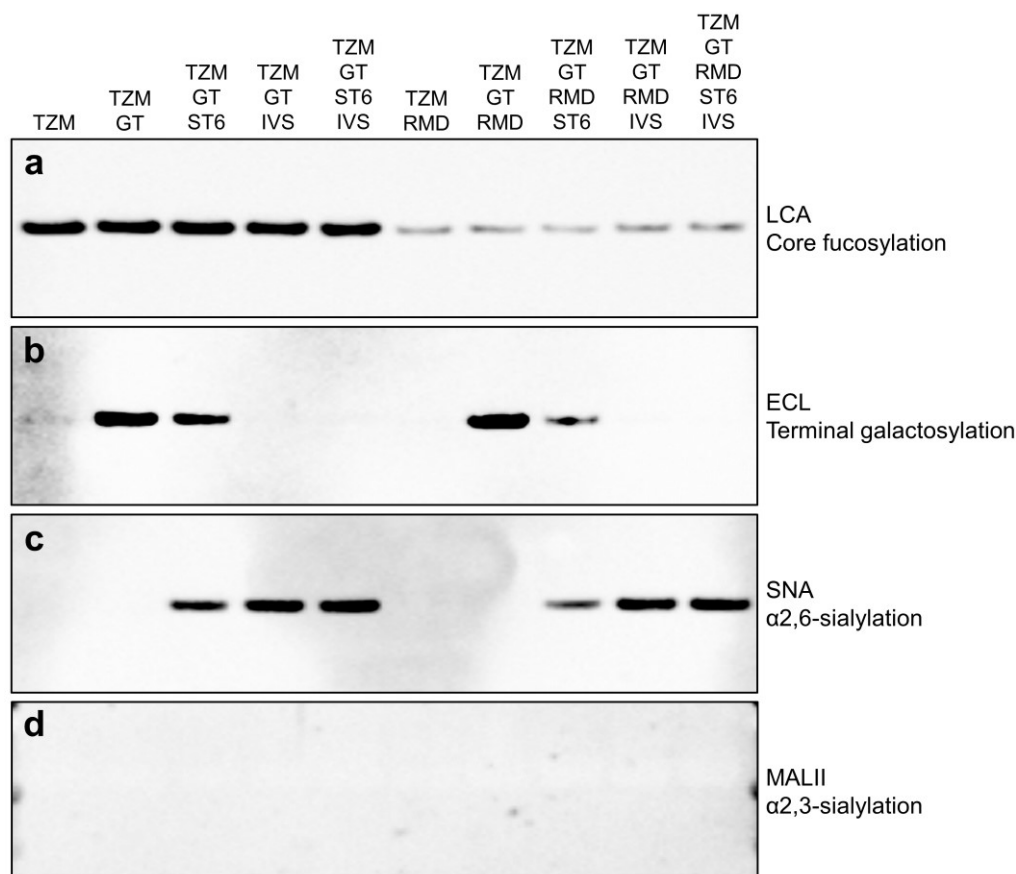


Figure 5-1: Lectin blot analysis of the ten TzM glycoforms. The lectin blots were performed with purified TzM under reducing conditions. Lectin blots were cropped to improve clarity and only the bands corresponding to the heavy chains of the antibodies are displayed. Full-length blots are presented in Figure annexe B - 2. LCA (a), ECL (b), SNA (c) and MALII (d) were used to detect core fucosylation, terminal galactosylation, α 2,6-sialylation and α 2,3-sialylation respectively.

5.2.3.2.2 Capillary isoelectric focusing (cIEF)

The charge profile of the mAbs was analysed by cIEF. TzM was shown to be composed of two main variants ($\approx 91.5\%$) flanked by three minor variants (Figure 5-2a). TzM had a profile similar to that of non-glycosylated TzM (data not shown) and antibodies that were produced without ST6 (i.e. TzM GT, TzM RMD, and TzM GT RMD; these IgGs will be designated as the “neutral mAbs” from this point on) (Figure 5-2b-d). In contrast, the charge variant profiles of the antibodies co-expressed with ST6 (TzM GT ST6 and TzM GT RMD ST6) were drastically different (Figure 5-2e,f).

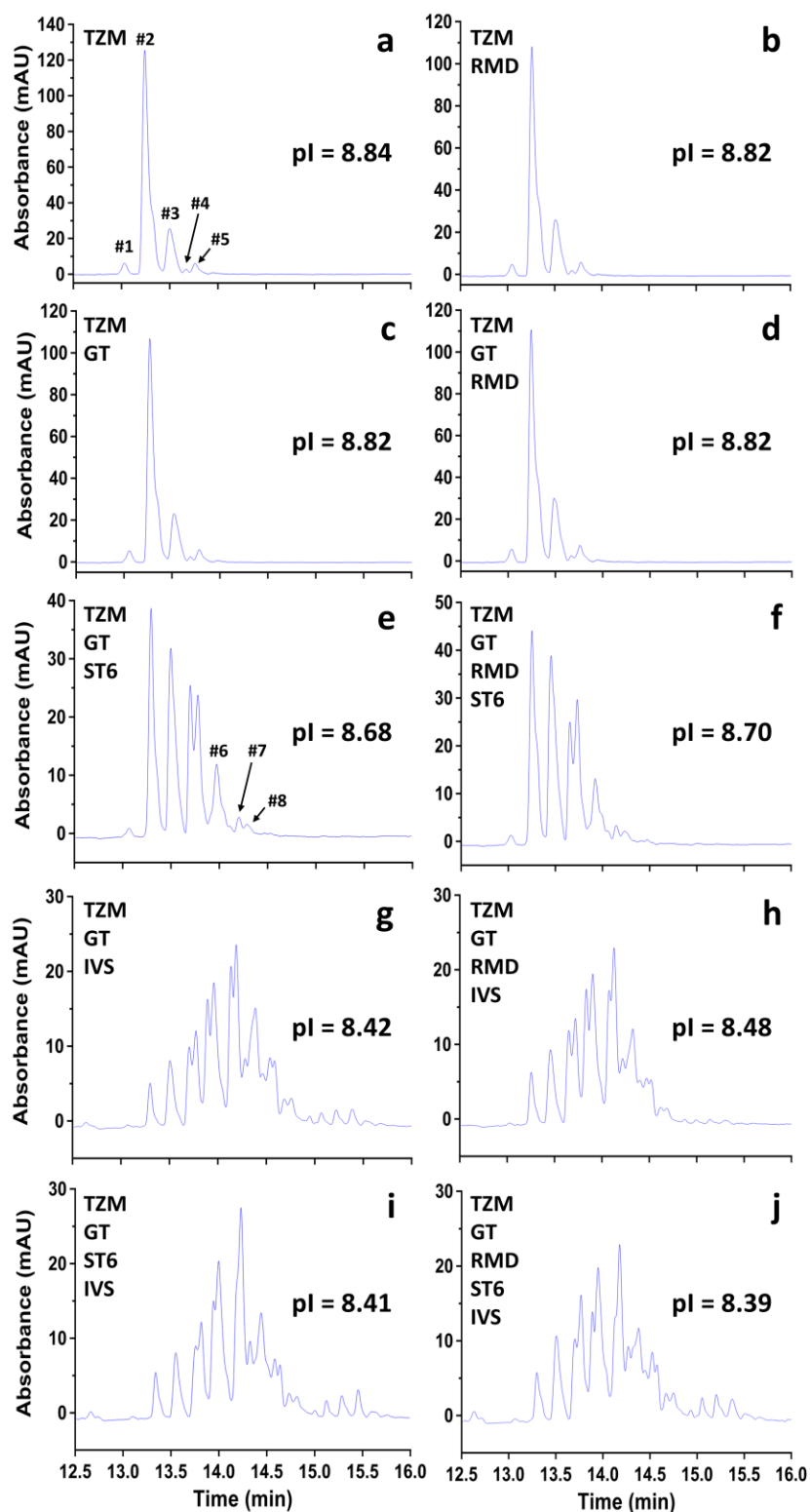


Figure 5-2: cIEF profiles of the ten TZM glycoforms. (a-j) cIEF profiles of purified TZM alone or co-expressed with GT, ST6 and/or RMD as well as *in vitro* α 2,6-sialylated. Calculated apparent pIs of the ten TZM glycoforms are also shown.

Peaks corresponding to variants #2 and #3 (see Figure 5-2a) dropped to ≈ 52 -54.5 %, while acidic variants were more abundant, especially variants #4 and #5 (representing ≈ 27.5 -29.5 %) and #6, #7, #8 (≈ 17 %). Lastly, profiles were most different for the *in vitro* sialylated antibodies, for which variants #2 and #3 dropped to ≈ 5 -13.5 % (Figure 5-2g-j), while the acidic variants sharply increased with variants #4 and #5 representing ≈ 11.5 -17 % and the remaining acidic variants representing ≈ 65 -79.5 %. The increase of acidic variants for the TZM co-expressed with ST6 as well as *in vitro* α 2,6-sialylated TZM also correlated to the decrease of the calculated apparent isoelectric points (pIs). Altogether, the cIEF profiles of the TZM variants are in agreement with the lectin blots since the increase of acidic variants can be attributed to a higher content in sialic acid (Raymond et al., 2012).

5.2.3.2.3 Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)

The characterization of the TZM glycoforms was completed by a HILIC analysis of the glycans released by a PNGaseF treatment (Figure 5-3). N-glycans were identified through database comparison and confirmed by exoglycosidase digestion (Raymond et al., 2015). Seventeen different N-glycans were identified across the ten mAbs analysed and all were of the complex di-antennary type. The abundance of each species was calculated according to the area under the corresponding peak. Each antibody was analysed in duplicate and the averages of the quantification are presented in Table 5-1. The unidentified glycans (u.g.) represented a maximum of 7 % of the peak areas, excepted for TZM GT RMD IVS and TZM GT RMD ST6 IVS for which unidentified glycans represented 15.1 % and 17 % respectively.

TZM exhibited the typical profile expected from an IgG1 expressed in CHO cells (Figure 5-3) (Raymond et al., 2015). The glycoprofile comprised mainly G0F (66.9 %), the two G1F isomers (19 % and 6.2 %) and very low amounts of G2F (3 %) (Table 5-1). Few afucosylated glycans G0 and G1 were detected (1 % and 0.8 % respectively), as well as very low amounts of α 2,3-sialylated species (0.6 %).

The co-expression of TZM with GT (TZM GT) showed an increased level of fully galactosylated glycan G2F (55.6 %) and a small increase in the level of mono- α 2,3-sialylated glycan (13 %) (Table 5-1).

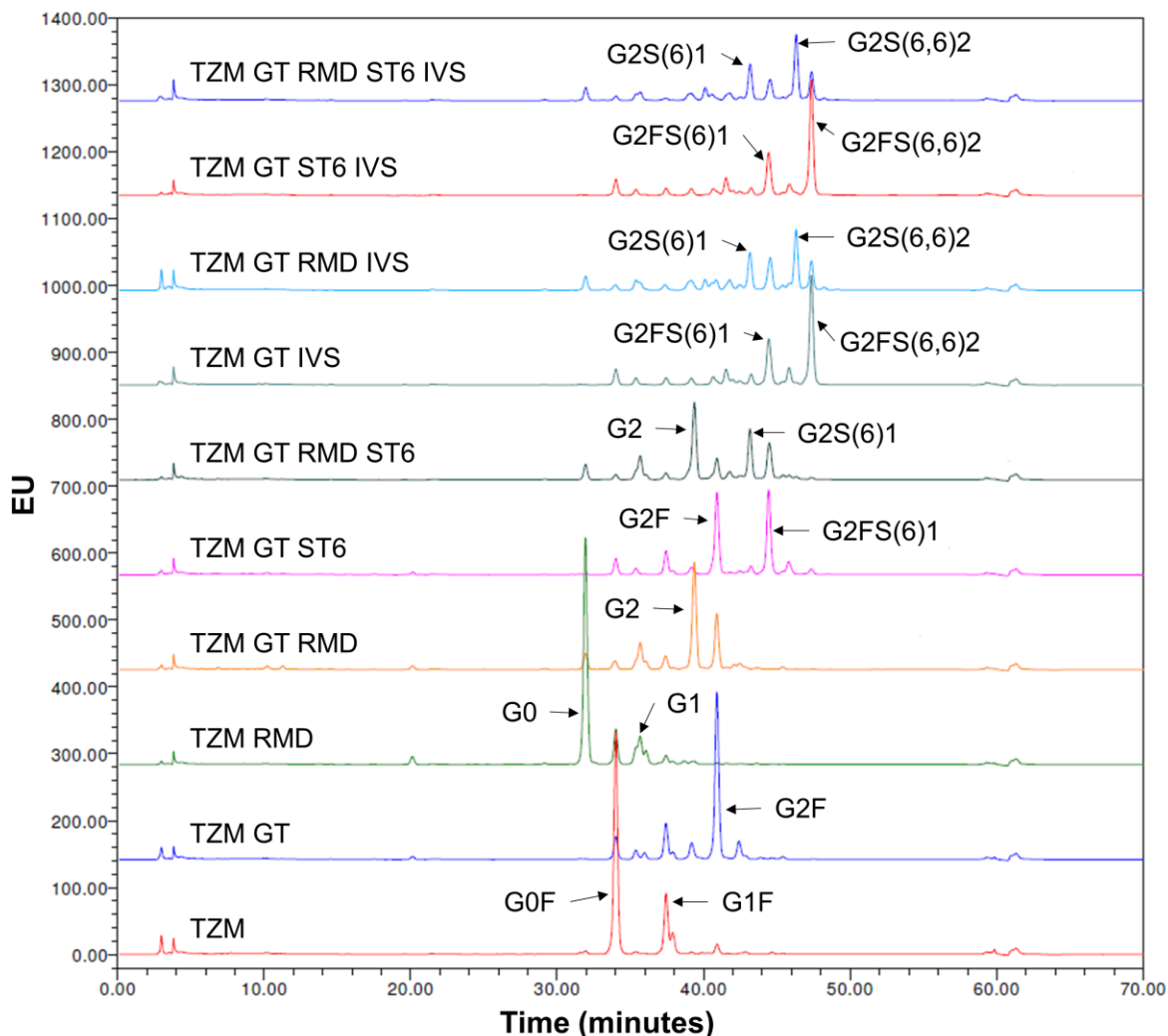


Figure 5-3: HILIC analysis of PNGaseF-released glycans for the ten TzM glycoforms. Identification was performed by database comparison and confirmed by exoglycosidase digestion. The schematic representation of the N-glycans nomenclature is presented in Table 5-1.

The co-expression of TzM with RMD (TzM RMD) resulted in a substantial decrease of fucosylation (from > 98 % to 15 %). This decrease was less pronounced when RMD was co-expressed with GT or GT and ST6 (Table 5-1): 37 % and 33 % of the glycans remained fucosylated in TzM GT RMD and TzM GT RMD ST6, respectively. In addition, TzM RMD contained less than 1% fucosylated digalactosylated glycans (G2F, G2FS1, G2FS2). These forms represented as much as 24 % and 26.5 % in TzM GT RMD and TzM GT RMD ST6, respectively. Also, less than 4 % of sialylated glycans were detected in TzM GT RMD as compared to 10 % in TzM GT (Figure 5-4).

Table 5-1: Relative abundance of the glycans detected in the HILIC chromatograms.

GU	Glycans	Schematic representation	TZM	TZM GT	TZM GT ST6	TZM GT IVS	TZM GT ST6 IVS	TZM RMD	TZM GT RMD	TZM GT RMD ST6	TZM GT RMD IVS	TZM GT RMD ST6 IVS
5.91	G0F		66.9	7.5	5.6	5.8	6.0	10.2	3.7	1.8	2.1	1.7
6.66	G1Fa (pr. G(6)1F)		19.0	11.9	8.5	2.9	2.9	2.6	5.5	2.5	2.1	1.1
6.76	G1Fb (pr. G(3)1F)		6.2	2.2	1.2	0	0	0.8	0.7	0.4	0.1	0.1
7.49	G2F		3.0	55.6	31.5	0	1.0	0.3	20.5	8.3	3.7	0
5.49	G0		1.0	0.2	0.1	0.1	0.1	64.8	5.6	4.8	4.6	4.9
6.27	G1a (pr. G(6)1)		0.7	3.0	2.3	2.6	2.2	12.4	12.0	10.1	5.9	5.3
6.34	G1b (pr. G(3)1)		0.1	2.1	0.2	0.2	0.3	3.8	2.6	1.3	0	0
7.08	G2		0	0	0	0	0	1.2	39.5	28.5	5.8	4.8
7.08	G1FS(3)1		0.4	6.5	3.4	2.8	2.9	0	0	0	0	0
7.66	G1FS(6)1		0	0.6	0	6.0	6.8	0.2	0.9	0	0	0
7.92	G2FS(3)1		0.2	6.6	1.5	1.7	1.6	0.1	3.0	1.7	2.2	1.6
8.51	G2FS(6)1		0.6	0.6	31.7	19.7	18.6	0.3	0.3	14.4	13.4	10.9
8.4	G2FS(3,3)2		0	0.2	0	0	0	0	0.1	0	0	0
8.91	G2FS(3,6)2		0	0	5.4	6.2	4.7	0	0	1.5	2.0	1.8
9.42	G2FS(6,6)2		0	0	2.1	40.6	43.8	0	0	0.7	10.1	11.3
8.12	G2S(6)1		0	0	3.1	3.9	3.1	0	0	16.6	13.4	14.6
9.06	G2S(6,6)2		0	0	0	0.7	0.8	0	0.1	1.1	20.1	26.0
7.72	u.g.		0.1	0	1.1	0	0	0	0	3.6	4.9	4.7
	u.g. other		2.2	3.7	2.4	6.9	5.8	3.5	6.4	2.9	10.2	12.3

The relative glycan abundance was calculated as the area under the peak attributed to the glycan, divided by the sum of the areas of all the peaks detected in the chromatogram. N-glycans

were attributed to the peaks detected by comparison of the peaks glucose units (GU) values to database. The values in bold correspond to abundances $\geq 10\%$. The symbolic representation of the sugars is: N-acetylglucosamine (blue square), mannose (green circle), galactose (yellow circle), N-acetylneuraminic acid ($\alpha 2,6$) (pink diamond), N-acetylneuraminic acid ($\alpha 2,3$) (blue diamond) and fucose (red triangle). pr.: presumably, u.g.: undetermined glycan.

ST6 co-expression led to the production of $\alpha 2,6$ -sialylated glycans (Table 5-1); $\alpha 2,6$ -sialic acid represented 81 % to 97 % of all sialic acids. In agreement with our lectin blot analysis, TzM GT ST6 showed a higher $\alpha 2,6$ -sialylation level than TzM GT RMD ST6 (33 % and 25 % of sialylated glycans, respectively). The most abundant sialylated glycan was mono- $\alpha 2,6$ -sialylated G2FS(6)1 in TzM GT ST6 (32 % of the glycans), and its afucosylated counterpart G2S(6)1 in TzM GT RMD ST6 (16.6 %). However, G2FS(6)1 level was relatively high in TzM GT RMD ST6 (14.4 %). Interestingly, we found that in TzM GT RMD ST6, 69 % of the fucosylated digalactosylated species were sialylated, whereas only 38 % of the non fucosylated digalactosylated glycans were (Table 5-1).

Finally, the *in vitro* sialylation of TzM GT IVS, TzM GT ST6 IVS, TzM GT RMD IVS and TzM GT RMD ST6 IVS resulted in a $\alpha 2,6$ -sialylated glycan content of 74 %, 75.5 %, 60 % and 69 %, respectively. This was accompanied by a decrease of the proportion of glycans with terminal galactose units (Figure 5-4). The level of G2FS(6,6)2 was increased to 40.6 % (TzM GT IVS) and 43.8 % (TzM GT ST6 IVS), while a non-negligible level of G2FS(6)1 remained (19.7 % and 18.6 % for TzM GT IVS and TzM GT ST6 IVS, respectively, see Table 5-1). For TzM GT RMD IVS and TzM GT RMD ST6 IVS, the percentage of glycoforms being both afucosylated and di- $\alpha 2,6$ -sialylated were only 20.1 % and 26 %, respectively. Indeed, we found that some $\alpha 2,6$ -sialylated glycans were still fucosylated and only 58 % and 64 % of $\alpha 2,6$ -sialylated glycoforms were afucosylated with the TzM GT RMD IVS and TzM GT RMD ST6 IVS samples, respectively. We also showed that regardless of the substrate (co-expression with GT in absence or presence of ST6), similar levels of di- $\alpha 2,6$ -sialylation were reached. Therefore, it was concluded that, a monosialylated substrate does not lead to increased disialylation and, given that the majority of galactoses were capped with sialic acid, the disialylation process was more likely limited by the initial levels of digalactosylated species.

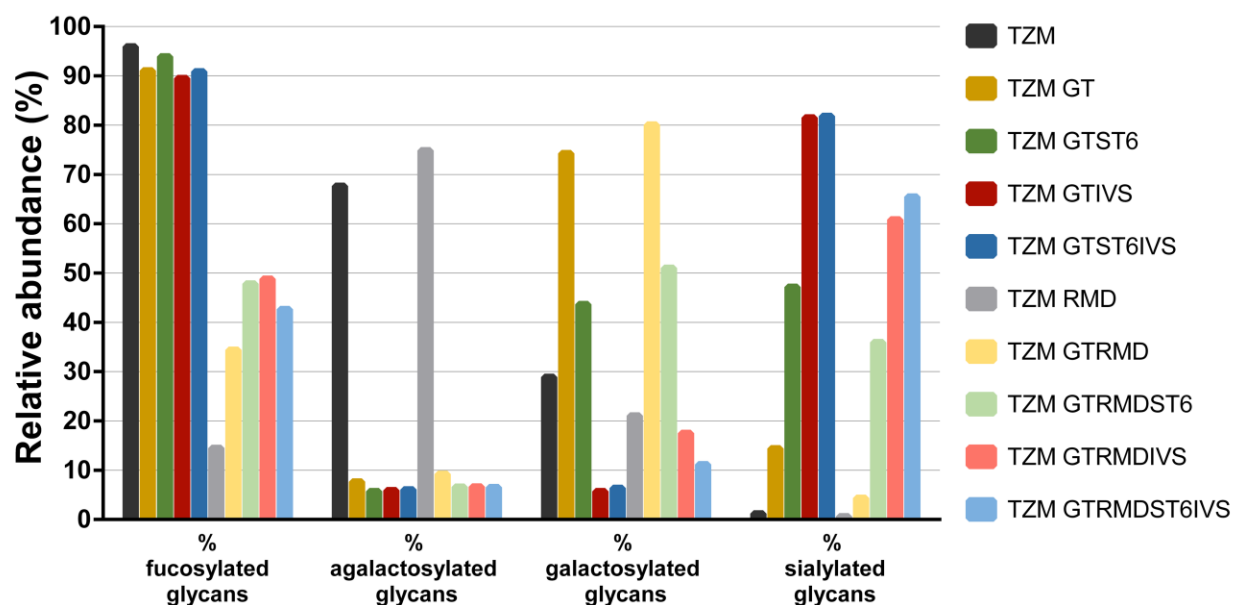


Figure 5-4: Relative abundance of glycan families (fucosylated, agalactosylated, galactosylated and sialylated glycans).

5.2.3.3 Evaluation of the interactions with the FcγRs by SPR

5.2.3.3.1 Determination of the thermodynamic dissociation constant (K_D)

The impact of the glycosylation pattern of TzM on its binding to the FcγRs was evaluated by an enhanced SPR assay we recently developed (Cambay et al., 2019). The assay relies on the stable and oriented capture of the distinct FcγRs through the interaction of the E5 peptide with which the FcγRs are tagged with its K5 peptide partner bound to the biosensor surface, followed by the injection of the TzM glycoforms. E5-tagged low-affinity FcγRs (i.e., FcγRIIIa_{FI58/VI58} and FcγRIIa/b) were produced in CHO and HEK293 cell lines to determine the impact of FcγR N-glycan profiles upon binding of the various TzM preparations. In contrast, the E5-tagged high-affinity FcγRI was produced only in CHO cells, due to very low expression level obtained in HEK293 cells. Figure 5-5 shows several representative control-corrected SPR sensorgrams depicting the interaction of fucosylated or afucosylated TzM with the various FcγRs.

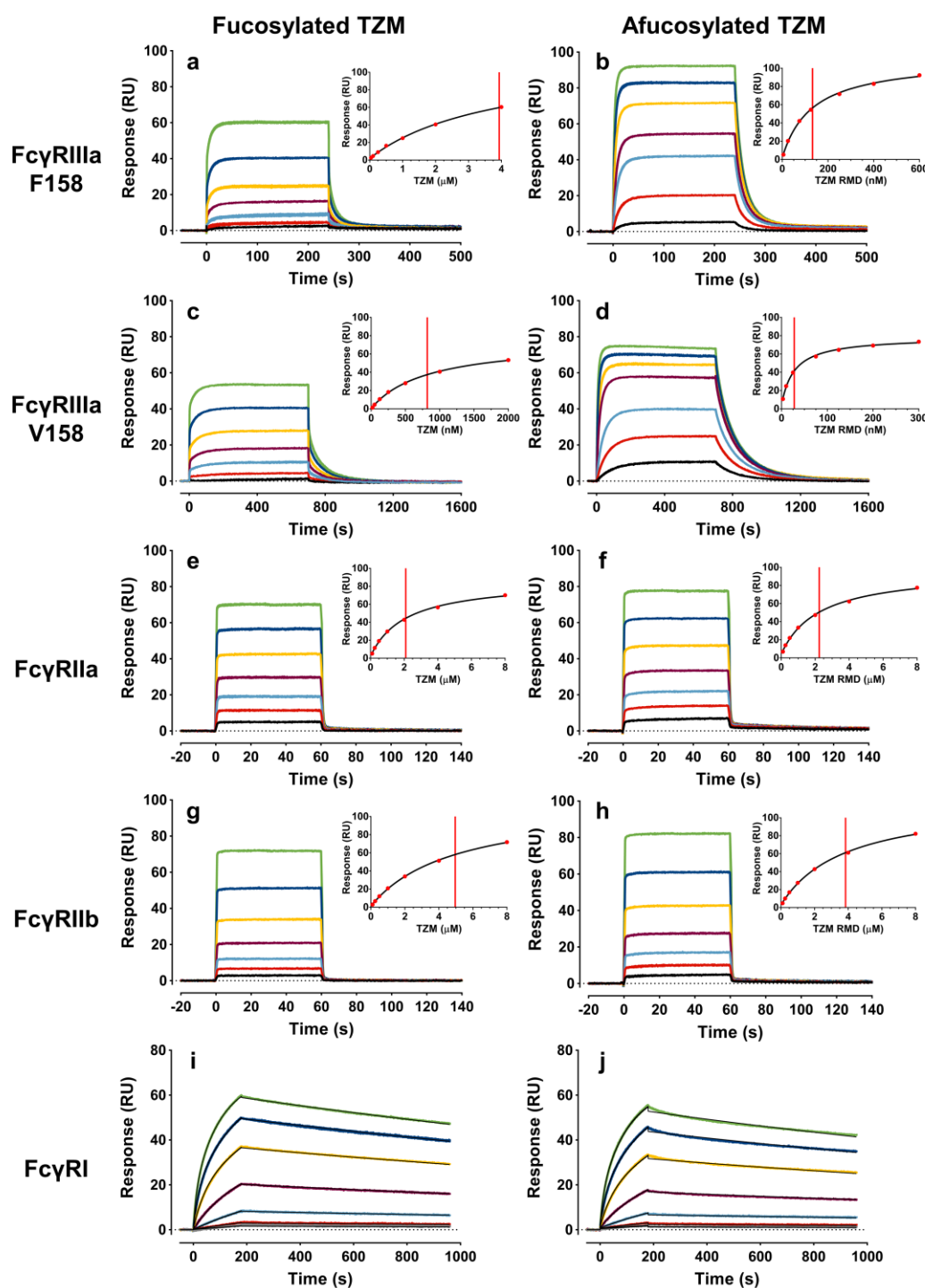


Figure 5-5: Representative control-corrected SPR sensorgrams corresponding to the interactions of various TzM glycoforms with captured FcγRs. Sensorgrams corresponding to the interactions of fucosylated TzM (left column, TzM) or afucosylated TzM (right column, TzM RMD) with E5-tagged FcγRs previously captured on a K5 surface (≈ 30 RUs of FcγRIIIa_{F158} (a,b);

≈ 20 RUs of Fc γ RIIIa_{V158} (**c,d**); ≈ 20 RUs of Fc γ RIIa (**e,f**); ≈ 25 RUs of Fc γ RIIb (**g,h**) and ≈ 45 RUs of Fc γ RI (**i,j**). Each data set corresponds to the triplicate injection of a TZM glycoform at 7 concentrations (between 40-4,000 nM for fucosylated TZM-Fc γ RIIIa_{F158}; 5-600 nM for afucosylated TZM-Fc γ RIIIa_{F158}; 20-2,000 nM for fucosylated TZM-Fc γ RIIIa_{V158}; 3-300 nM for afucosylated TZM-Fc γ RIIIa_{V158}; 100-8,000 nM for Fc γ RIIa and Fc γ RIIb; 0.5-100 nM for Fc γ RI). (**a-h**) The steady state analysis of the sensorgrams is shown in the insets with the vertical line marking the respective calculated K_D values. (**i,j**) The thin black solid lines correspond to the global fit using a kinetic model assuming the existence of two distinct populations of captured Fc γ RI.

For the low-affinity Fc γ Rs, the apparent K_D values were calculated through a steady-state analysis assuming a one-to-one binding model. In the case of Fc γ RI, plateaus were not reached at the end of the TZM injections, and data were therefore globally fit in order to determine the apparent kinetic constants (k_a and k_d) and to deduce the apparent K_D values ($K_D = k_d / k_a$) of these interactions. A kinetic model corresponding to the existence of two distinct populations of captured Fc γ RI was also applied to analyse the data since i) a simpler kinetic model gave poor fit and ii) traces of receptor aggregates were observed in our receptor preparation by analytical SEC (Figure annexe B - 3). The apparent K_D values for each receptor/TZM glycoform interaction are presented in Figure 5-6 and the Table annexe B - 1 (note two distinct K_D values are reported here; K_{D1} and K_{D2} each corresponding to the monomeric and aggregated Fc γ RI populations, respectively, for this specific receptor).

In agreement with the literature, apparent K_D s varied the most with the Fc γ R type, with TZM apparent K_D values within the $10^{-6} - 10^{-7}$ M range for the low-affinity Fc γ Rs and in the 10^{-9} M range for the Fc γ RI (Bruhns et al., 2009; Lu et al., 2015), whereas in case of Fc γ RIIIa, the apparent K_D values of afucosylated TZMs were reported to be in the $10^{-7} - 10^{-8}$ M range (Subedi & Barb, 2016; Zeck et al., 2011). Here we report that affinities of the IgG fucosylated forms for the Fc γ Rs could be ranked as follows: Fc γ RI $\gg$ Fc γ RIIIa_{V158} > Fc γ RIIa > Fc γ RIIIa_{F158} > Fc γ RIIb. Affinities for the afucosylated forms ranked as: Fc γ RI > Fc γ RIIIa_{V158} > Fc γ RIIIa_{F158} $\gg$ Fc γ RIIa > Fc γ RIIb.

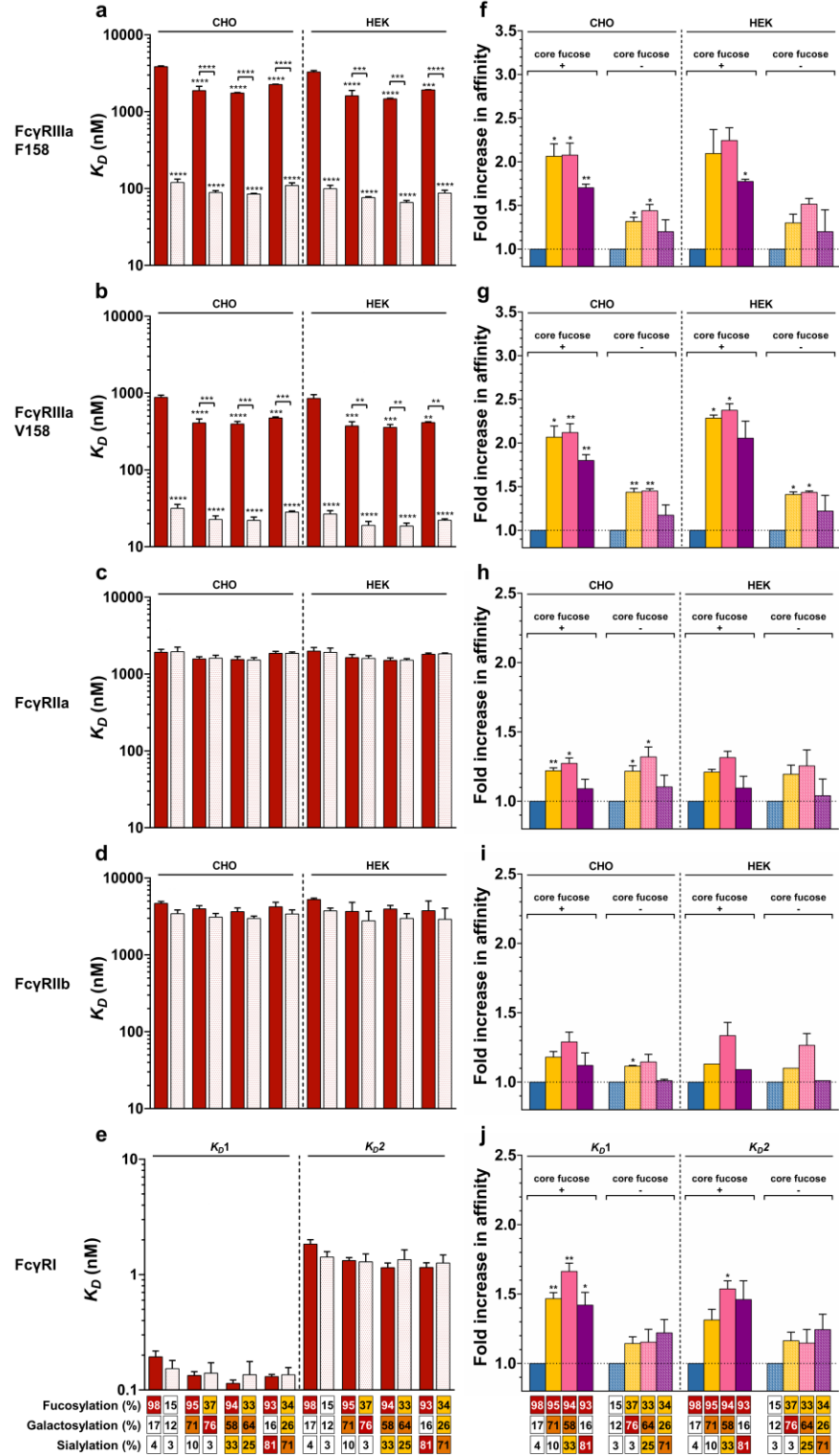


Figure 5-6: Influence of the IgG-Fc N-glycan sugar moieties upon FcγR binding. (a-e) The impact of Fc core fucosylation on FcγR binding affinity. K_D values are representative of at least 2 independent experiments for each condition and the standard errors of the mean (SEM) are shown.

, * and **** denote a statistical significance of $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$, and $p \leq 0.0001$, respectively, as tested by one-way ANOVA using Tukey's multiple comparisons test against TZM, or comparing the fucosylated vs afucosylated forms with the same N-glycan elongation level as indicated by the horizontal lines). (f-j) The impact of terminal sugar moieties (i.e., digalactosylation, mono- α 2,6-sialylation and di- α 2,6-sialylation) of the IgG1-Fc N-glycan on Fc γ Rs binding relative to TZM (filled column) or TZM RMD (hatched column). The ratios are representative of at least 2 independent experiments and SEM are shown. * and ** denote a statistical significance of $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$, respectively, as tested by a one-sample t-test against a theoretical mean of 1. The abscissa legend describes the percentage of each glycan family.

5.2.3.3.2 IgG-Fc N-glycan sugar moieties influence upon Fc γ Rs binding

The IgG-Fc γ Rs interaction is also influenced by the IgG-Fc N-glycan profile for a given receptor. Indeed, besides the major and well-documented changes in affinity observed for the IgG interactions with Fc γ RIIIa_{F158/V158} (> 2-fold) (Dekkers et al., 2017; Subedi & Barb, 2016), our enhanced SPR-based assay also allowed to highlight minor (< 2-fold) but significant effects of IgG-Fc N-glycan variation upon Fc γ RIIa and Fc γ RI binding. The influence of IgG fucosylation on Fc γ R binding is shown in Figure 5-6a-e while the influence of IgG N-glycan galactosylation, monosialylation or disialylation is displayed in Figure 5-6f-j.

In agreement with the literature, Figure 5-6a,b shows that the absence of core fucose within the IgG N-glycan led to the most significant ($p \leq 0.0001$) increase of affinity for TZM binding to both Fc γ RIIIa variants (18 to 32-fold increase depending on the Fc γ RIIIa variant and the level of IgG N-glycan afucosylation) (Dekkers et al., 2017; Shields et al., 2002; Subedi & Barb, 2016). In addition, as shown by Subedi et Barb (2016), no significant effect was observed for Fc γ RIIa, Fc γ RIIb and Fc γ RI binding (Figure 5-6c, d and e respectively).

Dekkers et al. (2017) have shown that the addition of two galactose residues led to a 2-fold increase of the affinity of afucosylated IgGs for both Fc γ RIIIa variants and Subedi et Barb (2016) have reported an average 1.7-fold increase in affinity for all Fc γ Rs except Fc γ RI. We report here, that the addition of two galactose also led to such increase of affinity between IgGs (regardless of the level of IgG fucosylation) and all Fc γ Rs (Figure 5-6, right panels). More specifically, the Fc γ RIIIa_{F158/V158} binding was the most affected (2-fold increase; Figure 5-6f,g) and to a lesser extent the Fc γ RIIa/b binding (1.2-fold increase; Figure 5-6h,i). Surprisingly, a statistically

significant ($p \leq 0.01$) impact of the IgG N-glycan galactosylation on Fc γ RI binding was also observed (1.4-fold increase in affinity; Figure 5-6j).

For all Fc γ Rs, higher mono- and di- α 2,6-sialylation levels of the IgGs led to an increase in affinity similar to that of digalactosylation (when compared to the G0F or G0 forms). However, while a low level of mono- α 2,6-sialylation (GTST6 and GTRMDST6) upon digalactosylation did not seem to improve the IgG affinity, higher mono- and di- α 2,6-sialylation levels (GTIVS, GTST6IVS, GTRMDIVS and GTRMDST6IVS) negatively impacted the IgG affinity compared to the digalactosylated IgGs. Of interest, only the Fc γ RI binding was not negatively affected by high levels of sialylation. These results for Fc γ RIIIa/b have also been observed by Dekkers et al. (2017) but are contrasted with those observations reported on by Subedi et Barb (2016).

Lastly, the TzM N-glycan variations similarly affected Fc γ Rs binding, regardless of the Fc γ Rs expression system used. The only difference observed, as reported previously (Cambay et al., 2019; Hayes et al., 2017), was for both Fc γ RIIIa variants, with higher affinities recorded for HEK293-produced receptor proteins.

5.2.3.4 ADCC

The impact of the TzM N-glycan pattern on TzM interaction with Fc γ RIIIa_{F158/V158} was also evaluated in a surrogate ADCC reporter bioassay. In this assay, Jurkat cells expressing either the low-affinity F158 variant or the high-affinity V158 variant of the Fc γ RIIIa transduce, upon IgG binding, intracellular signals resulting in NFAT-mediated luciferase activity. Briefly, TzM glycoforms were first incubated with the target cells (BT-474 cells expressing high levels of HER2), after which the engineered Jurkat effector cells were added. Commercial Herceptin was included in the assays as a positive control while Synagis (palivizumab, an anti-Respiratory Syncytial Virus Fusion glycoprotein [RSVF] antibody) and non-glycosylated TzM were included as negative controls (Figure 5-7).

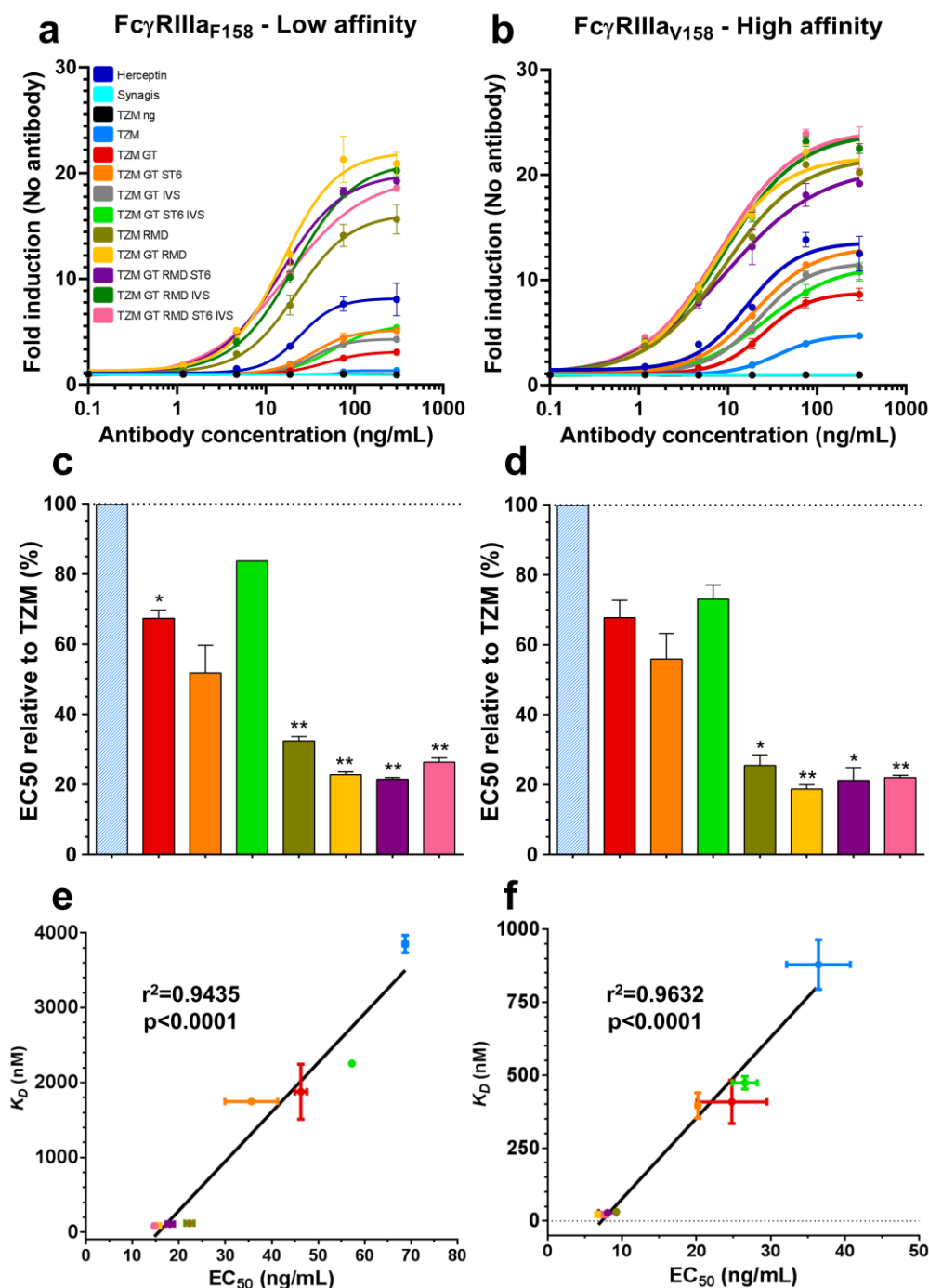


Figure 5-7: ADCC responses induced by the TzM glycoforms. The antibodies were put in contact with target cells expressing HER2 and effector cells expressing the low affinity $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}_{\text{F158}}$ (a) or the high affinity $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}_{\text{V158}}$ (b). The response was measured as a bioluminescent signal produced by the effector cells upon antibody binding, and expressed as a multiple of the basal bioluminescent signal produced by the effector cells in absence of antibodies.

The results are the average and standard deviations of duplicates. Commercial Herceptin was included in the assays as positive control while Synagis and non-glycosylated TzM (TzM ng) were included as negative controls. The half maximal effective concentration (EC_{50}) for each TzM glycoforms was calculated using a non-linear fit (least squares) with a variable slope and displayed as relative EC_{50} compared to TzM (hatched columns) for the Fc γ RIIIa_{F158} (c) and Fc γ RIIIa_{V158} (d). The data represent the mean and SD; * and ** denote a statistical significance of $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$, respectively, as tested by a one-sample t-test against a theoretical mean of 100 (%). Correlation between apparent K_D values of Fc γ RIIIa_{F158} (e) or Fc γ RIIIa_{V158} (f) binding of TzM glycoforms and EC_{50} . r^2 and p value of the linear regression are shown.

Recent studies from other groups investigated the impact of IgG Fc N-glycan upon ADCC activity and all observed an increase for afucosylated IgG forms (Dekkers et al., 2017; Li, T. et al., 2017; Wada et al., 2019). In addition, terminal galactosylation was also reported to increase, while di- α 2,6-sialylation slightly decreased the ADCC activity. However, the negative impact of sialylation was observed for afucosylated IgGs (Dekkers et al., 2017), fucosylated IgGs (Li, T. et al., 2017) or both (Wada et al., 2019).

When comparing the ADCC response of highly-fucosylated TzMs to low-fucose variants we observed an increase in bioluminescent signal (Figure 5-7a: 4- to 12-fold for the Fc γ RIIIa_{F158} variant; Figure 5-7b: 1.5 to 4.5-fold for its V158 counterpart). Furthermore, calculating the EC_{50} showed a decrease of ~ 2.5 -fold for the F158 variant and a ~ 2.5 - to 4-fold for V158 variant (Table annexe B - 2). The lowest EC_{50} for the F158 and V158 variants were observed for the TzM GT RMD ST6 (14.71 ng/mL) and TzM GT RMD (6.79 ng/mL), respectively (Table annexe B - 2, Figure 5-7c,d). These results imply that the absence of core fucose in an IgG also has a major effect in terms of triggering an ADCC response.

The impact of the IgG-Fc N-glycan elongation was similar for both Fc γ RIIIa variants (Figure 5-7c,d). Indeed, regardless of the fucosylation level, the strongest responses were recorded for the glycoforms carrying terminal galactosylation or terminal α 2,6-sialylation, with slight differences between them. In contrast, the signals corresponding to the low-galactosylated glycoforms (TzM and TzM RMD) were lower. More precisely, according to the EC_{50} , besides the absence of fucose, the most pronounced positive influence on ADCC activity was observed for the digalactosylated glycoforms. In terms of sialylation, a small increase in monosialylation level had no impact on

ADCC activity. Lastly, higher level of sialylation negatively affected the ADCC activity for both fucosylated and afucosylated forms.

Altogether, the relative ADCC response of high- and low-fucosylated TZM glycoforms as well as the subtle differences between agalactosylated, galactosylated and sialylated glycoforms were consistent with the apparent K_D values determined in our enhanced SPR-based assay (Figure 5-7e,f).

5.2.4 Discussion

Over the last two decades, many studies have evaluated the effect of IgG glycosylation on their effector functions (ADCC or CDC). More specifically, most of these studies have focused on terminal galactosylation, terminal sialylation and/or the absence of core fucose (Dashivets et al., 2015; Dekkers et al., 2017; Houde et al., 2010; Kurogochi et al., 2015; Li, T. et al., 2017; Lin et al., 2015; Scallon et al., 2007; Shields et al., 2002; Subedi & Barb, 2016; Thomann et al., 2015; Wada et al., 2019). While there is a consensus on the positive effect of IgG-Fc afucosylation for Fc γ RIIIa binding (and in turn on ADCC activity), the influence of both terminal galactosylation and terminal α 2,6-sialylation remains ambiguous. Discrepancies found in the literature can be partly attributed to the differences in experimental procedures used to prepare and enrich specific IgG glycovariants. As such several methodologies, including chemoenzymatic glycoengineering (Li, T. et al., 2017; Lin et al., 2015; Shivatare et al., 2018; Tsukimura et al., 2017; Wada et al., 2019) and *in vitro* glycoengineering (Dashivets et al., 2015; Peschke et al., 2017; Thomann et al., 2015; Yamaguchi et al., 2006; Yu et al., 2013), combined or not with the transient co-expression (Dekkers et al., 2016) or the inhibition of enzymes involved in the N-glycosylation process (Subedi & Barb, 2016), have been used and may have resulted in differences in terms of homogeneity for these IgG lots. Altogether, only a few studies investigated a complete panel of IgG glycoforms to provide a holistic comprehensive overview of the influence of IgG glycosylation on immune cell effector functions (Dekkers et al., 2017; Subedi & Barb, 2016; Wada et al., 2019).

Despite the lower homogeneity of the IgG glycoforms resulting from an *in vivo* glycoengineering approach by transient co-expression of enzymes, we opted for such a strategy as our goal was to rapidly generate a relatively large panel of different IgG glycoform preparations with the goal to i) validate previous reports on the impact of IgG glycosylation upon Fc γ R binding,

ii) test whether our enhanced SPR assay was predictive of ADCC activity for these enriched glycoform preparations. Using Trastuzumab as our parent IgG we thus generated eight glycovariants using a mammalian expression method that mainly relies on the over-expression of enzymes involved in the N-glycosylation pathway. More specifically, six IgG1 glycoforms were produced by transient co-expression of the β 1,4-galactosyltransferase 1 (GT) and/or the β -galactoside α 2,6-sialyltransferase 1 (ST6), and/or the GDP-4-dehydro-6-deoxy-D-mannose reductase (RMD). This resulted in TZM glycovariants with increased levels of terminal galactosylation and terminal α 2,6-sialylation, and reduced fucosylation, respectively. In our hands, transient co-expression of TZM with several enzymes (i.e., GT with ST6 or GT with RMD and ST6) led to higher N-glycan heterogeneity when compared to that reported with strategies relying on chemoenzymatic glycoengineering (Li, T. et al., 2017; Tsukimura et al., 2017; Wada et al., 2019). Enzyme co-expression caused only partial inhibition of fucosylation while the levels of α 2,6-sialylated glycoforms, although increased, mostly corresponded to the mono- α 2,6-sialylated digalactosylated species, which is in agreement with previous observations (Dekkers et al., 2016; Raymond et al., 2015). Taking into account glycoform heterogeneity (in order to better interpret our results from our SPR and ADCC bioassays), a complete characterization of our glycoforms was thus performed using three orthogonal methods (Figure 5-1, Figure 5-2 and Figure 5-3; Table 5-1), which all led to the same conclusions in respect to the major differences observed from one TZM glycoform preparation to the other (Figure 5-4).

To complete our TZM glycoform panel and to determine the impact of higher di- α 2,6-sialylation levels, *in vitro* α 2,6-sialylation of TZM expressed in presence of GT only, GT/RMD, GT/ST6 and GT/RMD/ST6 was performed with a soluble ST6Gal1 construct. In accordance with the literature, this resulted in the enrichment of a di- α 2,6-sialylated IgG although the amount of mono- α 2,6-sialylated species remained substantial, suggesting that the limited disialylation was more probably due to incomplete IgG digalactosylation (Dekkers et al., 2016).

Altogether, our results have shown that, compared to cell line engineering and complete *in vitro* glycoengineering, transient co-expression of three enzymes associated with only one additional *in vitro* α 2,6-sialylation step led to the rapid generation (within two weeks) of eight distinct and well-defined TZM glycoforms at high yields and at reasonable costs. Nonetheless, transient co-expression has shown some limitations and led to higher N-glycan heterogeneity compared to chemoenzymatic glycoengineering.

There is no consensus on the effect of IgG-Fc N-glycan content on FcγRs binding in the literature. Several methods have been used to characterize these interactions, including affinity chromatography (Dashivets et al., 2015; Thomann et al., 2015; Wada et al., 2019), ELISA (Kuroguchi et al., 2015; Li, T. et al., 2017; Lin et al., 2015; Shivatare et al., 2018) and SPR analysis (Dashivets et al., 2015; Dekkers et al., 2017; Li, T. et al., 2017; Subedi & Barb, 2016; Thomann et al., 2015; Wada et al., 2019), applied in many variations, which in turn led to major differences in the interpretation of the results (Cambay et al., 2019). In addition, the interactions were assessed either for all FcγRs (Bruggeman et al., 2017; Dekkers et al., 2017; Lin et al., 2015; Subedi & Barb, 2016) or only for FcγRIIIa (Houde et al., 2010; Kuroguchi et al., 2015; Li, T. et al., 2017; Peschke et al., 2017; Wada et al., 2019) as FcγRIIIa binding (and consequently the ADCC activity) has been reported to be the most affected by the IgG N-glycan profile.

In the study reported here, we recorded the binding kinetics of eight TzM glycoforms to a panel of human FcγRs (i.e., FcγRIIIa_{F158}, FcγRIIIa_{V158}, FcγRIIa, FcγRIIb and FcγRI) using a robust SPR assay (Figure 5-5), and showed that the performance of this assay is superior, in terms of reproducibility, compared to those previously reported on Cambay *et al.* (2019). The TzM glycovariants/FcγRs binding was further analysed with FcγRs produced either in CHO or HEK293 cell line. Some studies have shown that FcγRIIIa obtained through different expression systems displayed distinct N-glycan profiles leading to subtle kinetic profile variations (Hayes et al., 2017; Zeck et al., 2011). Our results suggested that these N-glycan variations modestly affected the interactions for both FcγRIIIa_{F158} and FcγRIIIa_{V158} (Figure 5-6; Table annexe B - 1) as was observed previously (Cambay et al., 2019).

The TzM glycoforms binding to both FcγRIIIa_{F158} and FcγRIIIa_{V158} were affected the most by the IgG-Fc N-glycan profiles (Figure 5-6). These results are in agreement with the literature in which a major influence on all the FcγRIII isoforms (i.e., FcγRIIIa_{F158}, FcγRIIIa_{V158}, FcγRIIIb NA1 and FcγRIIIb NA2) has been reported (Dekkers et al., 2017; Subedi & Barb, 2016; Zhang, N. et al., 2011). More precisely, variation in core fucosylation had the most radical impact on FcγRIIIa binding while no significant effect on other FcγRs was observed (Figure 5-6a-e). IgGs with low-fucose levels have been reported to form more stable complexes with FcγRIIIa, due to carbohydrate-carbohydrate interactions between the FcγRIIIa Asn-162 glycan and afucosylated IgG-Fc (Ferrara et al., 2011; Ferrara, Stuart, et al., 2006; Mizushima et al., 2011), and resulting in

more efficient capability to induce an ADCC response (Dekkers et al., 2017; Li, T. et al., 2017; Subedi & Barb, 2016; Wada et al., 2019).

In addition, the presence of galactose, independently of the core fucose, was found to benefit binding of the IgGs to both Fc γ RIIIa variants (Figure 5-6f,g). This combination can therefore be considered an additive advantage, which has been confirmed by several reports (Dekkers et al., 2017; Houde et al., 2010; Subedi & Barb, 2016; Wada et al., 2019) while contested by others (Peipp et al., 2008; Peschke et al., 2017). To a lesser extent, galactose, irrespective of the core fucose level, also positively influenced the interactions of TzM (Figure 5-6h-j) and other IgGs (Dashivets et al., 2015; Subedi & Barb, 2016; Thomann et al., 2015) with Fc γ RI, Fc γ RIIa and Fc γ RIIb.

We also showed that TzM glycovariants enriched in mono- α 2,6-sialylation (Figure 5-6f,g) have the same affinity as their digalactosylated counterpart (Dashivets et al., 2015; Dekkers et al., 2017; Subedi & Barb, 2016; Thomann et al., 2015). Nonetheless, a slight decrease in Fc γ RIIIa affinity for the di- α 2,6-sialylated (40 %) TzM glycoforms was observed compared to its digalactosylated counterpart. This difference is however not statistically significant and is most likely due to the disialylation levels which remained low in our preparations. This trend is in line with conclusions made in recent studies for IgG glycoforms displaying higher levels or complete disialylation, with this effect being observed either on fucosylated (Li, T. et al., 2017), afucosylated (Dekkers et al., 2017; Kurogochi et al., 2015) or both forms (Wada et al., 2019). In the case of hypo-fucosylated TzMs, the effects of digalactosylation, mono- and di-sialylation were more modest than those observed for their fucosylated counterparts (Figure 5-6f,g). However, it should be taken into account that the levels of afucosylation of our TzM preparations are different (i.e., fucosylation is higher for galactosylated and sialylated TzM samples compared to our agalactosylated TzM sample, see Figure 5-4). These differences may be important, as demonstrated by Chung, S. et al. (2012). In the case of the other receptors, TzM sialylation had no impact upon Fc γ RIIa and Fc γ RIIb (Figure 5-6h,i), as already observed for other IgGs (Dekkers et al., 2017; Subedi & Barb, 2016). Of interest, a modest, yet significant ($p \leq 0.01$), positive effect on Fc γ RI binding was observed for the fucosylated TzM samples only (Figure 5-6j). Such affinity increase has already been reported by Scallon et al. (2007) but was not observed by others (Dekkers et al., 2017; Subedi & Barb, 2016; Thomann et al., 2015). Altogether, our results suggest that the TzM mono- α 2,6-sialylation modestly affects its interaction with Fc γ RI compared to the digalactosylated variant. It also showed that disialylation has a negative effect on the TzM affinity

for the FcγRIIIa when disialylation levels reaches a certain threshold (> 40 %). This contrasts with many studies that concluded that disialylation had no effect (Dashivets et al., 2015; Lin et al., 2015; Peipp et al., 2008; Shivatare et al., 2018; Subedi & Barb, 2016; Thomann et al., 2015) but agree with others who performed these experiments with homogenous IgG glycoform preparations (Kurogochi et al., 2015; Wada et al., 2019).

Altogether, the similarity in the trends observed for those TZM low-galactosylation/high-galactosylation/high-sialylation glycovariants in the absence or presence of fucose, highly suggests that both core fucosylation and elongation of the glycans affect FcγR binding through distinct mechanisms. This hypothesis is consistent with the very specific role of core fucose in the IgG1/FcγRIIIa interaction (Ferrara et al., 2011; Mizushima et al., 2011), as well as with the effect of galactose and/or sialic acid on the IgG-Fc conformation (Ahmed et al., 2014; Frank et al., 2014).

The correlations between the IgG/FcγR interactions and the induction of an ADCC (Chung, S. et al., 2012; Dekkers et al., 2017; Li, T. et al., 2017; Lin et al., 2015; Scallon et al., 2007; Shivatare et al., 2018; Thomann et al., 2015; Tsukimura et al., 2017; Wada et al., 2019; Zhang, N. et al., 2011) and CDC (Chung, S. et al., 2012; Dekkers et al., 2017; Peschke et al., 2017; Wada et al., 2019) response, or the overall performance of a therapeutic IgG *in vivo* (Kanda et al., 2006; Kaneko et al., 2006; Li, T. et al., 2017) have already been reported. In light of this, we performed a surrogate ADCC reporter bioassay in which the effector cells are engineered Jurkat cells that express either the FcγRIIIa_{F158} or the FcγRIIIa_{V158}. In this assay, binding of an IgG to its target protein on the target cell allows for the interaction of their Fc region with the FcγRIIIa_{F158} or FcγRIIIa_{V158} expressed on the effector cell and results in the activation of the NFAT signalling cascade that is coupled to a bioluminescent read-out. This thus mimics the multiple IgG-Fc/FcγRIIIa interactions that may occur simultaneously *in vivo*.

As expected, core fucosylation had a major effect on ADCC triggering, regardless of the FcγRIIIa variant (Figure 5-7a-d and Table annexe B - 2). This positive effect of reduced antibody fucosylation on ADCC activity has however been extensively demonstrated (Chung, S. et al., 2012; Dekkers et al., 2017; Kanda et al., 2006; Kurogochi et al., 2015; Peipp et al., 2008; Tsukimura et al., 2017; Wada et al., 2019; Yamane-Ohnuki et al., 2004). For both high- and low-fucosylated TZM glycovariants, terminal galactosylation and terminal sialylation had a modest, yet noteworthy, effect (Figure 5-7a-d and Table annexe B - 2). As observed in our SPR assay,

differences between the low-fucosylated forms were modest in the surrogate ADCC bioassay, again most likely due to the various levels in residual fucosylation of our TzM glycovariants (see above). The impact of terminal galactosylation and terminal sialylation was obvious when the IgGs were fucosylated (Figure 5-7c,d; Table annexe B - 2) as indicated by the EC₅₀ values for TzM GT (i.e., 46.31 and 25.02 ng/mL) and TzM GT ST6 IVS (i.e., 57.24 and 26.65 ng/mL) respectively, compared to EC₅₀ values of TzM (i.e., 71.04 and 36.34 ng/mL). In contrast, the slightly negative effect of di- α 2,6-sialylation compared to digalactosylation was modest (Figure 5-7c,d; Table annexe B - 2), which is also demonstrated in the calculated EC₅₀ values of TzM GT ST6 IVS compared to EC₅₀ values of TzM GT (57.24 vs 46.31 and 26.65 vs 25.02 ng/mL, respectively). The positive effect of terminal galactosylation on ADCC activity has been reported in very recent studies (Dekkers et al., 2017; Thomann et al., 2015; Wada et al., 2019) but not by others (Boyd et al., 1995; Kurogochi et al., 2015; Peipp et al., 2008; Shinkawa et al., 2003; Tsukimura et al., 2017). Similarly, several studies have also reported the negative effect of di- α 2,6-sialylation on ADCC activity (Dekkers et al., 2017; Li, T. et al., 2017; Naso et al., 2010; Wada et al., 2019) whereas others showed no effect (Kurogochi et al., 2015; Lin et al., 2015; Peipp et al., 2008; Shivatare et al., 2018; Thomann et al., 2015).

Altogether, results we presented here showed that the affinities measured by SPR for a large panel of TzM glycovariants were highly predictive of cellular ADCC activity. Indeed, a strong correlation was observed for the K_D values derived from our SPR analysis and the EC₅₀ values derived from our ADCC surrogate bioassay (Figure 5-7e,f).

Overall, our study highlights the complexity of the effects of IgG-Fc N-glycosylation, particularly terminal sialylation, on the interactions with the Fc γ Rs. This complexity echoes the multiple protein-protein, protein-glycan and glycan-glycan interfaces involved as it highlights the need for a careful glycosylation characterization to fully understand the subtleties of the mechanism governing IgG/Fc γ R interactions. Furthermore, this study underlines the usefulness of using SPR biosensors to predict the *in vitro*, and possibly *in vivo*, effector functions such as ADCP, CDC, and as demonstrated here the ADCC response of therapeutic antibodies.

5.2.5 Materials and Methods

5.2.5.1 Cell lines

The Chinese hamster ovary-3E7 (CHO-3E7) and the human embryonic kidney 293-6E (293-6E) cell lines, stably expressing a truncated Epstein-Barr virus Nuclear Antigen-1 (EBNA1), were cultured as described elsewhere (Cambay et al., 2019).

5.2.5.2 Production and purification of TzM glycoforms

TzM is a humanized mouse IgG1 directed against the human epidermal growth factor receptor-2 (HER2 or Erb2). TzM glycoforms were produced by transient gene expression in CHO-3E7 cells. The light and heavy chains of TzM were each cloned into pTT5[®] vectors (Zhang, J. et al., 2009), as well as the human glycosyltransferases β 1,4-galactosyltransferase 1 (GT), β -galactoside α -2,6-sialyltransferase 1 (ST6), and the bacterial enzyme GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase (RMD). When GT, ST6 or RMD were required, the DNA transfection mixes contained 5 %, 20 % and 5 % in weight of GT, ST6 and RMD plasmids, respectively. The pTT[®] vector encoding the green fluorescent protein (GFP) was used to monitor transfection efficiency as described elsewhere (Durocher et al., 2002). GFP plasmid was incorporated as 5 % in weight for all transfections. The pTT22[®]-AKT-DD plasmid is derived from the pTT[®] vector and encodes constitutively active bovine AKT (Alessi et al., 1996). AKT plasmid was incorporated as 15 % in weight for all transfections. The remaining of the DNA mix was a mixture of LC and HC plasmids (LC:HC ratio of 6:4). Linear deacylated polyethylenimine (L-PEI_{max}) was from Polysciences (cat# 24765) as sterile stock solutions in water (1 mg/mL) and stored at 4 °C. Cells were diluted two days before transfection in fresh medium at 0.25×10^6 cells/mL. They were transfected with viability greater than 99 % at densities between 1.5 and 2.0×10^6 cells/mL. DNA and L-PEI_{max} solutions were separately prepared in complete F17 medium for a final concentration of 1 μ g/mL and 5 μ g/mL, respectively in the final culture volume, then L-PEI_{max} was added to DNA. The mixtures were immediately vortexed and incubated for 5 min at room temperature prior to addition to the cells. One day post-transfection (dpt), cells were fed with TN1 peptone and valproic acid to final concentrations of 1 % (w/v) and 0.5 mM, respectively. The temperature was shifted to 32 °C and the glucose concentration was adjusted to a final concentration of 30 mM. Transfection efficiency was assessed two dpt by determining the percentage of GFP-positive cells using a

Cellometer® K2 (Nexcelom Bioscience). Four dpt, cell cultures were centrifuged at 3,300 x g for 20 min at a viability higher than 80 %. Supernatants were then filtered through 0.45 µm membranes and the clarified supernatants were purified by affinity chromatography with MabSelect™ SuRe™ columns (GE Healthcare, cat# 17-5438-02) followed by size exclusion chromatography (SEC) using a Superdex200 column (GE Healthcare, cat# 28-9893-35) to remove aggregates as explained elsewhere (Cambay et al., 2019). The final yields ranged from 4.7 to 59.8 mg/L.

5.2.5.3 Production and purification of FcγRs

E5-tagged FcγRs were produced by transient gene expression in CHO-3E7 and 293-6E then purified by immobilized metal-affinity chromatography (IMAC) followed by size exclusion chromatography (SEC) as described elsewhere (Cambay et al., 2019). Concerning the E5-tagged FcγRIIa/b and FcγRI, their purification characterization is given in Figure annexe B - 3.

5.2.5.4 Production and purification of soluble ST6Gal1

DNA encoding the truncated human ST6Gal1 lacking the N-terminal cytoplasmic tail and the transmembrane domain was inserted into a pTT5® vector. The truncated ST6Gal1 sequence was flanked by a signal peptide from the vascular endothelial growth factor A for secretion and a 10-histidine tag inserted at the C-terminus to facilitate its purification. Soluble ST6Gal1 were produced by transient expression in 293-6E cells at 37 °C. Cell cultures were harvested 5 dpt, centrifuged at 3,300 x g for 20 min and supernatants were filtered through 0.45 µm membranes. The clarified supernatants were purified by immobilized metal-affinity chromatography (IMAC) with 4 mL Ni Sepharose® Excel columns (GE Healthcare, cat# 17-3712-03). The columns were washed with sodium phosphate 50 mM, 300 mM NaCl, pH 7.0 and the ST6Gal1 were eluted with the washing buffer containing imidazole (500 mM), pH 7.0. The fractions containing the ST6Gal1 were pooled and the elution buffer was exchanged against PBS with a CentriPure P100 column (Emp Biotech, cat# CP-0119-Z001.0-001). Purified ST6Gal1 was finally quantified by absorbance at 280 nm using a Nanodrop™ spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) based on its molar extinction coefficient, sterile-filtered, aliquoted and stored at -80 °C.

5.2.5.5 *In vitro* sialylation (IVS)

The *in vitro* sialylation method was adapted from the protocol published by Barb et al. (2012). An enzyme:antibody ratio of 1:6 (w/w) was used. The antibody (1-1.5 mg/mL) was sialylated with ST6Gal1 in presence of CMP-N-acetylneuraminic acid (CMP-NANA - Roche, cat# 05974003103) at 1 mM in 25 mM MOPS buffer, KCl 100 mM, pH 7.2 at 37 °C. After 24 hours, the reaction mixture was concentrated 10-fold on Amicon Ultra-15 mL with a 3 kDa cut-off (Millipore, cat# UFC900308) to eliminate the free CMP. The volume was readjusted to its initial value and a fresh aliquot of CMP-NANA was added to a final concentration of 1 mM. This 24-hour cycle was repeated three times. At the end of the fourth day, the reaction mixture was loaded on a 1 mL MabSelect™ SuRe™ column and the antibody was purified as described above.

5.2.5.6 Coomassie-stained gels and lectin blots

The proteins were loaded on NuPAGE Novex 4-12 % gels from Life sciences (cat#NP0323BOX) ran in MES buffer (Novex) at 170 V for 60 minutes. For the Coomassie staining, 1.5 µg of protein per well were loaded. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue for 15 min then destained overnight in a solution of acetic acid 7.5 % (v:v) and ethanol 20 % (v:v). For lectin blots, biotinylated lectins *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), *Erythrina cristagalli* lectin (ECL), *Maackia amurensis* lectin II (MALII) and *Lens culinaris* agglutinin (LCA) were purchased from Vector Laboratories (cat# SNA: B-1305, ECL: B-1145, MALII: B-1265, LCA: B-1045). Samples were treated with DTT (10 min at 70 °C) and 120 ng of purified mAbs were loaded on the gels for SNA blots and 180 ng for the other lectin blots. After protein transfer, the nitrocellulose membrane was incubated one hour in blocking reagent, then with a given lectin for two hours (5 µg/mL ECL, 5 µg/mL MALII, 2 µg/mL SNA or 10 µg/mL LCA), followed by incubation with 1:1,000 Streptavidin-HRP (BD Biosciences, cat# 554066) for one hour. The membranes were thoroughly washed with PBS-Tween 0.1 % before each incubation step. Ponceau red staining was performed to control the amount of protein loaded. Signal was revealed with the ImmunStar™ Western C™ Substrate Kit (Bio-Rad, cat# 170-5070) and the images recorded with a Chemidoc MP Imaging System (Bio-Rad). Blots were analysed using Image Lab software 6.0.1 (Bio-Rad).

5.2.5.7 Capillary isoelectric focusing (cIEF)

Separations were performed on Agilent 7100 Capillary Electrophoresis systems (Agilent Technologies) with the detector filter G7100- 68750 at 280 nm. Typically, a capillary with a 33 cm total length (24 cm effective length) was pre-conditioned at 3.5 bar for 5 min with 0.5 % methyl cellulose, then for 3 min with 4.3 M urea and finally for 2 min with dH₂O prior to injection. Each injection was performed for 100 s at 3.5 bar. Then, the capillary inlet and outlet were dipped into 200 mM phosphoric acid and 300 mM NaOH respectively and the focusing was performed for 5 min at + 25 kV. After 5 min, the capillary outlet was dipped into dH₂O then into 350 mM acetic acid and the chemical mobilization was performed for 25 min at + 30 kV. Each run was repeated three times. The samples were prepared as followed: 5 µg of TZM glycoforms were mixed with 0.6 % methyl cellulose in 3 M urea, L-Arginine, iminodiacetic acid, DPBS and 2 pI markers mixed (3.59 and 10). The apparent pIs were determined based on the 2 pI markers.

5.2.5.8 Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)

Glycans were released from the antibody using RapidTM PNGase F (New England BioLabs, cat# P0710) at 37 °C for 24 hours. The enzyme and the antibody were removed using prewashed 10 kDa molecular weight cut-off filters, and the glycans were evaporated to dryness under vacuum. They were then labelled with 2-aminobenzamide (2-AB) (Sigma-Aldrich, cat# PP0520) (Bigge et al., 1995). Glycans were analysed by HILIC with fluorescent detection using a TSKgel[®] Amide-80 4.6 x 150 mm, 3.0 µm (Tosoh Biosciences, cat# 0021867) with the column heated to 45 °C and a flow rate of 0.5 mL/min. Glycans were eluted using 100 mM ammonium formate, pH 4.5 (mobile phase A) and 100 % acetonitrile (mobile phase B) starting with an initial ratio of 25:75, followed by a gradient to 50:50 over 50 minutes. Peaks were calibrated with a 2-AB labelled dextran ladder standard (Agilent, cat# 5190-6998) and compared to GU values in the database Glycobase.NIBRT (https://glycobase.nibrt.ie/glycobase/show_nibrt.action). Structural assignment was also based on exoglycosidase analysis (Royle, Radcliffe, Dwek, & Rudd, 2007). Broad specificity Neuraminidase (MP biomedical cat# 153846) and Sialidase S (Prozyme, cat# GK80020) were used for sialic acid digests according to the manufacturer's instructions. The glycans abundance was calculated based on the peak areas observed in the chromatograms. The percentage of a given glycan was obtained as the peak area of the PNGaseF released glycan divided by the sum of the

areas of all the peaks detected in the chromatogram. These percentages were then compiled by glycan families using the following terms:

$$\% \text{fucosylated} = 100 * (\% \text{G0F} + \% \text{G1Fa} + \% \text{G1Fb} + \% \text{G2F} + \% \text{G1FS(3)1} + \% \text{G1FS(6)1} + \% \text{G2FS(3)1} + \% \text{G2FS(6)1} + \% \text{G2FS(3,3)2} + \% \text{G2FS(3,6)2} + \% \text{G2FS(6,6)2}) / (\% \text{G0F} + \% \text{G1Fa} + \% \text{G1Fb} + \% \text{G2F} + \% \text{G0} + \% \text{G1a} + \% \text{G1b} + \% \text{G2} + \% \text{G1FS(3)1} + \% \text{G1FS(6)1} + \% \text{G2FS(3)1} + \% \text{G2FS(6)1} + \% \text{G2FS(3,3)2} + \% \text{G2FS(3,6)2} + \% \text{G2FS(6,6)2} + \% \text{G2S(6)1} + \% \text{G2S(6,6)2})$$

$$\% \text{agalactosylated} = 100 * (2 * \% \text{G0F} + 1 * \% \text{G1Fa} + 1 * \% \text{G1Fb} + 2 * \% \text{G0} + 1 * \% \text{G1a} + 1 * \% \text{G1b} + 1 * \% \text{G1FS(3)1} + 1 * \% \text{G1FS(6)1}) / (2 * \% \text{G0F} + 2 * \% \text{G1Fa} + 2 * \% \text{G1Fb} + 2 * \% \text{G2F} + 2 * \% \text{G0} + 2 * \% \text{G1a} + 2 * \% \text{G1b} + 2 * \% \text{G2} + 2 * \% \text{G1FS(3)1} + 2 * \% \text{G1FS(6)1} + 2 * \% \text{G2FS(3)1} + 2 * \% \text{G2FS(6)1} + 2 * \% \text{G2FS(3,3)2} + 2 * \% \text{G2FS(3,6)2} + 2 * \% \text{G2FS(6,6)2} + 2 * \% \text{G2S(6)1} + 2 * \% \text{G2S(6,6)2})$$

$$\% \text{galactosylated} = 100 * (1 * \% \text{G1Fa} + 1 * \% \text{G1Fb} + 2 * \% \text{G2F} + 1 * \% \text{G1a} + 1 * \% \text{G1b} + 2 * \% \text{G2} + 1 * \% \text{G2FS(3)1} + 1 * \% \text{G2FS(6)1} + 1 * \% \text{G2S(6)1}) / (2 * \% \text{G0F} + 2 * \% \text{G1Fa} + 2 * \% \text{G1Fb} + 2 * \% \text{G2F} + 2 * \% \text{G0} + 2 * \% \text{G1a} + 2 * \% \text{G1b} + 2 * \% \text{G2} + 2 * \% \text{G1FS(3)1} + 2 * \% \text{G1FS(6)1} + 2 * \% \text{G2FS(3)1} + 2 * \% \text{G2FS(6)1} + 2 * \% \text{G2FS(3,3)2} + 2 * \% \text{G2FS(3,6)2} + 2 * \% \text{G2FS(6,6)2} + 2 * \% \text{G2S(6)1} + 2 * \% \text{G2S(6,6)2})$$

$$\% \text{sialylated} = 100 * (1 * \% \text{G1FS(3)1} + 1 * \% \text{G1FS(6)1} + 1 * \% \text{G2FS(3)1} + 1 * \% \text{G2FS(6)1} + 2 * \% \text{G2FS(3,3)2} + 2 * \% \text{G2FS(3,6)2} + 2 * \% \text{G2FS(6,6)2} + 1 * \% \text{G2S(6)1} + 2 * \% \text{G2S(6,6)2}) / (1 * \% \text{G1Fa} + 1 * \% \text{G1Fb} + 2 * \% \text{G2F} + 1 * \% \text{G1a} + 1 * \% \text{G1b} + 2 * \% \text{G2} + 1 * \% \text{G1FS(3)1} + 1 * \% \text{G1FS(6)1} + 2 * \% \text{G2FS(3)1} + 2 * \% \text{G2FS(6)1} + 2 * \% \text{G2FS(3,3)2} + 2 * \% \text{G2FS(3,6)2} + 2 * \% \text{G2FS(6,6)2} + 2 * \% \text{G2S(6)1} + 2 * \% \text{G2S(6,6)2})$$

5.2.5.9 Surface plasmon resonance analysis

SPR data experiments were performed using a Biacore T100 system (GE Healthcare) and HBS-EP+ (10 mM HEPES, 0,15 M NaCl, 3 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], and 0.05 % [v/v] surfactant P20, pH 7.4) as running buffer. Analysis and sample compartment temperatures were set to 25 °C and 4 °C, respectively. The SPR experiments were performed on research-grade CM5 sensor chips. HBS-EP+ (cat# BR100669), Series S Sensor chip CM5 (cat# 29104988) were all from GE Healthcare. Each E5-tagged FcγRs (i.e., FcγRIIIa_{F158}, FcγRIIIa_{V158}, FcγRIIa, FcγRIIb and FcγRI) was individually captured upon Kcoil previously immobilized at the biosensor surface via coiled-coil interactions as described elsewhere (injections at 0.25 μg/mL) (Cambay et al., 2019). TZM glycoform solutions were injected in triplicate over captured FcγRs and control surfaces at 30 μL/min (FcγRIIIa_{V158}) or 50 μL/min (other FcγRs). The receptor/IgG dissociation was monitored by injecting running buffer. The surfaces were regenerated with one

20 s injection of 6 M guanidine/HCl at 100 μ L/min. Data were collected at a rate of 10 Hz. Prior to analysis, sensorgrams were double-referenced using BiaEvaluation 3.1 software, by subtracting data from the reference flow cell and then subtracting a blank cycle where buffer was injected instead of protein sample. To reduce the influence of spikes in data analysis, 0.5 s of data was removed at injection start and stop. A minimum of one independent replicate for each condition was performed on different days on two different Kcoil surfaces and by two different operators. Representative results are shown.

5.2.5.10 Surrogate ADCC reporter bioassay

Analysis of the binding of the TzM glycoforms to Fc γ RIIIa was also evaluated using a surrogate ADCC reporter bioassay in which engineered Jurkat T-cells expressing either the low-affinity Fc γ RIIIa_{F158} or the high affinity Fc γ RIIIa_{V158} variants (Promega, cat# G930A and cat# G701A) were used as effector cells. In addition, these effector cells have also been engineered to express the nuclear factor of activated T-cells (NFAT) signalling cascade linked to luciferase which generates a bioluminescent signal upon engagement of the Fc γ RIIIa with the Fc portion of an IgG interacting with its target expressed on the target cell (i.e. BT-474 cells). Effector cells were propagated in RPMI 1640 (Hyclone, cat#SH30096.01) supplemented with 10 % FBS (Hyclone, cat#SH30071.03), 100 μ g/mL hygromycin (Invitrogen, cat#10687-010), 250 μ g/mL G418 sulfate (Invitrogen, cat#10131-035), 1 mM sodium pyruvate (Gibco, cat#11360-070) and 0.1 mM MEM non-essential amino acids (Gibco cat#11140-050). BT-474 cells which express high levels of HER2 were used as target cells for the TzM glycoforms. The assay was carried out according to the manufacturer's instructions. Briefly, the day prior to the assay, target cells were seeded at 8000 cells per well in the inner 60 wells of 96-well opaque white plates (Corning, cat#3917). Plates were incubated overnight in a humidified incubator at 37 °C with 5 % CO₂. Then, TzM glycoforms diluted in ADCC buffer (RPMI + 4 % low IgG serum (Promega, cat#G7110)) and effector cells were added to wells containing the target cells. After six hours of incubation (humidified incubator at 37 °C with 5 % CO₂), Bioglo luciferase substrate (Promega, cat#G7941) was added to the wells and luciferase activity was quantified by reading the luminescence. Commercial Herceptin and Synagis mAbs were included in the assays as positive and non-specific negative control respectively. The half-maximal effective concentration (EC₅₀) of the TzM glycoforms was

calculated in GraphPad Prism (v6.01 for Windows, La Jolla, CA, USA) using a non-linear fit (least squares) with a variable slope.

5.2.5.11 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism (v6.01 for Windows, La Jolla, CA, USA). The level of significance was set at $p < 0.05$ using two-tailed tests.

5.2.6 Acknowledgements

We thank Gilles Saint-Laurent, Denis L'Abbé and Christian Gervais for technical support and fruitful discussions. This work was supported by the National Research Council Canada: Human Health Therapeutics Research Centre (YD), the NSERC Discovery program (YD and GDC) the Canada Research Chair on Protein-Enhanced Biomaterials (GDC), and by the TransMedTech Institute (NanoBio Technology Platform) and its main funding partner, the Canada First Research Excellence Fund.

5.2.7 Author Contributions

CR, YD and FC designed the study. CR and FC performed proteins production and purification as well as lectin blots. TMT conceived and performed cIEF analysis. DB and MG conceived and performed HILIC analysis. FC and MG conceived and performed SPR analysis. CC and AL conceived and performed the ADCC assays. All authors analysed the results. CR and FC drafted the manuscript. YD, GDC, OH and AL reviewed the manuscript, YD, GDC and OH supervised the work.

5.2.8 Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at Annexe B

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

5.2.9 References

- Ahmed, A. A., Giddens, J., Pincetic, A., Lomino, J. V., Ravetch, J. V., Wang, L.-X., & Bjorkman, P. J. (2014). Structural characterization of anti-inflammatory immunoglobulin G Fc proteins. *J. Mol. Biol.*, 426(18), 3166-3179. doi:10.1016/j.jmb.2014.07.006
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., & Hemmings, B. A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.*, 15(23), 6541-6551. doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb01045.x
- Anthony, R. M., Nimmerjahn, F., Ashline, D. J., Reinhold, V. N., Paulson, J. C., & Ravetch, J. V. (2008). A recombinant IgG Fc that recapitulates the anti-inflammatory activity of IVIG. *Science*, 320(5874), 373. doi:10.1126/science.1154315
- Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M., & Dwek, R. A. (2007). The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 21-50. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702
- Barb, A. W., Meng, L., Gao, Z., Johnson, R. W., Moremen, K. W., & Prestegard, J. H. (2012). NMR characterization of immunoglobulin G Fc glycan motion on enzymatic sialylation. *Biochemistry*, 51(22), 4618-4626. doi:10.1021/bi300319q
- Bigge, J., Patel, T., Bruce, J., Goulding, P., Charles, S., & Parekh, R. (1995). Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Anal. biochem.*, 230(2), 229-238. doi:10.1006/abio.1995.1468
- Boyd, P., Lines, A., & Patel, A. (1995). The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of Campath-1H. *Molecular immunology*, 32(17-18), 1311-1318. doi:10.1016/0161-5890(95)00118-2
- Bruggeman, C. W., Dekkers, G., Bentlage, A. E., Treffers, L. W., Nagelkerke, S. Q., Lissenberg-Thunnissen, S., . . . Rispen, T. (2017). Enhanced effector functions due to antibody defucosylation depend on the effector cell Fcγ receptor profile. *The Journal of Immunology*, 1700116. doi:10.4049/jimmunol.1700116
- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D. A., Fernandez, N., Jorieux, S., & Daëron, M. (2009). Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, 113(16), 3716-3725. doi:10.1182/blood-2008-09-179754
- Cambay, F., Henry, O., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2019). Impact of N-glycosylation on Fcγ receptor / IgG interactions: unravelling differences with an enhanced surface plasmon resonance biosensor assay based on coiled-coil interactions. *MAbs*, 11(3), 435-452. doi:10.1080/19420862.2019.1581017
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., & Watier, H. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*, 99(3), 754-758. doi:10.1182/blood.V99.3.754

- Chung, S., Quarmby, V., Gao, X., Ying, Y., Lin, L., Reed, C., . . . Shen, A. (2012). Quantitative evaluation of fucose reducing effects in a humanized antibody on Fc γ receptor binding and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activities. *MAbs*, 4(3), 326-340. doi:10.4161/mabs.19941
- Dashivets, T., Thomann, M., Rueger, P., Knaupp, A., Buchner, J., & Schlothauer, T. (2015). Multi-angle effector function analysis of human monoclonal IgG glycovariants. *PloS one*, 10(12), e0143520. doi:10.1371/journal.pone.0143520
- Dekkers, G., Plomp, R., Koeleman, C. A., Visser, R., Von Horsten, H. H., Sandig, V., . . . Vidarsson, G. (2016). Multi-level glyco-engineering techniques to generate IgG with defined Fc-glycans. *Sci. Rep.*, 6, 36964. doi:10.1038/srep36964
- Dekkers, G., Treffers, L., Plomp, R., Bentlage, A. E., de Boer, M., Koeleman, C. A., . . . Mok, J. Y. (2017). Decoding the human immunoglobulin G-glycan repertoire reveals a spectrum of Fc-receptor-and complement-mediated-effector activities. *Frontiers in immunology*, 8, 877. doi:10.3389/fimmu.2017.00877
- Dorion-Thibaudeau, J., Raymond, C., Lattova, E., Perreault, H., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2014). Towards the development of a surface plasmon resonance assay to evaluate the glycosylation pattern of monoclonal antibodies using the extracellular domains of CD16a and CD64. *J. Immunol. Methods*, 408, 24-34. doi:10.1016/j.jim.2014.04.010
- Dorion-Thibaudeau, J., St-Laurent, G., Raymond, C., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2016). Biotinylation of the Fc gamma receptor ectodomains by mammalian cell co-transfection: application to the development of a surface plasmon resonance-based assay. *J. Mol. Recognit.*, 29(2), 60-69. doi:10.1002/jmr.2495
- Durocher, Y., & Butler, M. (2009). Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol*, 20(6), 700-707. doi:10.1016/j.copbio.2009.10.008
- Durocher, Y., Perret, S., & Kamen, A. (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.*, 30(2), E9. doi:10.1093/nar/30.2.e9
- Edberg, J. C., & Kimberly, R. P. (1997). Cell type-specific glycoforms of Fc gamma RIIIa (CD16): differential ligand binding. *The Journal of Immunology*, 159(8), 3849-3857.
- Ferrara, C., Brunker, P., Suter, T., Moser, S., Puntener, U., & Umana, P. (2006). Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous beta1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi alpha-mannosidase II. *Biotechnol Bioeng*, 93(5), 851-861. doi:10.1002/bit.20777
- Ferrara, C., Grau, S., Jager, C., Sondermann, P., Brunker, P., Waldhauer, I., . . . Benz, J. (2011). Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcgammaRIII and antibodies lacking core fucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(31), 12669-12674. doi:10.1073/pnas.1108455108

- Ferrara, C., Stuart, F., Sondermann, P., Brunker, P., & Umana, P. (2006). The carbohydrate at FcγRIIIa Asn-162. An element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms. *J. Biol. Chem.*, 281(8), 5032-5036. doi:10.1074/jbc.M510171200
- Frank, M., Walker, R. C., Lanzilotta, W. N., Prestegard, J. H., & Barb, A. W. (2014). Immunoglobulin G1 Fc domain motions: implications for Fc engineering. *J. Mol. Biol.*, 426(8), 1799-1811. doi:10.1016/j.jmb.2014.01.011
- Hayes, J. M., Frostell, A., Karlsson, R., Muller, S., Millan-Martin, S., Pauers, M., . . . Rudd, P. M. (2017). Identification of Fc gamma receptor glycoforms that produce differential binding kinetics for rituximab. *Mol. Cell. Proteomics*. doi:10.1074/mcp.M117.066944
- Houde, D., Peng, Y., Berkowitz, S. A., & Engen, J. R. (2010). Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *Mol. Cell. Proteomics*, 9(8), 1716-1728. doi:10.1074/mcp.M900540-MCP200
- Jefferis, R. (2009). Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends in pharmacological sciences*, 30(7), 356-362. doi:10.1016/j.tips.2009.04.007
- Jiang, X.-R., Song, A., Bergelson, S., Arroll, T., Parekh, B., May, K., . . . Schenerman, M. (2011). Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies. *Nature reviews Drug discovery*, 10(2), 101-111. doi:10.1038/nrd3365
- Kanda, Y., Yamada, T., Mori, K., Okazaki, A., Inoue, M., Kitajima-Miyama, K., . . . Kakita, S. (2006). Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types. *Glycobiology*, 17(1), 104-118. doi:10.1093/glycob/cwl057
- Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2006). Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*, 313(5787), 670-673. doi:10.1126/science.1129594
- Kelly, R. M., Kowle, R. L., Lian, Z., Striffler, B. A., Witcher, D. R., Parekh, B. S., . . . Frye, C. C. (2018). Modulation of IgG1 immunoeffector function by glycoengineering of the GDP-fucose biosynthesis pathway. *Biotechnol Bioeng*, 115(3), 705-718. doi:10.1002/bit.26496
- Kuroguchi, M., Mori, M., Osumi, K., Tojino, M., Sugawara, S.-i., Takashima, S., . . . Amano, J. (2015). Glycoengineered monoclonal antibodies with homogeneous glycan (M3, G0, G2, and A2) using a chemoenzymatic approach have different affinities for FcγRIIIa and variable antibody-dependent cellular cytotoxicity activities. *PLoS One*, 10(7), e0132848. doi:10.1371/journal.pone.0132848
- Lalonde, M.-E., & Durocher, Y. (2017). Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *Journal of Biotechnology*, 251, 128-140. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.04.028
- Lee, E., Roth, J., & Paulson, J. (1989). Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2, 6-sialyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 264(23), 13848-13855.

- Li, T., DiLillo, D. J., Bournazos, S., Giddens, J. P., Ravetch, J. V., & Wang, L.-X. (2017). Modulating IgG effector function by Fc glycan engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *114*(13), 3485-3490. doi:10.1073/pnas.1702173114
- Lin, C.-W., Tsai, M.-H., Li, S.-T., Tsai, T.-I., Chu, K.-C., Liu, Y.-C., . . . Shivatare, S. S. (2015). A common glycan structure on immunoglobulin G for enhancement of effector functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *112*(34), 10611-10616. doi:10.1073/pnas.1513456112
- Lu, J., Chu, J., Zou, Z., Hamacher, N. B., Rixon, M. W., & Sun, P. D. (2015). Structure of FcγRI in complex with Fc reveals the importance of glycan recognition for high-affinity IgG binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *112*(3), 833-838. doi:10.1073/pnas.1418812112
- Mizushima, T., Yagi, H., Takemoto, E., Shibata-Koyama, M., Isoda, Y., Iida, S., . . . Kato, K. (2011). Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans. *Genes to Cells*, *16*(11), 1071-1080. doi:10.1111/j.1365-2443.2011.01552.x
- Naso, M. F., Tam, S. H., Scallon, B. J., & Raju, T. S. (2010). Engineering host cell lines to reduce terminal sialylation of secreted antibodies. *MAbs*, *2*(5), 519-527. doi:10.4161/mabs.2.5.13078
- Peipp, M., van Bueren, J. J. L., Schneider-Merck, T., Bleeker, W. W., Dechant, M., Beyer, T., . . . van de Winkel, J. G. (2008). Antibody fucosylation differentially impacts cytotoxicity mediated by NK and PMN effector cells. *Blood*, *112*(6), 2390-2399. doi:10.1182/blood-2008-03-144600
- Peschke, B., Keller, C. W., Weber, P., Quast, I., & Lünemann, J. D. (2017). Fc-galactosylation of human immunoglobulin gamma isotypes improves C1q binding and enhances complement-dependent cytotoxicity. *Frontiers in immunology*, *8*, 646. doi:10.3389/fimmu.2017.00646
- Raju, T. S. (2008). Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Current opinion in immunology*, *20*(4), 471-478. doi:10.1016/j.coi.2008.06.007
- Raju, T. S., Briggs, J. B., Chamow, S. M., Winkler, M. E., & Jones, A. J. (2001). Glycoengineering of therapeutic glycoproteins: in vitro galactosylation and sialylation of glycoproteins with terminal N-acetylglucosamine and galactose residues. *Biochemistry*, *40*(30), 8868-8876. doi:10.1021/bi010475i
- Raymond, C., Robotham, A., Kelly, J., Lattova, E., Perreault, H., & Durocher, Y. (2012). Production of highly sialylated monoclonal antibodies. Dans S. Petrescu (édit.), *Glycosylation*: IntechOpen Publisher.
- Raymond, C., Robotham, A., Spearman, M., Butler, M., Kelly, J., & Durocher, Y. (2015). Production of alpha2,6-sialylated IgG1 in CHO cells. *MAbs*, *7*(3), 571-583. doi:10.1080/19420862.2015.1029215
- Rillahan, C. D., Antonopoulos, A., Lefort, C. T., Sonon, R., Azadi, P., Ley, K., . . . Paulson, J. C. (2012). Global metabolic inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases remodel the glycome. *Nature chemical biology*, *8*(7), 661-668. doi:10.1038/nchembio.999

- Royle, L., Radcliffe, C. M., Dwek, R. A., & Rudd, P. M. (2007). Detailed structural analysis of N-glycans released from glycoproteins in SDS-PAGE gel bands using HPLC combined with exoglycosidase array digestions. *Glycobiology protocols*, 125-143. doi:10.1385/1-59745-167-3:125
- Scallon, B. J., Tam, S. H., McCarthy, S. G., Cai, A. N., & Raju, T. S. (2007). Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Molecular immunology*, 44(7), 1524-1534. doi:10.1016/j.molimm.2006.09.005
- Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., . . . Presta, L. G. (2002). Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J. Biol. Chem.*, 277(30), 26733-26740. doi:10.1074/jbc.M202069200
- Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., . . . Yamasaki, M. (2003). The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 278(5), 3466-3473. doi:10.1074/jbc.M210665200
- Shivatara, S. S., Huang, L.-Y., Zeng, Y.-F., Liao, J.-Y., You, T.-H., Wang, S.-Y., . . . Chen, L.-T. (2018). Development of glycosynthases with broad glycan specificity for the efficient glyco-remodeling of antibodies. *Chemical Communications*. doi:10.1039/C8CC03384F
- Subedi, G. P., & Barb, A. W. (2016). The immunoglobulin G1 N-glycan composition affects binding to each low affinity Fcγ receptor. *MAbs*, 8(8), 1512-1524. doi:10.1080/19420862.2016.1218586
- Subedi, G. P., & Barb, A. W. (2018). CD16a with oligomannose-type N-glycans is the only “low affinity” Fcγ receptor that binds the IgG crystallizable fragment with high affinity in vitro. *J. Biol. Chem.*, 293, 16842-16850. doi:10.1074/jbc.RA118.004998
- Thomann, M., Schlothauer, T., Dashivets, T., Malik, S., Avenal, C., Bulau, P., . . . Reusch, D. (2015). In vitro glycoengineering of IgG1 and its effect on Fc receptor binding and ADCC activity. *Plos One*, 10(8). doi:10.1371/journal.pone.0134949
- Tsukimura, W., Kuroguchi, M., Mori, M., Osumi, K., Matsuda, A., Takegawa, K., . . . Shirai, T. (2017). Preparation and biological activities of anti-HER2 monoclonal antibodies with fully core-fucosylated homogeneous bi-antennary complex-type glycans. *Bioscience, biotechnology, biochemistry*, 81(12), 2353-2359. doi:10.1080/09168451.2017.1394813
- van Berkel, P. H., Gerritsen, J., van Voskuilen, E., Perdok, G., Vink, T., van de Winkel, J. G., & Parren, P. W. (2010). Rapid production of recombinant human IgG with improved ADCC effector function in a transient expression system. *Biotechnol. Bioeng.*, 105(2), 350-357. doi:10.1002/bit.22535
- von Horsten, H. H., Ogorek, C., Blanchard, V., Demmler, C., Giese, C., Winkler, K., . . . Sandig, V. (2010). Production of non-fucosylated antibodies by co-expression of heterologous GDP-

- 6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase. *Glycobiology*, 20(12), 1607-1618. doi:10.1093/glycob/cwq109
- von Horsten, H. H., Ogorek, C., Blanchard, V., Demmler, C., Giese, C., Winkler, K., . . . Sandig, V. (2010). Production of non-fucosylated antibodies by co-expression of heterologous GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase. *Glycobiology*, 20(12), 1607-1618. doi:10.1093/glycob/cwq109
- Wada, R., Matsui, M., & Kawasaki, N. (2018). Influence of N-glycosylation on effector functions and thermal stability of glycoengineered IgG1 monoclonal antibody with homogeneous glycoforms. *MAbs*, (just-accepted). doi:10.1080/19420862.2018.1551044
- Walsh, G. (2018). Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.*, 36(12), 1136-1145. doi:10.1038/nbt.4305
- Yamaguchi, Y., Nishimura, M., Nagano, M., Yagi, H., Sasakawa, H., Uchida, K., . . . Kato, K. (2006). Glycoform-dependent conformational alteration of the Fc region of human immunoglobulin G1 as revealed by NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1760(4), 693-700. doi:10.1016/j.bbagen.2005.10.002
- Yamane-Ohnuki, N., Kinoshita, S., Inoue-Urakubo, M., Kusunoki, M., Iida, S., Nakano, R., . . . Satoh, M. (2004). Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnol. Bioeng.*, 87(5), 614-622. doi:10.1002/bit.20151
- Yu, X., Baruah, K., Harvey, D. J., Vasiljevic, S., Alonzi, D. S., Song, B.-D., . . . Crispin, M. (2013). Engineering hydrophobic protein-carbohydrate interactions to fine-tune monoclonal antibodies. *Journal of the American Chemical Society*, 135(26), 9723-9732. doi:10.1021/ja4014375
- Zeck, A., Pohlentz, G., Schlothauer, T., Peter-Katalinic, J., & Regula, J. T. (2011). Cell type-specific and site directed N-glycosylation pattern of FcγRIIIa. *J. Proteome Res.*, 10(7), 3031-3039. doi:10.1021/pr1012653
- Zhang, J., Liu, X., Bell, A., To, R., Baral, T. N., Azizi, A., . . . Durocher, Y. (2009). Transient expression and purification of chimeric heavy chain antibodies. *Protein Expr. Purif.*, 65(1), 77-82. doi:10.1016/j.pep.2008.10.011
- Zhang, N., Liu, L., Dan Dumitru, C., Cummings, N. R. H., Cukan, M., Jiang, Y., . . . Mallem, M. R. (2011). Glycoengineered Pichia produced anti-HER2 is comparable to trastuzumab in preclinical study. *MAbs*, 3(3), 289-298. doi:10.4161/mabs.3.3.15532

CHAPITRE 6 ARTICLE 3: GLYCOSYLATION OF FCY RECEPTORS INFLUENCES THEIR INTERACTION WITH VARIOUS IGG1 GLYCOFORMS

6.1 Article presentation

Dans cette section est repris l'article intitulé *Glycosylation of Fcγ receptors influences their interaction with various IgG1 glycoforms*, qui a été soumis dans le journal *Molecular Immunology* le 15 décembre 2019.

Les anticorps monoclonaux thérapeutiques sont principalement des IgG1 qui interagissent avec les FcγR à la surface des cellules immunitaires pour activer des fonctions effectrices. Comme démontré précédemment, la N-glycosylation de la région Fc de l'IgG1 impacte son interaction avec les FcγR et est donc considérée comme un attribut de qualité critique. Par ailleurs, des études pionnières ont mis en évidence une complexité supplémentaire liée aux N-glycanes des FcγR, que ce soit au travers de la macrohétérogénéité ou de la microhétérogénéité. Cependant, l'impact de certains glycanes varient selon les études. Dans ce contexte, nous avons étudié l'impact des N-glycanes des FcγR sur leurs interactions avec des glycoformes d'IgG1. Pour cela, nous avons réalisé de la mutagenèse dirigée combinée à une modification du glycoprofil des FcγR. Puis, nous avons évalué leurs interactions pour plusieurs glycoformes de trastuzumab au moyen de notre essai SPR. Nous avons montré que les N-glycanes du FcγRIIIa ont l'impact le plus significatif sur l'interaction avec les IgG1. Plus spécifiquement, le glycanes à la position N162 a une forte influence positive sur l'affinité avec les IgG1 afucosylées. Au contraire, le glycanes à la position N45 présente un impact négatif indépendamment du glycoprofil de l'IgG1. Concernant la microhétérogénéité, nous avons montré que seul le profil glycanique du FcγRIIIa possède un impact sur l'interaction avec les IgG1 avec une affinité plus élevée lorsque le glycanes à la position N162 du FcγRIIIa présente une structure oligomannosidique. Nos travaux ont également mis en évidence l'influence forte et complexe de la N-glycosylation des FcγR sur leur interaction avec l'IgG1 et améliore notre compréhension de l'impact de la N-glycosylation des FcγR sous leur forme naturelle.

6.2 Glycosylation of Fc γ receptors influences their interaction with various IgG1 glycoforms

Florian Cambay^{1,2}, Catherine Forest-Nault^{1,2}, Lea Dumoulin¹, Alexis Seguin¹, Olivier Henry¹, Yves Durocher^{2,3}, and Gregory De Crescenzo^{1*}

From the ¹Department of Chemical Engineering, Polytechnique Montréal, Montreal, Canada;

²Human Health Therapeutics Research Centre, National Research Council of Canada, Montreal, Canada; ³Department of Biochemistry and Molecular Medicine, University of Montreal; Montreal, Canada

*To whom correspondence should be addressed: Gregory De Crescenzo: 2900 Édouard-Montpetit boulevard, Joseph Armand Bombardier pavilion, office 3067, H3T 1J4, Montreal, QC, Canada; gregory.decrescenzo@polymtl.ca; Tel. +1-514-340-4711 #7428.

6.2.1 Abstract

Most of therapeutic monoclonal antibodies belong to the immunoglobulin G1 (IgG1) family; they interact with the Fc γ receptors (Fc γ Rs) at the surface of immune cells to trigger effector functions. The IgG1-Fc N-glycans impact the interaction with Fc γ Rs and are considered a critical quality attribute. Pioneer studies on Fc γ R N-glycans have unveiled an additional complexity in that the N-glycan linked on the Asn-162 of Fc γ RIIIa was shown to be directly involved in the strong affinity for afucosylated IgG1. The last few years have thus seen the emergence of many studies investigating the complex influence of Fc γ RIIIa N-glycans on the interaction with IgG1 through their glycosylation sites or their glycoprofiles. In this context, we performed site-directed mutagenesis along with glycoengineering on Fc γ Rs (Fc γ RI, Fc γ RIIa/b and Fc γ RIIIa^{V158/F158}) in an effort to elucidate the impact of Fc γ Rs N-glycans on the interaction with IgG1. Furthermore, we assessed their binding to various trastuzumab glycoforms with an enhanced surface plasmon resonance assay. The Fc γ RIIIa N-glycans had the highest impact on the interaction with IgG1. More specifically, the N162 glycan positively influenced the affinity (15-fold) for afucosylated IgG1 while the N45 glycan presented a negative impact (2-fold) regardless of the IgG1 glycoforms. Interestingly, only the Fc γ RIIIa glycoprofile had an impact on the interaction with IgG1 with a 1.5-fold affinity increase when Fc γ RIIIa displays high-mannose glycans. These results provide

invaluable insights into the complex and strong influence of N-glycosylation upon Fc γ Rs/IgG1 binding and are instrumental to further understand the impact of Fc γ Rs N-glycosylation in their natural forms.

6.2.2 Keywords

N-linked glycosylation; Fc-gamma receptor; IgG; SPR; protein-protein interaction; site-directed mutagenesis

6.2.3 Introduction

Since the first monoclonal antibody (mAb) approval in 1986, this class of biotherapeutics has grown continuously and now dominates the biopharmaceutical market (Walsh, 2018). Recombinant mAbs belong mostly to the immunoglobulin G1 (IgG1) family. They recognize antigens via their Fab regions while their Fc region binds to proteins of the immune system, including the Fc γ receptors (Fc γ Rs) (Jefferis, 2010). Depending on the immune cell type and the Fc γ Rs present, the interactions between the immune complexes and the Fc γ Rs can trigger different effector functions (Lejeune et al., 2010). The IgG1-Fc region is composed of two identical heavy chains that both present a highly conserved N-glycosylation site at the asparagine residue 297 (Asn-297) (Jefferis, 2009b). N-glycosylation is considered a critical quality attribute (CQA) for therapeutic mAbs (Zhang, P. et al., 2016) as it ensures mAb proper folding and also impact mAb serum half-life (Liu, L., 2015). More importantly, IgG1-Fc N-glycans also influence the interactions between the IgG1 and Fc γ Rs. For example, deglycosylation of IgG1 leads to the abrogation of the interaction with Fc γ RIIIa (Subedi & Barb, 2015) and drastically decreases the IgG1 affinity for Fc γ RI (Dorion-Thibauddau et al., 2016; Oganessian et al., 2015). Besides, the N-glycan profile can significantly modulate Fc γ R interactions and consequently the triggering of effector functions, including the antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and the complement-dependent cytotoxicity (CDC) (Dekkers et al., 2017; Wada et al., 2019). Therapeutic agents with enhanced clinical efficacy have thus been developed via the selective enrichment of desired glycoforms of IgG1s while Fc γ Rs are commonly used to investigate mAbs safety and efficacy (Hayes, Cosgrave, et al., 2014). Furthermore, an increasing number of studies have also highlighted the complex and significant impact of the Fc γ R N-glycosylation on the Fc γ R / IgG1

interaction and its potential role in modulating the immune system activation or inhibition (Ferrara et al., 2011; Hayes et al., 2017; Hayes et al., 2016; Subedi & Barb, 2018).

FcγRs are glycoproteins classified into three families: FcγRI (or CD64), FcγRIIa-c (or CD32a-c) and FcγRIIIa/b (or CD16a/b) (Nimmerjahn et al., 2015). FcγRI has a high affinity for IgG1s (apparent K_D of $10^{-8} - 10^{-9}$ M) and interacts with monomeric IgG1 (Lu & Sun, 2015). On the other hand, the type II and type III receptors display lower affinities (apparent K_D s of $\approx 10^{-6} - 10^{-7}$ M) and must be in the presence of an immune complex to be engaged (Nimmerjahn & Ravetch, 2007). At last, FcγRs have between 2 to 7 N-glycosylation sites (i.e., 7 for FcγRI, 2 for FcγRIIa, 3 for FcγRIIb, 5 for FcγRIIIa and 6 for FcγRIIIb) (Hayes et al., 2016). Glycosylation variations occur in the final structure of the attached glycan as well as in the site-occupancy, those variations being referred to as microheterogeneity and macroheterogeneity, respectively (Butler, 2006).

Several studies have highlighted the influence of FcγR glycosylation on IgG1 binding by sequentially knocking out FcγR glycosylation sites (Ferrara, Stuart, et al., 2006; Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009). In particular, it has been demonstrated that the affinity for afucosylated IgG1s is decreased by over one order of magnitude for FcγRIIIa lacking the Asn-162 (N162) glycan. Initially, two independent studies suggested that the absence of core fucose on the IgG1-Fc diminished steric hindrance, hence promoting carbohydrate-carbohydrate interactions combined to carbohydrate-protein and protein-protein interactions (Ferrara et al., 2011; Mizushima et al., 2011). However, another mechanism, which does not imply intermolecular interactions with the IgG1-Fc has recently been proposed (Falconer et al., 2018). More precisely, it has been suggested that the core fucose on the IgG1-Fc N-glycan would restrict the conformations sampled by the FcγRIIIa-N162 glycan and would partially inhibit the binding with FcγRIIIa. In contrast, the glycan on the Asn-45 (N45) of FcγRIIIa led to a decrease of IgG1 binding affinity (Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009). Finally, a decrease in the binding levels and an increase in the dissociation rate of antibody have been observed when FcγR glycans are removed (Hayes, Frostell, et al., 2014).

The N-glycan patterns have also been investigated by global (Cosgrave et al., 2013; Hayes, Frostell, et al., 2014; Hayes et al., 2017; Takahashi et al., 2002) or site-specific (Kawasaki et al., 2014; Zeck et al., 2011) N-glycosylation profile analysis of the FcγRs expressed in different cell types. Of interest, these studies have shown that the FcγR N-glycosylation is cell-type specific and that these variations influence the IgG1 binding kinetics (Hayes et al., 2017; Zeck et al., 2011). In

addition, site-specific N-glycan structures have been observed (Kawasaki et al., 2014; Zeck et al., 2011). Although valuable, these results are related to recombinant FcγRs expressed in mammalian cell lines (i.e., CHO, HEK, NSO and BHK) (Hayes et al., 2016). These recombinant FcγRs display N-glycan structures that do not reflect the natural N-glycans and their potential impact (Patel, K. R. et al., 2018). Thus, to better understand how the immune system could use the FcγR N-glycosylation as a mechanism to fine-tune the antibody response, the investigation of the natural N-glycosylation forms of the FcγRs present on each immune cell, both in disease and healthy states, is necessary (Hayes, Cosgrave, et al., 2014). However, FcγRs N-glycosylation characterization in native human tissues represents a real challenge given the difficulty in obtaining enough material for analysis (Patel, K. R. et al., 2018). Nonetheless, a study has recently performed a site-specific N-glycosylation analysis of the soluble FcγRIIIb in human serum (Yagi et al., 2018) while another achieved the N-glycan analysis of the FcγRIIIa from primary human NK cells (Patel, K. R. et al., 2018). Of salient interest, Patel, K. R. et al. (2018) have demonstrated that the FcγRIIIa N-glycans at the surface of NK cells display higher level of high-mannose and hybrid structures (Patel, K. R. et al., 2018), starkly contrasting with previous studies on the recombinant FcγRIIIa N-glycosylation, which identified predominantly complex structures (Cosgrave et al., 2013; Hayes, Frostell, et al., 2014; Hayes et al., 2017; Zeck et al., 2011). Further analysis mixing N-glycosylation site substitution and N-glycan composition modification have then indicated that the FcγRIIIa with an oligomannose structure have 10 to 50-fold higher affinity for various IgG1 glycoforms (Subedi & Barb, 2018). These results thus validate the conclusion proposed by Edberg *et al.* that FcγR-mediated antibody response could be tuned by cell-specific glycome (Edberg & Kimberly, 1997).

With the aim of understanding the FcγR N-glycosylation influence and improving immunotherapy, we herein performed site-directed mutagenesis, along with glycoengineering, on five FcγRs (FcγRI, FcγRIIa/b and FcγRIIIa_{V158/F158}). We then assessed in detail the impact of the FcγR N-glycosylation on binding to three distinct IgG1 glycoform lots (reference, afucosylated and galactosylated). The IgG1 / FcγR interaction affinities were measured by surface plasmon resonance (SPR) biosensing, a biophysical technique commonly used to study the IgG1 / FcγR interactions and the impact of N-glycosylation on binding (Bruhns et al., 2009; Cambay et al., 2019; Ferrara, Stuart, et al., 2006; Hayes, Frostell, et al., 2014; Hayes et al., 2017; Patel, K. R. et al., 2018; Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009; Subedi & Barb, 2018; Zeck et al., 2011). To our knowledge, only few studies have combined glycoengineering on both IgG1 and FcγRs to

investigate the impact of glycosylation upon interaction (Ferrara et al., 2011; Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009; Subedi & Barb, 2018), leading to ambiguous conclusions, which may be attributed to either the inherent complexity of the interaction or biases from the SPR assay. In our case, the binding affinities of each FcγR mutant for each IgG1 glycoform were measured with confidence using our validated SPR assay relying on coiled-coiled interactions to capture the various FcγR ectodomains at the biosensor surfaces (Cambay et al., 2019). Overall, this work helps elucidate the complex influence of FcγR and IgG1 N-glycans, along with the global and site-specific N-glycan composition, upon antibody-receptor interactions.

6.2.4 Results

6.2.4.1 Characterization of the FcγRs mutants

To unravel the influence of each FcγR N-glycosylation site, serial site-directed mutagenesis has been performed. More precisely, from the wild-type FcγRs displaying all the N-glycosylation sites, one or more asparagines (N) were substituted for glutamines (Q). The sets of mutants of each receptor are presented in Figure annexe C - 1. Each mutant was produced at small scale then purified by affinity chromatography followed by a size exclusion chromatography (SEC). The amounts of the expressed mutants and their aggregation levels were determined from preparative SEC chromatograms (Figure annexe C - 2 and Table annexe C - 1). For the FcγRIIIa single mutants, only the absence of N-glycan at position N45 decreased the receptor expression and increased the level of aggregates, in agreement with previous studies (Ferrara et al., 2011; Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009), more likely due to a stabilizing effect of the N45 glycan through intramolecular carbohydrate-protein interactions (Subedi, Falconer, & Barb, 2017). Besides, the simultaneous removal of several N-glycosylation sites led to a drastic reduction or even a complete loss of expression of the FcγRIIIa receptors (Figure annexe C - 2a,b). Concerning FcγRIIa, the expression and aggregation levels were not affected by the removal of one N-glycan site (Figure annexe C - 2c) while in the case of FcγRIIb, the removal of the N-glycans at position N106 or N187 slightly decreased expression (Figure annexe C - 2d). Finally, in the case of FcγRI, the removal of the N59 or N159 glycans decreased the expression and increased the aggregate percentage, unlike the removal of the N163 glycan, which led to an increase of the expression and a decrease of the aggregate percentage (Figure annexe C - 2e). Moreover, for the mutants

containing only one or no N-glycosylation site, only the N59 FcγRI mutant could be expressed. SDS-PAGE analysis under non-reducing conditions followed by Coomassie blue staining confirmed that purified FcγR mutants were mostly monomeric (Figure 6-1). Besides, the FcγRIIIa mutants possessing only one N-glycan site displayed bands of various widths, indicating that the N-glycan profile differed from one N-glycosylation site to another (Figure 6-1a,b), as observed in other studies (Kawasaki et al., 2014; Zeck et al., 2011). Furthermore, the N-glycosylation sites of FcγRIIIa and FcγRIIb were probably not fully occupied in their wild-type forms (Figure 6-1c,d).

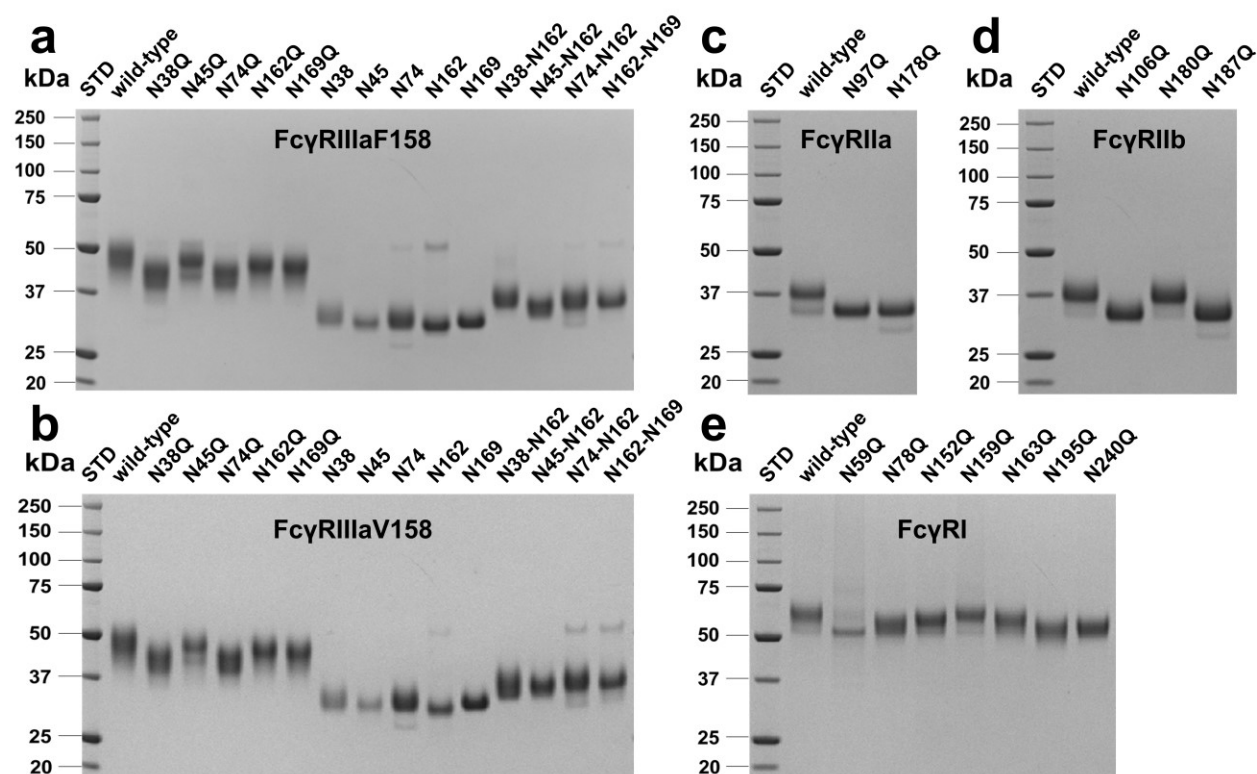


Figure 6-1: Coil-tagged FcγR mutant production and purification. SDS-PAGE analysis (non-reducing conditions) followed by Coomassie Blue staining of coil-tagged FcγRIIIa_{F158} (a), coil-tagged FcγRIIIa_{V158} (b), coil-tagged FcγRIIIa (c), coil-tagged FcγRIIb (d) and coil-tagged FcγRI (e) mutants after purification.

6.2.4.2 Influence of FcγRs N-glycans on IgG1 binding

The impact of the FcγRs N-glycosylation sites on their binding to three major trastuzumab glycoforms (i.e., TzM, TzM-gal and TzM-afuc) was evaluated by SPR biosensing using an assay we previously optimized (Cambay et al., 2019). The profile of the TzM glycoforms had been characterized in a previous study: the glycoprofiles, while heterogeneous, displayed a predominant form for each glycoform (i.e., TzM – mainly G0F, TzM-gal – mainly G2F, TzM-afuc – mainly G0) (Chapitre 5). In this study, the SPR assay consisted in injecting the different TzM glycoforms over the distinct FcγRs being captured in an oriented fashion at the biosensor surface. More precisely, all FcγR mutants were tagged with the E5 peptide, which allowed their stable and oriented capture through the E5 interaction with its specific partner, the K5 peptide (the latter being covalently bound to the biosensor surface via its engineered unique cysteine) (Cambay et al., 2019). Several representative control-corrected SPR sensorgrams depicting the interactions of fucosylated or afucosylated TzM (TzM or TzM-afuc) with various (monoglycosylated) FcγRIIIa_{V158} mutants are displayed in Figure 6-2. To assess the difference of binding between each pair of FcγR mutant and TzM glycoform, apparent K_D values were calculated by steady-state analysis (assuming a one-to-one binding model) for the low-affinity FcγRs, whereas for FcγRI, K_D values were determined as the ratio of the kinetic constants derived by globally fitting the data, as explained elsewhere (Chapitre 5). The apparent K_D values for each receptor / TzM glycoform interaction are presented in Figure 6-3 (FcγRIIIa_{F158/V158}) and Figure 6-4 (FcγRIIa/b and FcγRI) and gathered in Table annexe C - 2 (FcγRIIIa_{F158/V158}), Table annexe C - 3 (FcγRIIa/b) and Table annexe C - 4 (FcγRI). Moreover, a comparison of the averaged effects of site mutations of FcγR N-glycosylation on TzM glycoform binding affinity (relative to the wild-type forms) is also presented in Figure annexe C - 3. Altogether, the results revealed that only the N-glycans of FcγRIIIa_{F158/V158} had a significant impact on the binding affinity to the different TzM glycoforms (Figure 6-3 and Figure annexe C - 3a,b). More precisely, the absence of the N162 glycan caused the most significant effect, especially for the interaction with the afucosylated TzM (up to 15-fold decrease in affinity for FcγRIIIa_{F158-N45} / TzM-afuc). The presence of the N45 glycan led to a similar decrease of affinity compared to the wild-type receptor, regardless of the TzM glycoform (Figure 6-3 and Figure annexe C - 3a,b).

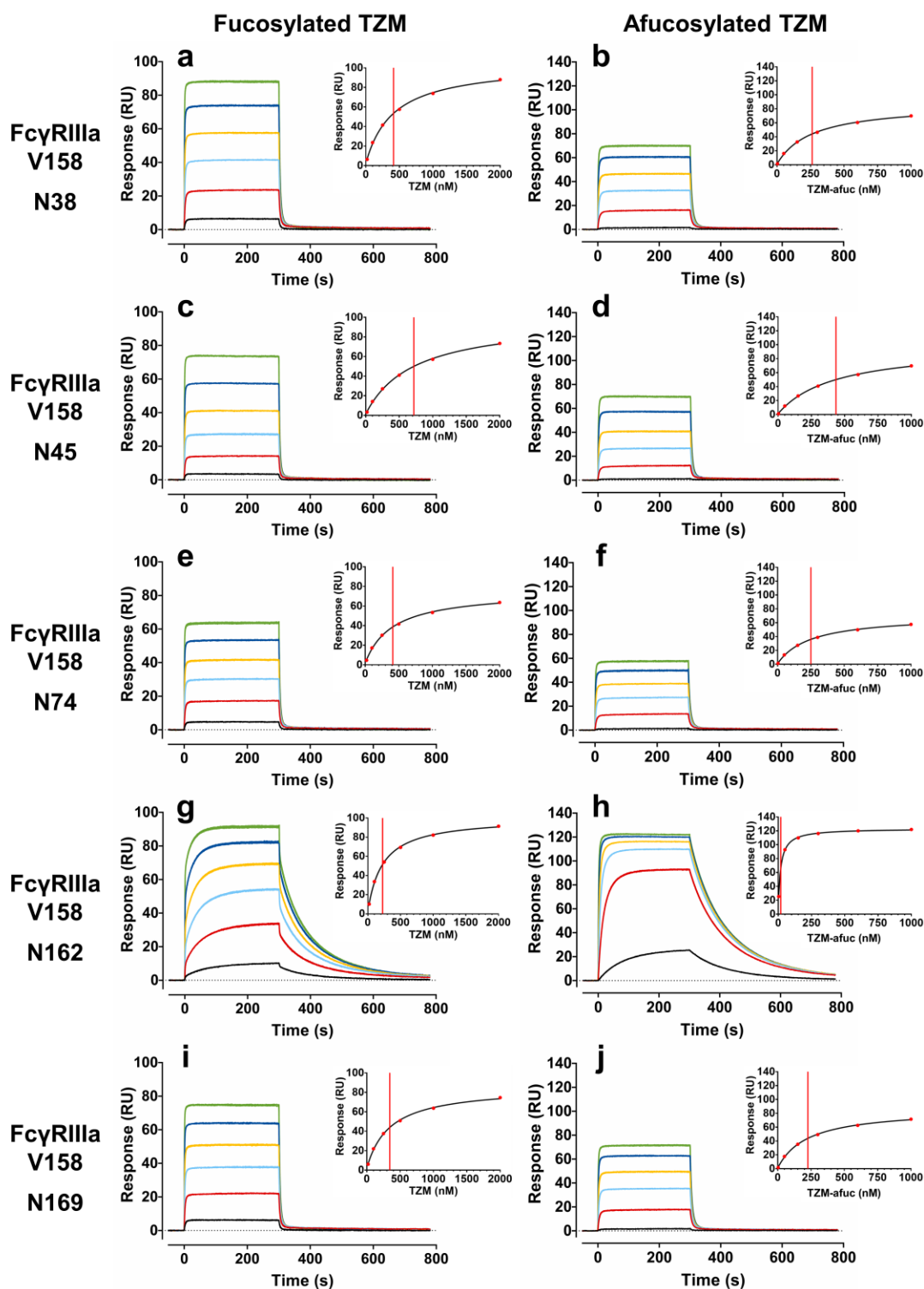


Figure 6-2: Representative control-corrected SPR sensorgrams corresponding to the interactions of various trastuzumab glycoforms with captured FcγRIIIa_{V158} mutants. Control-corrected sensorgrams corresponding to the interactions of fucosylated TZM (left column) or afucosylated TZM (right column) with coil-tagged FcγR mutants harboring glycans only at

position N38 (**a,b**), N45 (**c,d**), N74 (**e,f**), N162 (**g,h**) or N169 (**i,j**). Coil-tagged FcγRIIIa mutants were captured on a K5 surface (≈ 20 RUs). Each data set corresponds to the triplicate injection of a TzM glycoform at 6 concentrations (between 20-2,000 nM for fucosylated TzM; 3-1,000 nM for afucosylated TzM). The steady state analysis of the sensorgrams is shown in the insets with the vertical line marking the respective calculated K_D values.

The highest affinities were therefore observed for FcγRIIIa mutants possessing a N162 glycan while missing the N45 glycan (i.e., N45Q, N162, N38-N162, N74-N162 and N162-N169), also indicating that the other N-glycans (i.e., N38, N74 and N169) had no significant effect on the affinity for the TzM glycoforms (Figure 6-3 and Figure annexe C - 3a,b). Surprisingly, our results also showed that the removal of N162 glycan slightly decreased the affinity for the fucosylated forms of TzM (i.e., TzM and TzM-gal) (Figure 6-3 and Figure annexe C - 3a,b). Moreover, only the interaction between FcγRIIIa-N162 and TzM presented a biphasic dissociation profile being more pronounced than for the other interactions (Figure 6-2g). Data were then further compared by calculating similarity scores, as proposed by Karlsson et al. (2016), which proved to be useful in our hands for the analysis of receptor/IgG1 interactions (Cambay et al., 2019). Representative overlays of control-corrected sensorgrams corresponding to TzM glycoform / FcγRIIIa mutant interactions (dissociation phases only) are shown in Figure annexe C - 4 while similarity scores calculated for the dissociation phases only are displayed in Table annexe C - 5. Besides, to ease the identification of differences between standard curves (i.e., interactions between TzM glycoforms and wild-type FcγRIIIa) and other experimental conditions, deviation plots were included with a comparison window of 10 SD (Figure annexe C - 4 – insets). Deviation plots and similarity scores (Table annexe C - 5) confirmed the results from affinity calculations and showed the distinct impact of the N162 and N45 glycans. More precisely, for normalized sensorgrams, the removal of the N162 glycan drastically changes the kinetic profiles (resulting in a faster dissociation) irrespective of the TzM glycoforms. Finally, the removal of the N45 glycan had a notable impact, i.e., a slower dissociation is observed for FcγRIIIa-N45Q.

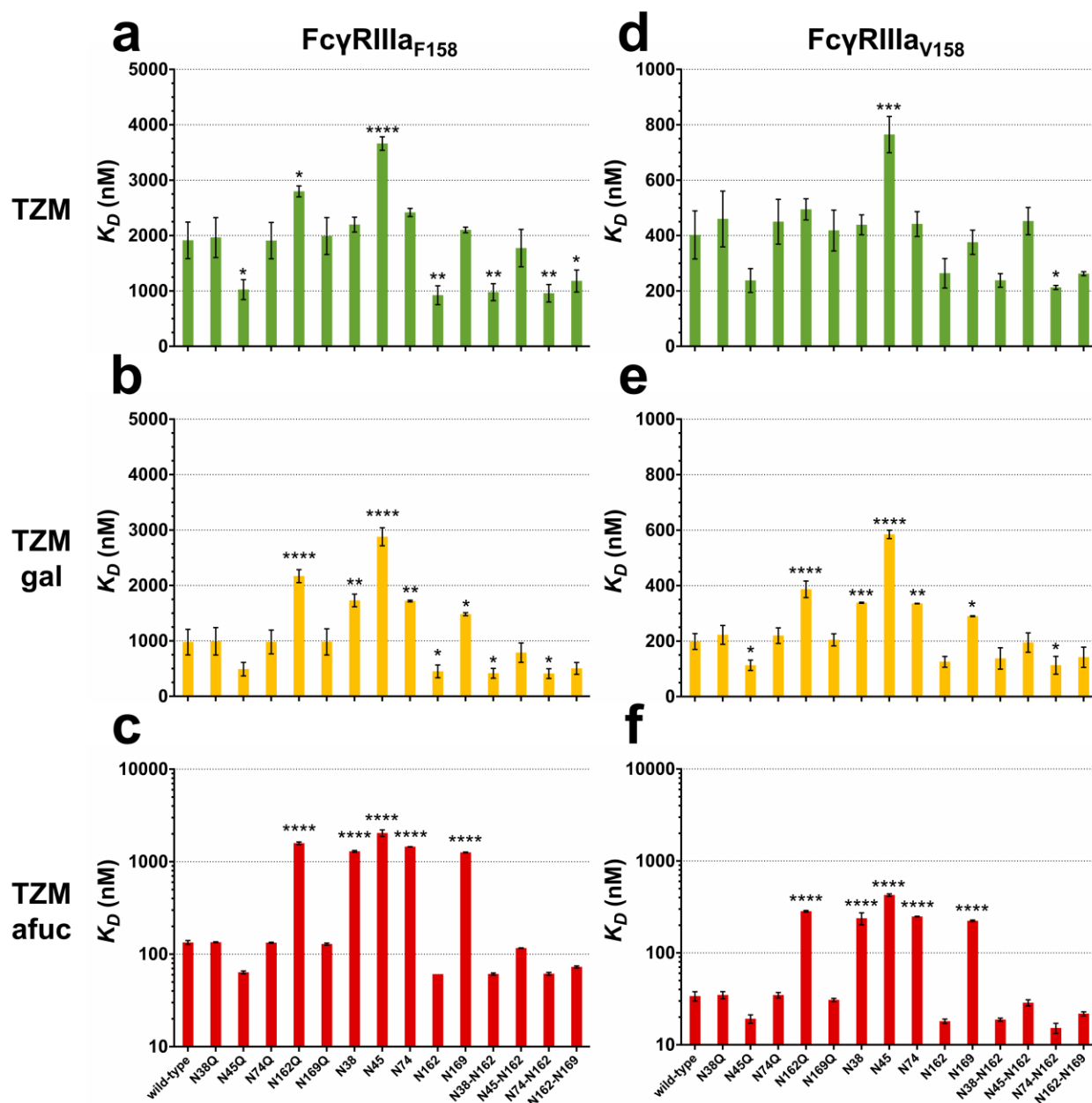


Figure 6-3: Influence of the FcγRIIIa N-glycosylation site occupancy upon binding to various trastuzumab glycoforms. The impact of the N-glycosylation site occupancy of FcγRIIIa_{F158} (left column) and FcγRIIIa_{V158} (right column) on agalactosylated TZM (a,d, TZM), galactosylated TZM (b,e, TZM-gal) and afucosylated TZM (c,f, TZM-afuc) binding affinity. K_D values are representative of at least 2 independent experiments for each condition and the standard deviations (SD) are shown. *, **, *** and **** denote a statistical significance of $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$, and $p \leq 0.0001$, respectively, as tested by one-way ANOVA using a Dunnett's multiple comparison test against wild-type FcγRIIIa.

For FcγRIIa, N-glycan removal did not induce any relevant effects on the kinetics of interactions with TzM glycoforms in terms of affinity (Figure 6-4a and Figure annexe C - 3), kinetic profiles (Figure annexe C - 5) and similarity scores (Table annexe C - 5). On the other hand, in the case of FcγRIIb, removal of N187 glycan decreased the affinity (about 1.5-fold), regardless of the TzM glycoforms (Figure 6-4b and Figure annexe C - 3), while no differences were observed in terms of kinetic profiles for the dissociation phase (Figure annexe C - 5) and similarity scores (Table annexe C - 5).

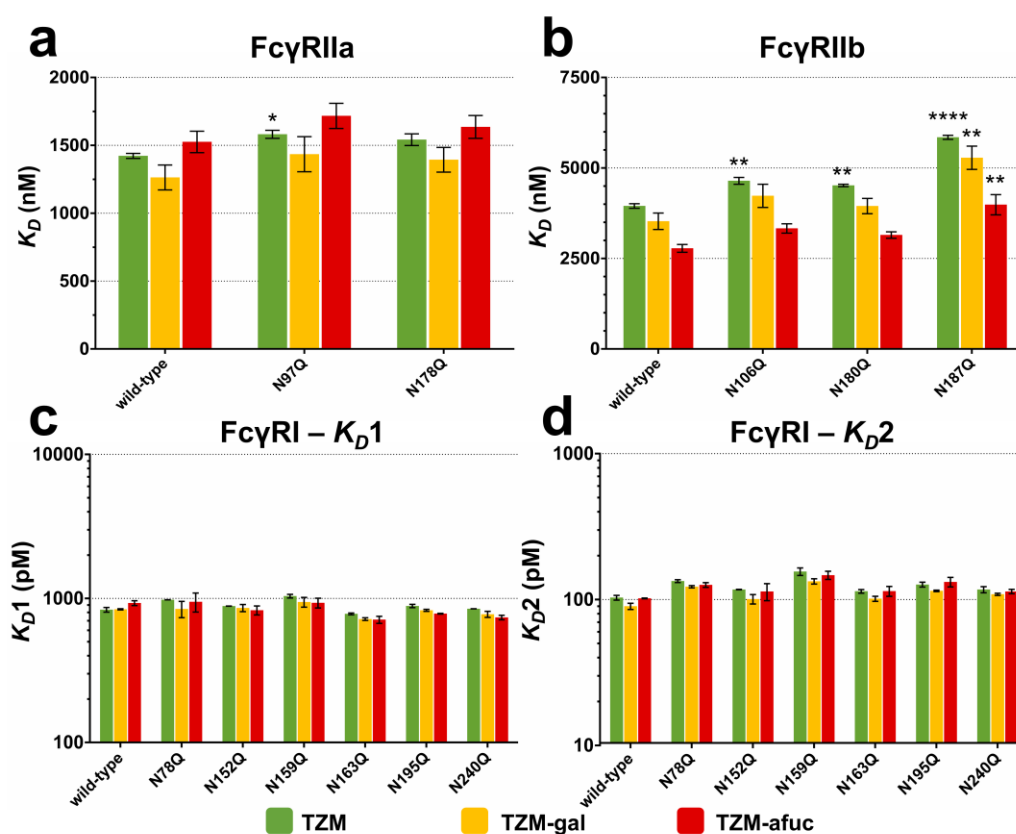


Figure 6-4: Influence of the FcγRI and FcγRIIa/b N-glycosylation site occupancy upon binding to various trastuzumab glycoforms. The impact of the N-glycosylation site occupancy of FcγRIIa (a), FcγRIIb (b) and FcγRI (c,d) on agalactosylated TzM (TzM, green), galactosylated TzM (TzM-gal, yellow) or afucosylated TzM (TzM-afuc, red) binding affinity. K_D values are representative of at least 2 independent experiments for each condition and the standard deviations (SD) are shown. *, **, *** and **** denote a statistical significance of $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$, and $p \leq 0.0001$, respectively, as tested by one-way ANOVA using a Dunnett's multiple comparison test against wild-type FcγRs.

At last, no effect in terms of affinity (Figure 6-4c,d and Figure annexe C - 3), kinetic profiles (Figure annexe C - 5) as well as similarity scores (Table annexe C - 5) was observed for the individual removal of six FcγRI N-glycans (i.e., N78Q, N152Q, N159Q, N163Q, N195Q or N240Q). The only impact was observed when the N-glycan at position N59 was removed, with a major impact on the dissociation kinetics (Figure annexe C - 5). Given the complexity of the kinetic profiles, the differences were assessed by taking advantage of the sensorgram comparison method (Figure annexe C - 5) and similarity scores (Table annexe C - 5). Besides, we managed to express a small quantity of monomeric FcγRI-N59 and the binding analysis with TzM glycoforms showed similar kinetic profiles compared to the wild-type FcγRI. These results strongly suggest that FcγRI N-glycans are not involved in the interaction with IgG as already deduced by others (Kiyoshi et al., 2015; Lu et al., 2015; Oganessian et al., 2015).

6.2.4.3 Characterization of wild-type and mutated FcγRs glycoforms

The influence of the FcγR glycoprofile upon IgG1 binding was then assessed. For that, wild-type FcγRs as well as FcγRIIIa_{V158} mutants (i.e., N38, N45, N74, N162, N169 and N45-162) were produced and their N-glycan profiles were modulated by *in vivo* or *in vitro* modifications to obtain either a high-mannose, hybrid, afucosylated, agalactosylated, desialylated or α2,6-sialylated glycoprofile. Their characterization is presented in Figure 6-5 (wild-type FcγRs) and Figure 6-6 (FcγRIIIa_{V158} mutants). More precisely, SDS-PAGE under non-reducing condition (followed by Coomassie staining) was used to assess molecular weight changes as well as aggregation levels (Figure 6-5 and Figure 6-6 – upper panels), while FcγRs glycoprofiles were characterized by lectin blots with a set of seven lectins (Figure 6-5 and Figure 6-6 – lower panels).

For wild-type FcγRs, the receptors were mainly monomeric. For unmodified FcγRs, the glycoprofiles were essentially composed of fucosylated N-glycans with a certain proportion of terminal N-acetylglucosamine (sWGA), terminal galactosylation (ECL) and terminal α2,3-sialylation (MALII), as observed by Hayes et al. (2017). As for the modified FcγRs, the lectin blot confirmed that most glycoprofile modifications were effective. This is the case notably for FcγRs with high-mannose structures obtained via kifunensin (more likely Man9 and Man8) (Kommineni et al., 2019; Nagae & Yamaguchi, 2012). Indeed, no fucose (AAL) was detected while the LCA signals (mannose/fucose) were present and the ConA signals (mannose) were higher.

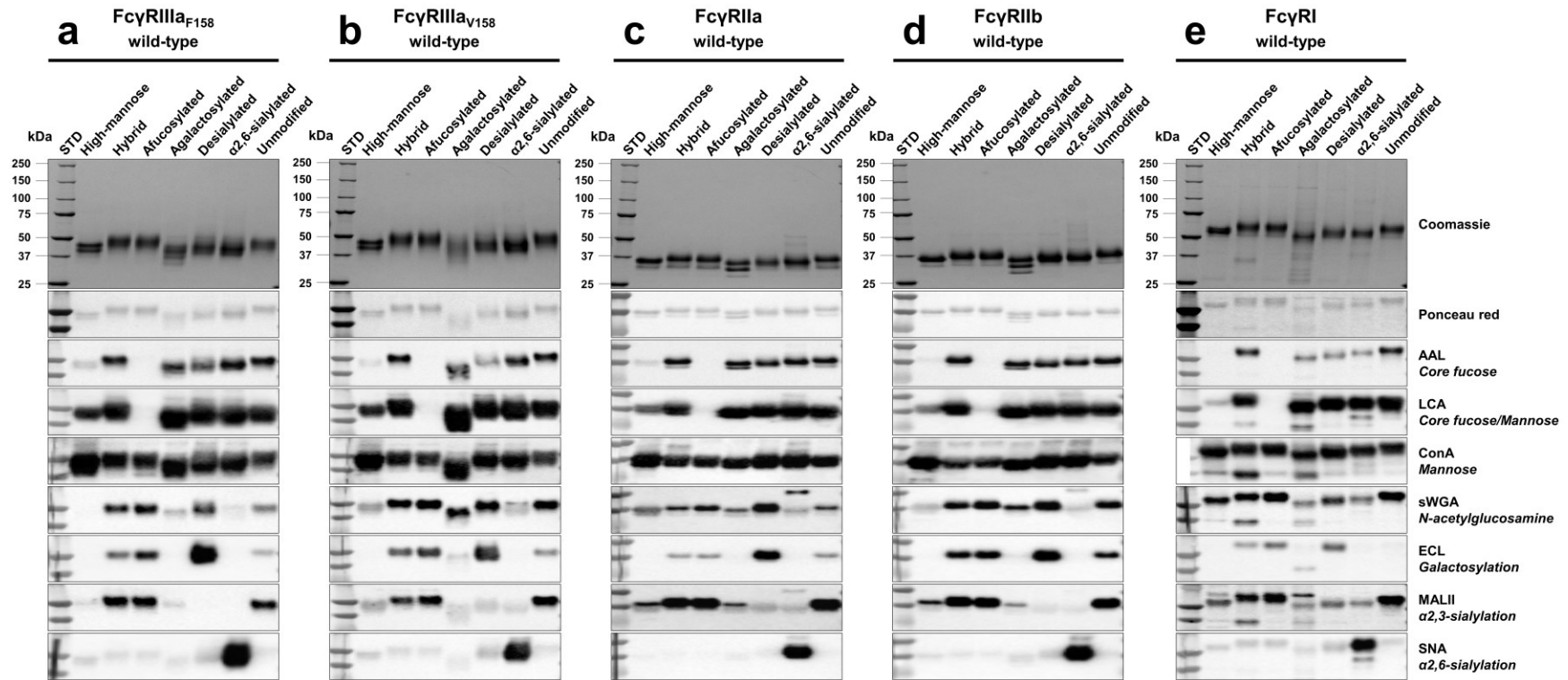


Figure 6-5: SDS-PAGE and lectin-blot analysis of wild-type FcγR N-glycans. Coil-tagged FcγRIIIa_{F158} (a), FcγRIIIa_{V158} (b), FcγRIIa (c), FcγRIIb (d), FcγRI (e) were produced in CHO cells then purified by an IMAC followed by a size-exclusion chromatography to reduce aggregates. N-glycans of coil-tagged FcγRs were modified either by process or *in vitro* glycoengineering strategies. Non-reducing SDS-PAGE was used to assess molecular weight changes and aggregation levels of the FcγRs. Ponceau red staining was used to control the protein load. For lectin blots, AAL, LCA, ConA, sWGA, ECL, MALII and SNA were used to detect core fucose, core fucose/mannose, mannose, N-acetylglucosamine, terminal galactose, terminal α2,3 sialic acid and terminal α2,6 sialic acid, respectively.

It should be noted that the presence of weak MALII signals (α 2,3-sialylation) for Fc γ RIIa/b and Fc γ RI (Figure 6-5c-e) indicated that a small proportion of N-glycans displayed another structure (i.e., hybrid or complex). Wild-type Fc γ Rs afucosylation with 2F-peracetyl-fucose was also effective since no fucosylation bands were detected for any receptors with both AAL and LCA. Besides, the signals corresponding to the other sugars (sWGA, ConA, ECL, MALII) were similar to those of the unmodified forms, indicating that the major difference was indeed the absence of fucose. Then, the absence of MALII and SNA signals (α 2,3- and α 2,6-sialylation, respectively) as well as the increase of the ECL signal (galactosylation) validated the efficiency of the *in vitro* desialylation step with sialidase A. Note that the Fc γ RI still displayed a slight MALII band, most likely due to the difficulty for the enzyme to access some N-glycan sites (Figure 6-5e). Concerning the α 2,6-sialylation, the almost disappearance of the MALII bands (α 2,3-sialylation) as well as the presence of intense SNA bands (α 2,6-sialylation) confirmed the sialylation process with ST6Gal1, already presented elsewhere (Chapitre 5) (Cambay et al., 2019). As for the desialylated forms, the Fc γ RI displayed a weak MALII band (Figure 6-5e), suggesting the presence of a low proportion of α 2,3-sialylation, which was expected since desialylated Fc γ Rs were used as substrates. For the degalactosylation (using 2-Deoxy-2-fluoro-D-galactose), the absence of bands for MALII (α 2,3-sialylation), SNA (α 2,6-sialylation) and ECL (galactosylation) indicated that terminal galactosylation and consequently terminal sialylation were mostly absent. However, the decrease in the sWGA signal (N-acetylglucosamine) and the presence of ConA and LCA signals (Mannose) as well as AAL signal (fucose) highly suggested that the profile was probably more of fucosylated Man3. Such increase of high-mannose and hybrid-type N-glycans combined to a decrease of fucose has also been observed by Dekkers et al. (2016). Finally, in the case of the hybrid glycoprofile, given the strong similarity of the signals with the unmodified forms, lectin blots can not provide a confirmation of the *in vivo* modification with Mannostatin A, a Golgi α -mannosidase II inhibitor (Kuntz et al., 2009). The Mannostatin A concentration we used could have been too low even if the ConA signals seemed higher for the Fc γ RIIIa two variants (Figure 6-5a,b). Indeed, Ehret *et al.* showed that a 3-fold higher concentration (27 μ M vs 8 μ M) had no effect on IgG1 glycosylation (Ehret et al., 2019). However, since there is no evidence that the process was not effective, data are presented in this study.

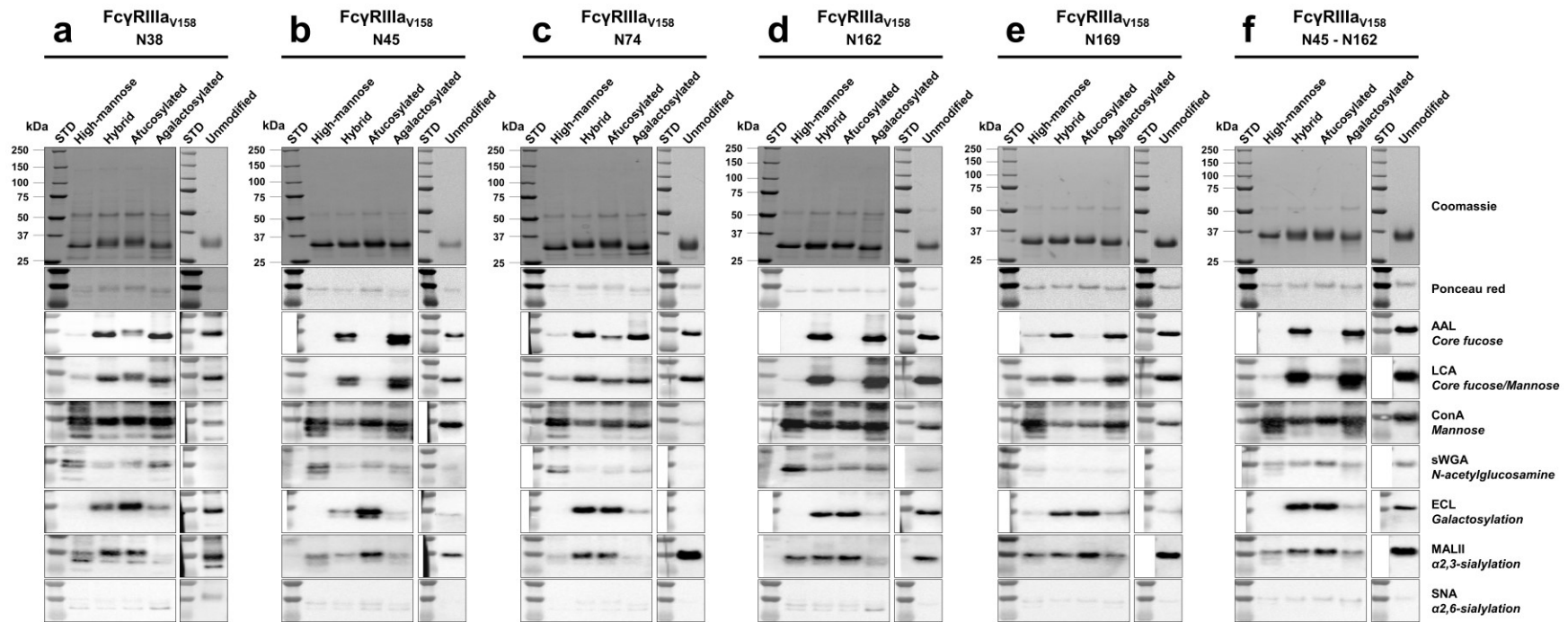


Figure 6-6: SDS-PAGE and lectin-blots analysis of mutated FcγRIIIa_{V158} N-glycans. coil-tagged FcγRIIIa_{V158} with a N-glycan on N38 (a), N45 (b), N74 (c), N162 (d), N169 (e) or N45 and N162 (f) only were produced in CHO cells then purified by an IMAC followed by a size-exclusion chromatography to reduce aggregates. N-glycans of these coil-tagged FcγR mutants were modified either by process or *in vitro* glycoengineering strategies. Non-reducing SDS-PAGE was used to assess the FcγRs molecular weight changes and aggregation levels. Ponceau red staining was used to control the protein load. For lectin blots, AAL, LCA, ConA, sWGA, ECL, MALII and SNA were used to detect core fucose, core fucose/mannose, mannose, N-acetylglucosamine, terminal galactose, terminal α2,3 sialic acid and terminal α2,6 sialic acid, respectively.

In the case of the glycoprofiles of the FcγRIIIa_{V158} mutants (Figure 6-6), receptors were found mostly monomeric, although a higher proportion of aggregates was noticed for each mutated FcγRIIIa_{V158} compared to wild type. Indeed, mutant expression rates were lower while aggregate rates were higher (Figure annexe C - 2) and consequently aggregates were more difficult to remove fully. Note that in the case of the glycoforms of the FcγRIIIa_{V158} mutants, desialylation and α2,6-sialylation were not performed. The Coomassie blue staining also showed that the band of FcγRIIIa_{V158}-N74 was wider than for other FcγRIIIa_{V158} mutants, as already observed by Zeck *et al.* who showed that this position was mostly occupied by complex tetraantennary N-glycans when the receptors were produced in CHO cells (Zeck et al., 2011). At the glycoprofile level, lectin blots indicated that, at positions N38, N162 and N169, N-glycans were in their fucosylated forms with terminal galactosylation as well as terminal α2,3-sialylation (Figure 6-6a,d,e). At position N74, the strong MALII signal (α2,3-sialylation) and the absence of the ECL signal (galactosylation) suggested that the N-glycan was totally sialylated (Figure 6-6c), as observed by Zeck et al. (2011). Finally, the lectin blots for the FcγRIIIa_{V158}-N45 mutant were characterized by the absence of an ECL signal, a weak MALII signal as well as the presence of the ConA and AAL signals, altogether suggesting the existence of a mix of complex, hybrid and high-mannose N-glycans. Such differences at position N45 have already been observed on the FcγRIIIb isolated from human serum (Yagi et al., 2018) and produced in BHK cells (Kawasaki et al., 2014) as well as by Zeck *et al.* who found ~70 % hybrid type glycans on FcγRIIIa produced in CHO cells (Zeck et al., 2011). Concerning the modification performed on FcγRIIIa_{V158} mutants, the same conclusions presented above can be deduced from the lectin blots. Indeed, the processes performed to obtain high-mannose, afucosylated and agalactosylated forms were quite efficient. For each modification, while the desired glycoprofile was the main one, it should be noted that heterogeneity was still present. At last, as explained above, the obtention of the hybrid-type N-glycan was uncertain.

6.2.4.4 Influence of FcγRs N-glycan profiles on IgG1 binding

Our enhanced SPR assay was then applied to assess the impact of the various FcγR N-glycan profiles (i.e., wild-type FcγRs and FcγRIIIa_{V158} mutants: N38, N45, N74, N162, N169 and N45-N162) upon binding to the trastuzumab glycoforms. The differences of binding between each FcγR glycoform and TZM glycoform were assessed with the same procedures as those previously described. In brief, the sensorgram comparison of each receptor / TZM glycoform interaction are

presented in Figure 6-7 (wild-type FcγRs) and Figure 6-8 (FcγRIIIa_{V158} mutants) while the K_D values and the comparison of the averaged effects of the FcγR N-glycan profiles on TzM glycoform binding affinity relative to the wild-type forms are presented in Figure annexe C - 6 (wild-type FcγRs) and Figure annexe C - 7 (FcγRIIIa_{V158} mutants). K_D values are gathered in Table annexe C - 6 (wild-type FcγRs) and Table annexe C - 7 (FcγRIIIa_{V158} mutants) while similarity scores are displayed in Table annexe C - 8.

In the case of the wild-type FcγRIIIa, similar results have been obtained for both variants (F158 and V158) (Figure 6-7a-d). More precisely, the most important effect was observed for FcγRIIIa with high-mannose type glycans (Man9 and Man8), which were characterized by the slowest apparent dissociation rate, regardless of the IgG glycoform. A slower dissociation, albeit to a lesser extent, was also observed for the FcγRIIIa that had been enriched in the desialylated or α2,6-sialylated forms. In contrast, the agalactosylated forms (most likely fucosylated Man3) displayed the fastest dissociation while no effect was observed for FcγRIIIa with afucosylated or hybrid forms. As mentioned above, the absence of effect for FcγRIIIa with hybrid forms was most likely due to an unsuccessful modification. The kinetic profile differences were confirmed by similarity scores (Table annexe C - 8) and were supported by the K_D values with the high-mannose FcγRIIIa displaying the highest affinity (Figure annexe C - 6).

In the case of the wild-type FcγRIIa/b and wild-type FcγRI, the glycan profile modification did not lead to any effect on the interaction with TzM glycoforms as illustrated by deviation plots (Figure 6-7), similarity scores (Table annexe C - 8) or K_D values (Figure annexe C - 6 and Table annexe C - 6) comparison.

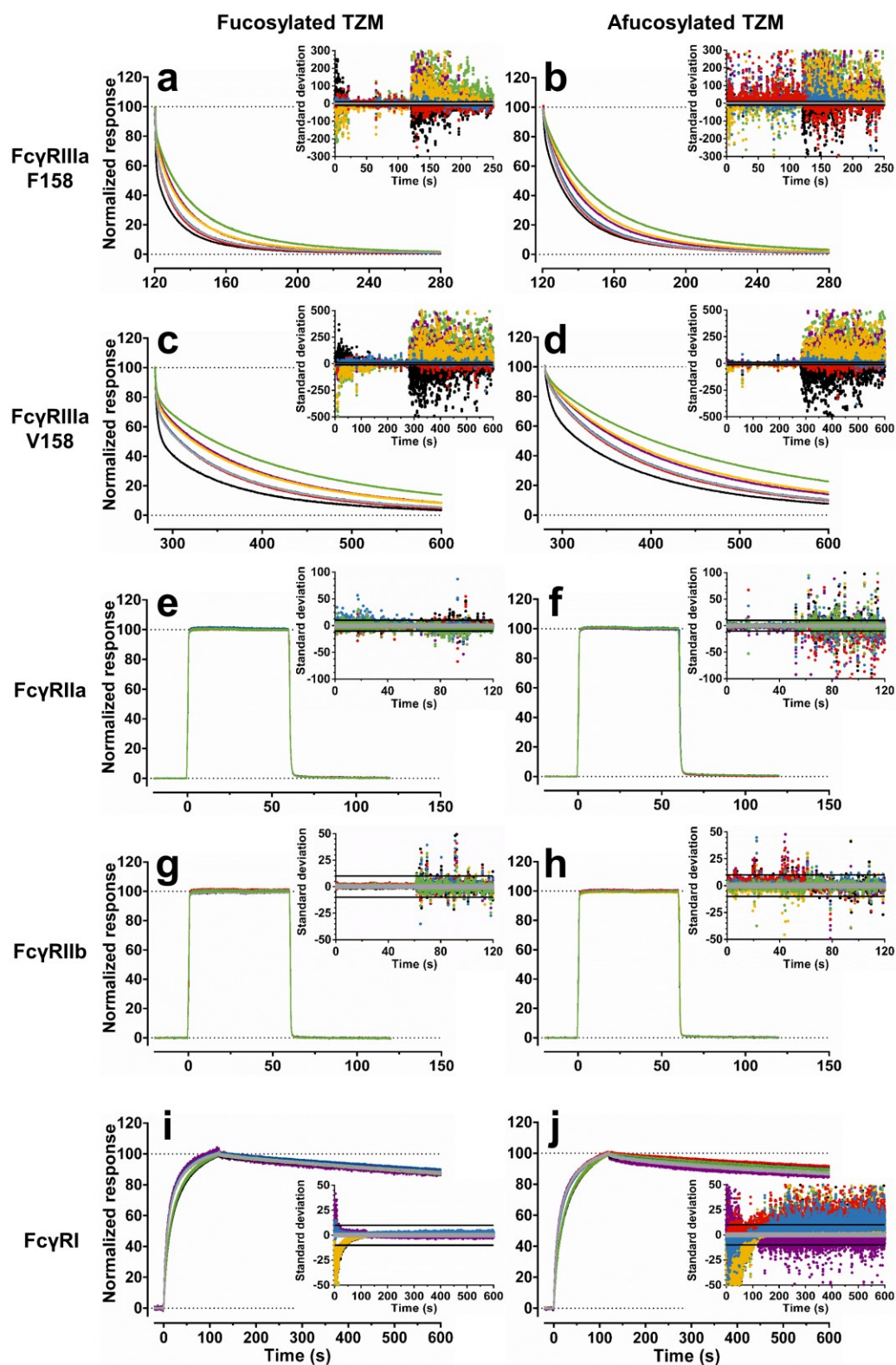


Figure 6-7: Influence of the N-glycan profile of wild-type Fc γ R upon binding to trastuzumab glycoforms. Overlay of normalized control-corrected sensorgrams corresponding to the

interactions between coil-tagged wild-type FcγRs glycoforms (FcγRIIIa_{F158} (**a,b**), FcγRIIIa_{V158} (**c,d**), FcγRIIa (**e,f**), FcγRIIb (**g,h**) and FcγRI (**i,j**)) and injected fucosylated TZM (left column) (FcγRIIIa_{F158}: 4000 nM; FcγRIIIa_{V158}: 2000 nM; FcγRIIa/b: 5000 nM and FcγRI: 100 nM) or afucosylated TZM (right column) (FcγRIIIa_{F158}: 2000 nM; FcγRIIIa_{V158}: 1000 nM; FcγRIIa/b: 5000 nM and FcγRI: 100 nM) in triplicate. Only dissociation phases are displayed for FcγRIIIa_{F158/V158} (**a-d**). Grey: unmodified. Green: high-mannose. Blue: hybrid. Red: afucosylated. Black: agalactosylated. Yellow: desialylated. Purple: α2,6-sialylated. Deviation plots on a SD versus time scale are shown in the inset. The standard data (unmodified wild-type FcγRs – grey) fall between the sensorgram comparison window (in this case ± 10 SD). The dotted lines indicate that normalized response data are shown.

The influence of the FcγRIIIa_{V158} N-glycan profile was further analysed with the glycoforms of FcγRIIIa_{V158} mutants displaying only one N-glycan in an effort to determine which N-glycan led to the kinetic variations observed in Figure 6-7a-d. The glycoprofile variation of N38, N74 and N169 glycans did not affect the kinetic profiles with TZM glycoforms (Figure 6-8). The N45 glycan modifications seemed to slightly affect the binding for TZM glycoforms since differences in the dissociation phases were observed with a faster dissociation for the unmodified forms compared to other forms (Figure 6-8c,d). Interestingly, the most important effect was recorded for the FcγRIIIa_{V158} mutants displaying the N162 glycan (i.e., N162 and N45-N162 mutants). More precisely, the variations observed with FcγRIIIa_{V158}-N162 glycoforms (Figure 6-8g,h) were similar to those observed with the wild-type FcγRIIIa_{V158} (Figure 6-7c,d), suggesting that the positive influence of the high-mannose and desialylated forms were only due to the N162 glycan profile. The effect of the N162 glycan modification on the interaction with TZM was obvious when comparing the dissociation kinetics (Figure 6-8g,h), although apparent thermodynamic values (K_D) were determined to be similar (Figure annexe C - 7 and Table annexe C - 7).

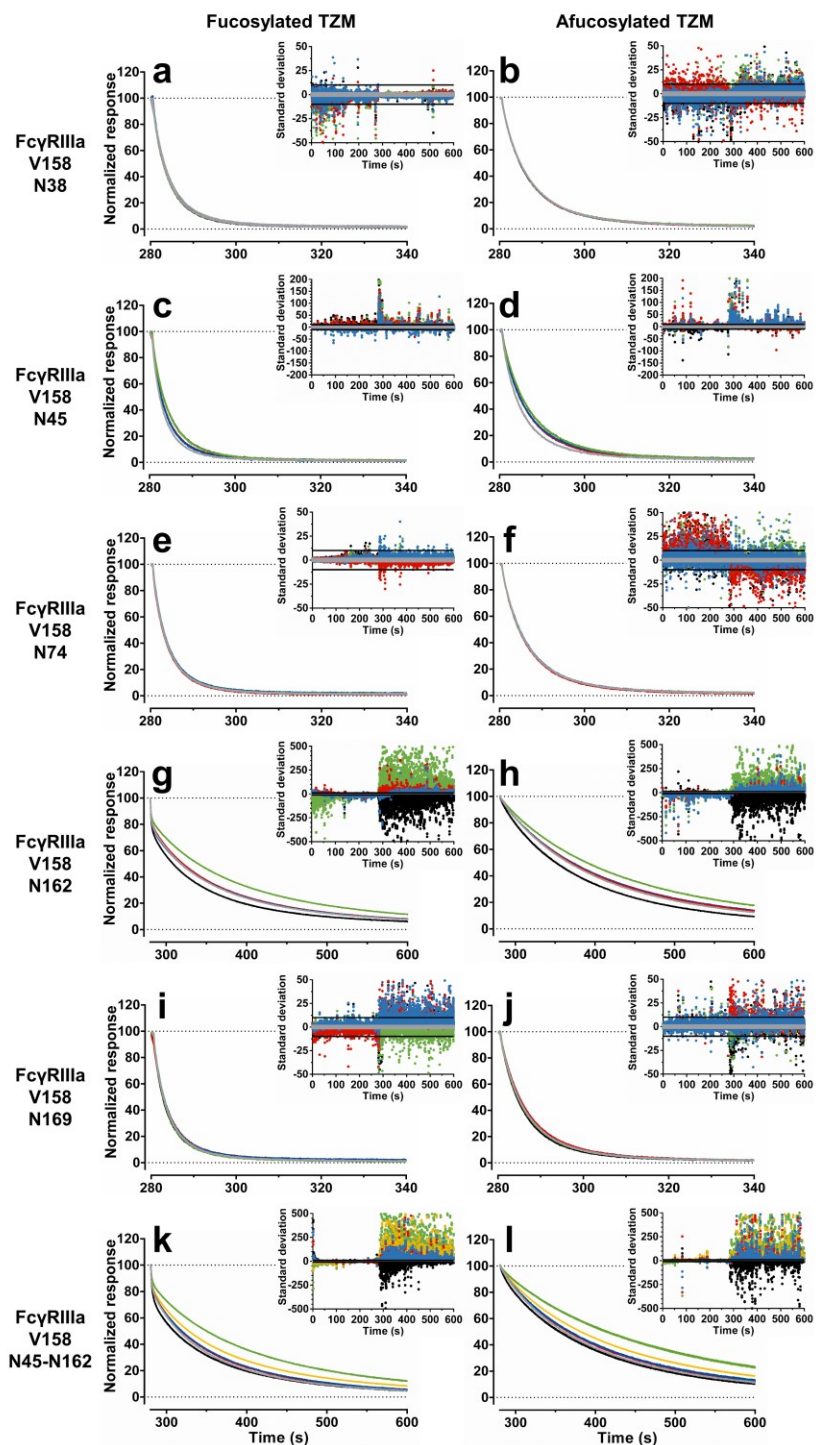


Figure 6-8: Influence of the N-glycan profile of FcγRIIIa mutants upon binding to trastuzumab glycoforms. Overlay of normalized control-corrected sensorgrams (dissociation phases) corresponding to the interactions between coil-tagged FcγRIIIa_{V158} mutants (FcγRIIIa_{V158}-N38 (a,b), FcγRIIIa_{V158}-N45 (c,d), FcγRIIIa_{V158}-N74 (e,f), FcγRIIIa_{V158}-N162 (g,h), FcγRIIIa_{V158}-N169 (i,j) and FcγRIIIa_{V158}-N45-N162 (k,l)) and injected fucosylated TZM (left column) or

afucosylated TZM (right column) at 2000 nM and 1000 nM respectively (triplicate injections). Grey: unmodified. Green: high-mannose. Blue: hybrid. Red: afucosylated. Black: agalactosylated. Yellow: desialylated. Deviation plots on an SD versus time scale are shown in the inset. The standard data (unmodified Fc γ RIIIa mutants – grey) fall between the sensorgram comparison window (in this case ± 10 SD). The dotted line indicates that the figure displays normalized response data.

6.2.5 Discussion

Many studies have shown that the IgG1 / Fc γ R interactions are complex because of the heterogeneities in both IgG1 (Chapitre 5) (Subedi & Barb, 2016; Wada et al., 2019) and Fc γ R N-glycosylation states. In the case of the Fc γ Rs, and more specifically Fc γ RIIIa, the influence of specific N-glycosylation sites (Ferrara, Stuart, et al., 2006; Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009), glycoprofile (Cambay et al., 2019; Hayes et al., 2017; Zeck et al., 2011) or both (Subedi & Barb, 2018) upon their kinetics of binding to IgG1 has been documented, mostly by SPR biosensing. However, significant discrepancies about the exact influence of the Fc γ R N-glycosylation still exist between these studies. Therefore, the underlying mechanisms by which glycans modulate the Fc γ R / IgG1 interactions remain elusive.

The Fc γ R (wild-type and mutants) characterization essentially showed that the purified receptors were aggregate-free and the removal of N-glycans led to a coherent decrease of molecular weight (Figure 6-1). In the case of Fc γ RIIa/b, several N-glycosylation sites appeared to be unoccupied in the wild-type form (Figure 6-1c,d). No major influence on the interaction with IgG1 glycoforms was observed for the Fc γ RIIa while the removal of each Fc γ RIIb N-glycosylation site, and more particularly the glycan on the N187 residue, led to a decrease of the affinity regardless of the IgG1 glycoforms (about 1.5-fold) (Figure 6-4a,b, Figure annexe C - 3c and Figure annexe C - 5a-d). These results support the Hayes and colleagues' assumption that immune cells could modify the N-glycan of this inhibitory receptor to reduce its affinity for IgG, thus leading to the increase of the activation/inhibition ratio and, *in fine*, to the immune cell activation (Hayes, Cosgrave, et al., 2014). Indeed, although the decrease measured via our SPR assay was modest, it is most likely that at the surface of immune cells, the multivalence of the interactions could lead to such effect.

For FcγRI, only the removal of N59 glycan led to a difficult protein expression (Figure 6-1e, Figure annexe C - 2 and Table annexe C - 1). Hayes and colleagues reported that FcγRI deglycosylation led to a decrease in binding level to IgG1 (Hayes, Frostell, et al., 2014). In our case, the FcγRI-N59Q was the only mutant to show a marked difference in its apparent dissociation rate from TzM, while the kinetic profiles of the TzM / FcγRI-N59 interactions were similar to those recorded with the wild-type FcγRI (Figure annexe C - 5e,f). As reported in several studies, the domain 1 of the FcγRI, on which the N59 glycan is located, may not be close to the IgG interaction site (Kiyoshi et al., 2015; Oganessian et al., 2015), which further complexify the interpretation of our results. Finally, it may be advantageous to use the FcγRI-N163Q mutant rather than its wild-type version since the removal of the N163 glycan led to higher protein expression and lower aggregate while FcγRI binding to IgG glycoforms was not affected (Figure annexe C - 2e).

The assessment of the FcγRIIIa_{F158/V158} glycoforms (Figure 6-1a,b) was qualitatively performed by observing the width of the SDS-PAGE bands, which were similar to those reported by Zeck et al. (2011). Besides, no degradation was observed for any of the FcγRIIIa mutants (which contrasts with the observations by Shibata-Koyama *et al.* for FcγRIIIa-N162 (Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009)), but the expression of deglycosylated FcγRs was unsuccessful. The FcγRIIIa_{F158/V158} are the only FcγRs for which N-glycans significantly modulate the binding to IgG1 glycoforms. As expected, the FcγRIIIa N162 glycan followed by the N45 glycan have the highest influence on binding to IgG1 whereas the N38, N74 and N169 glycans have no significant effect (Ferrara et al., 2011; Mizushima et al., 2011; Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009). More specifically, a 2-fold affinity increase is observed when the N45 glycan is removed, regardless of the TzM glycoforms. Such impact was already observed by Shibata-Koyama *et al.* but for afucosylated IgG1 only (Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009). However, given that the N45 glycan does not directly contact IgG1-Fc, it is unlikely that its influence is affected by the IgG1-Fc glycan profile (Subedi et al., 2017). On the other hand, the absence of the N162 glycan led to a 9 to 15-fold (FcγRIIIa_{F158}) and 7 to 12-fold (FcγRIIIa_{V158}) affinity decrease for afucosylated IgG1 binding. These results are in agreement with several studies (Ferrara et al., 2011; Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009), as well as with the specific role of N162 glycan when binding to afucosylated IgG1, whether it is explained by intermolecular interactions (Ferrara et al., 2011; Mizushima et al., 2011; Sakae et al., 2017) or another mechanism as proposed by Falconer

(Falconer et al., 2018). The latter hypothesized that the core fucose within the glycan of the IgG1-Fc limits the many conformations sampled by the N162 glycan of the receptor, and consequently decreases the affinity between fucosylated IgG1 and FcγRIIIa (Falconer et al., 2018). In their study, Falconer and coworkers compared the binding of the FcγRIIIa-N45-N162 mutant to that of the same mutant digested with the endoglycosidase F1 (i.e., N-glycan with only the first GlcNAc), when interacting either with fucosylated or afucosylated Fc. Surprisingly, the truncated FcγRIIIa-N45-N162 had a higher affinity for the fucosylated Fc than the wild-type form (close to the affinity measured for the afucosylated Fc) while no major effect was observed when binding to the afucosylated Fc. Falconer *et al.* concluded that the decrease of the FcγRIIIa / fucosylated IgG1 affinity was due to the sensitivity of the distal N162 glycan residues to the N-glycan core fucose displayed on the IgG1-Fc and, to a lesser extent, to a slow-down of the N297 glycan motion exerted by the core fucose (Falconer et al., 2018). This increase in affinity for the truncated FcγRIIIa-N45-N162 / fucosylated IgG1 interaction has also been reported by Mizushima et al. (2011) but its interpretation was different. According to these researchers, this effect was more likely due to the loss of steric hindrance of the core fucose, caused by the distal residues of N162 glycan as well as the one potentially caused by the N45 glycan. Interestingly, Subedi *et al.* demonstrated that the N45 glycan stabilizes the FcγRIIIa through the first GlcNAc (Subedi et al., 2017). Therefore, if the removal of the N45 glycan has the same positive effect as its truncation, as proposed by Mizushima *et al.*, the effect of the N45 glycan on the FcγRIIIa / IgG1 affinity is potentially due to either an allosteric effect (Ferrara et al., 2011) or steric hindrance (Mizushima et al., 2011). Therefore, the stabilization of FcγRIIIa thanks to the N45 glycan would only affect the protein expression. To conclude on this matter, it should be highlighted that the FcγRIIIa with truncated N45 and N162 glycans (i.e., (1)GlcNAc) displayed a high affinity for both fucosylated and afucosylated IgG1 while the removal of the N162 site of the FcγRIIIa had limited effect on the fucosylated IgG1 interaction and led to a drastic loss on afucosylated IgG1 affinity. Therefore, if the potential effect of the truncated N45 glycan is not considered, it means that the first GlcNAc on FcγRIIIa N162 glycan would have a critical role (in any way) on the strong binding to IgG1.

Our results concerning the influence of the FcγRIIIa glycans upon IgG1 binding are partly in agreement with the literature since we here report some discrepancies with two recent studies from the same group that investigated the influence of the FcγRIIIa N-glycans on the binding to Fc glycoforms (Falconer et al., 2018; Subedi & Barb, 2018) (Table 6-1). In both studies, the influence

of the N45 and N162 glycans on the interaction with (fucosylated or afucosylated) IgGs was analyzed by comparing them with the interactions recorded with the FcγRIIIa wild-type (i.e., with 5 N-glycosylation sites). Falconer *et al.* investigated FcγRIIIa mutants with Man5 glycan only (Falconer et al., 2018) while either complex-type glycan or Man5 were compared by Subedi *et al.* (Subedi & Barb, 2018). Both studies first demonstrated that the N162 glycan along with the N45 glycan are essential for the high-affinity interaction since their removal mostly reduced affinity, thus contrasting with the negative impact of FcγRIIIa N45 glycan on the binding to afucosylated IgG1 suggested by Shibata-Koyama *et al.* (Table 6-1) (Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009). As mentioned previously, their stronger affinity was obtained for the FcγRIIIa-N45-N162 mutant (7- and 13-fold affinity increase for the fucosylated and afucosylated Fc, respectively). This contrasts with our results (Figure 6-3) and those of Ferrara *et al.* who reported no effects with the same FcγRIIIa mutant (Ferrara et al., 2011). Falconer *et al.* suggested that such results were probably due to FcγRIIIa N-glycan composition (Man5 vs complex-type) (Falconer et al., 2018). However, Subedi *et al.* have shown the same effect regardless of the FcγRIIIa N-glycan type (Subedi & Barb, 2018). In the same study, depending on the FcγRIIIa glycan composition (Man5 vs complex-type), the removal of the FcγRIIIa N45 glycan led to contrasting results (Table 6-1) (Subedi & Barb, 2018). More precisely, on the one hand, for the interaction with the afucosylated Fc, there was no effect when the FcγRIIIa displayed complex-type glycans while the affinity decreased by 5-fold for the Man5 glycans. On the other hand, for the interaction with fucosylated Fc, the affinity was decreased by 3-fold for FcγRIIIa carrying complex-type glycans while no major effect was observed with Man5 glycans. Note that in our case, the affinity was increased by 1.7-fold for both afucosylated and fucosylated IgG1s. Besides, a closer look of the data from the same group also indicated that the removal of N38, N74 and N169 glycans led to a notable increase of affinity while several studies, including ours, proved that these N-glycans do not influence the binding to IgG1 (Table 6-1) (Ferrara et al., 2011; Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009).

Table 6-1: Summary of the inconsistencies observed in the literature about the influence of FcγRs N-glycosylation on the binding to IgG1 glycoforms. Grey rows refer to this study.

FcγR	Heterogeneity	Glycan	Profile	Effect on IgG1 binding		Ref.
				Fucosylated	Afucosylated	
FcγRIIIa	Macro	N162	Complex/Man9	0/+	++++	/
			Complex	-	++++	(Ferrara, Stuart, et al., 2006)
			Complex	0/-	+++	(Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009)
			Complex	-	0	(Subedi & Barb, 2018)
			Man5	+	+++	
			Man5	++	/	(Hayes, Cosgrave, et al., 2014)
		N45	Complex/Man9	-	-	/
			Complex	0/-	-	(Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009)
			Complex	++	0/+	(Subedi & Barb, 2018)
			Man5	0	++	
			Man5	+	/	(Hayes, Cosgrave, et al., 2014)
		N38 / N74 / N169	Complex/Man9	0	0	/
			Complex	0/+	0/-	(Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, et al., 2009)
			Complex	0/+	0/+	(Ferrara et al., 2011)
			Complex/Man5	--	/	(Patel, K. R. et al., 2018)
			Complex	--	--	(Subedi & Barb, 2018)
			Man5	--	0	
			Man5	-	-	(Hayes, Cosgrave, et al., 2014)
	Micro	Wild-type	Man9	+	+	/
			Man5	+++	/	(Patel, K. R. et al., 2018)
			Man9/Man5	+++	+++	(Hayes, Cosgrave, et al., 2014)
			Man5	++++	++++	(Subedi & Barb, 2018)
			Afucosylated	0	0	/
			Afucosylated	+	+	(Subedi & Barb, 2018)
		N38 / N74 / N169	Man9	0	0	/
			Man5	0	/	(Patel, K. R. et al., 2018)
			Man5	0	0	(Subedi & Barb, 2018)
			Afucosylated	0	0	/
			Afucosylated	0/-	0/-	(Subedi & Barb, 2018)
			Man9	+	+	/
		N45 / N162	Man9	+	+	(Ferrara et al., 2011)
			Man5	+++	/	(Patel, K. R. et al., 2018)
			Man5	++	++	(Subedi & Barb, 2018)
			Afucosylated	0	0	/
			Afucosylated	-	0	(Subedi & Barb, 2018)
			Man9	0/+	0/+	/
		N162	Man5	0/+	0/+	(Subedi & Barb, 2018)
			Man9	+	+	/
			Man5	+++	+++	(Subedi & Barb, 2018)
FcγRIIIb	Micro	Wild-type	Man5	+	0/+	(Subedi & Barb, 2018)
FcγRIIa	Macro/Micro	Wild-type	Man9	0	0	/
			Man5	+	+	(Subedi & Barb, 2018)
FcγRIIb	Macro/Micro	Wild-type	Man9	0	0	/
			Man5	+	-	(Subedi & Barb, 2018)
FcγRI	Macro/Micro	Wild-type	Man9	0	0	/

The impact of the FcγR glycan or glycoprofile on the IgG1 glycoforms interactions are evaluated as follows: no impact: 0; negative impact: - and positive impact: +

Regarding the N162 glycan influence, the previous studies once again presented conflicting results (Table 6-1). Indeed, Subedi *et al.* showed that the removal of the Fc γ RIIIa N162 glycan (with complex type) led to a 2.7-fold affinity increase for the fucosylated Fc (no effect in our case) while no effect was observed for the afucosylated Fc (8.5-fold affinity decrease in our case) (Subedi & Barb, 2018). On the contrary, the same study indicated that when Fc γ RIIIa displayed Man5 glycans, the removal of the N162 glycan decreased the affinity for both fucosylated (2.5-fold) and afucosylated Fc (15-fold), which is more alike to our observation. Although it is possible that part of these conflicting results is due to the differences in Fc γ RIIIa glycan composition, their interpretation might have also been biased by the fact that K_D values were compared to those they determined in a previous study (rather than within the same batch of analysis as reported here) (Subedi & Barb, 2016).

The afucosylated IgG1 interactions with Fc γ RIIIa missing the N162 glycan (i.e., as in the N162Q, N38, N45, N74 and N169 mutants) were characterized by a 2-fold affinity increase when compared to that for fucosylated IgG1 (Figure 6-3). These results suggest that the higher affinity displayed by the afucosylated IgGs for Fc γ RIIIa is not only due to the N162 glycan but also to other intermolecular interactions (protein-protein or carbohydrate-protein) emerging when the core fucose is absent. For example, several studies have shown protein-protein interactions between the residues Fc-Y296 and Fc γ RIIIa-K128 (Ferrara *et al.*, 2011; Mizushima *et al.*, 2011).

Surprisingly, we also observed a slight negative impact on Fc γ RIIIa binding to TzM and TzM-gal (i.e., fucosylated forms) when the Fc γ RIIIa N162 glycan was removed (Figure 6-3 and Figure annexe C - 3a,b). This contrasts with conclusions by Ferrara *et al.* who reported that the removal of N162 glycan increased by 3-fold the affinity for fucosylated IgG1 (Ferrara, Stuart, *et al.*, 2006). Our results (i.e., the negative impact) might be attributable to IgG glycoform heterogeneity and more specifically to the presence of a low percentage of afucosylated forms (4% and 9 % for TzM and TzM-gal, respectively) for which binding is highly impacted by the absence of N162 glycan.

Altogether, this study on the Fc γ Rs N-glycans influence upon IgG1 binding has shown both similar and opposing results with the literature, thus highlighting the complexity of the Fc γ RIIIa N-glycan impact on the interaction with either fucosylated or afucosylated IgG1s. Importantly, the N45 and N162 glycans and the mechanisms by which they influence the Fc γ RIIIa interaction with

IgG1s remain to be elucidated. Further complexity has also been observed with the Fc γ RIIIa N-glycan glycoprofile. Our characterization by lectin blots (Figure 6-5 and Figure 6-6) shows that the glycoprofiles of the receptors we glycoengineered are enough enriched in the desired glycoforms to conclude about the influence of specific receptor glycoforms in the interaction with IgG1 glycoforms. As expected, the Fc γ RIIIa N-glycans with high-mannose type had the highest affinity, regardless of the IgG1 core fucosylation level (Figure 6-7). The positive influence of the high-mannose structure is in accordance with several studies (Falconer *et al.*, 2018; Ferrara *et al.*, 2011; Subedi & Barb, 2018). However, the increased level, although close to 2-fold, as reported by Ferrara *et al.* (2011), contrasts with the 16 to 40-fold increase reported by Subedi *et al.* (2018). Such difference could be due to the mannosylation percentage (Man9 vs Man5) since, as in our study, Ferrara *et al.* used kifunensine to glycoengineer Fc γ RIIIa (leading to Man9/Man8 glycans) whereas Subedi *et al.* used the *GntI*- cell line to produce Man5 glycan. However, contrasting with this hypothesis, Falconer *et al.* reported that Man5 and Man9 glycans lead to similar increase in affinity compared to complex type glycan (4.3 to 15-fold and 3.8 to 7-fold respectively) (Falconer *et al.*, 2018). Interestingly, these two studies from the same group have shown a positive effect of the Man5 type glycan on the IgG1 binding but at very different levels (Table 6-1) (Falconer *et al.*, 2018; Subedi & Barb, 2018). Desialylated and α 2,6-sialylated Fc γ RIIIa also displayed higher affinity but to a lesser extent than Fc γ RIIIa with high-mannose type, as already observed (Cambay *et al.*, 2019). Concerning the other Fc γ Rs (i.e., Fc γ RI, Fc γ RIIa/b), their glycoprofile does not have any detectable influence on the binding to various IgG1 glycoforms (Figure 6-7).

The expression of various glycoforms of Fc γ RIIIa_{V158} mutants displaying only one N-glycan provided further evidence that the N162 glycoprofile only is linked to the variation observed with wild-type Fc γ RIIIa (Figure 6-8). Indeed, the Fc γ RIIIa-N162 with high-mannose type was characterized by a slower dissociation while the agalactosylated form hastened it. The influence of the N162 glycan profile has also been suggested by Subedi *et al.* (Table 6-1) (Subedi & Barb, 2018). As mentioned above, the kinetic variations due to the Fc γ RIIIa N162 glycan were observed regardless of the IgG1 fucosylation level, suggesting that the effect of N162 glycan profile is independent of the IgG1 core fucose. The positive effect of the high-mannose type could be linked to the absence of fucosylation on Fc γ RIIIa N-glycans (Subedi & Barb, 2018). However, no effect was observed with afucosylated wild-type Fc γ RIIIa as well as with afucosylated Fc γ RIIIa_{V158} mutants, thus supporting the conclusion of Subedi *et al.* that the increased affinity of high-mannose

FcγRIIIa is unlikely due to the absence of fucose. Of interest, Mizushima *et al.* suggested that the fucose of FcγRIIIa N162 glycan could interact with one of the afucosylated IgG1-Fc N-glycan (Mizushima *et al.*, 2011). However, the absence of effect observed in our study supports the hypothesis that this postulated interaction is not significant (Ferrara *et al.*, 2011; Mizushima *et al.*, 2011).

Finally, it should be highlighted that slight kinetic variations have been observed with the N45 glycan forms (Figure 6-8). More precisely, the high-mannose and agalactosylated forms showed a slightly slower dissociation rate than other forms. This effect could be linked to the presence of smaller glycan structures that, as proposed by Mizushima *et al.*, would result in a decrease of the steric hindrance, the most probable reason explaining the negative impact of the FcγRIIIa N45 glycan demonstrated by Shibata-Koyama *et al.* (Mizushima *et al.*, 2011; Shibata-Koyama, Iida, Okazaki, *et al.*, 2009).

Altogether, the large amount of SPR data related to FcγR glycosylation strongly suggests that the recombinant forms of the Fcγ receptors with glycoprofiles physiologically resembling the natural ones must be used to provide more accurate predictions of the physiological outcome of antibody therapies. A better mimicry of the natural receptor glycoforms is also required to better understand the impact different FcγR glycosylation states may have at the surface of the immune cells in healthy or disease states.

6.2.6 Materials and Methods

6.2.6.1 DNA and plasmids

The codon-optimized sequences encoding the human ectodomains of FcγRIIIa_{F158}, FcγRIIIa_{V158}, FcγRIIa, FcγRIIb and FcγRI were cloned into pTT5TM vectors (Chapitre 5) (Cambay *et al.*, 2019). All constructs contained the E5 sequence, i.e., the cDNA coding for the (EVSALEK)₅ peptide sequence, and a ten-histidine C-terminal tag, giving the final plasmids pTT5TM-CD16aF-E5-His, pTT5TM-CD16aV-E5-His, pTT5TM-CD32a-E5-His, pTT5TM-CD32b-E5-His and pTT5TM-CD64-E5-His, respectively.

TZM is a humanized IgG1 directed against the human epidermal growth factor receptor-2 (HER2 or Erb2). cDNA coding for TZM LC and TZM HC were cloned into individual pTT5TM

vectors (Zhang, J. et al., 2009), as well as the cDNA corresponding to the human glycosyltransferase β 1,4-galactosyltransferase 1 (GT) and the bacterial enzyme GDP-4-dehydro-6-deoxy-D-mannose reductase (RMD). The truncated ST6Gal1 sequence was flanked by a signal peptide from the vascular endothelial growth factor A for secretion and a ten-histidine tag inserted at the C-terminus to facilitate its purification.

cDNA coding for the green fluorescent protein (GFP) cloned into the pTTTM vector was used as a reporter gene to evaluate transfection efficiency and was incorporated as 5 % in weight for all transfections as described elsewhere (Durocher et al., 2002). The pTT22TM-AKT-DD plasmid is derived from pTTTM vector and encodes constitutively active bovine AKT (Alessi et al., 1996).

6.2.6.2 Cell lines

The Chinese hamster ovary-3E7 (CHO-3E7) and the human embryonic kidney 293-6E (HEK293-6E) cell lines, stably expressing a truncated Epstein-Barr virus Nuclear Antigen-1 (EBNA1), were cultured as described elsewhere (Cambay et al., 2019).

6.2.6.3 Site-directed mutagenesis

A panel of mutants has been generated for each Fc γ R by serial single-point mutation of the asparagines of the N-glycosylation sites into glutamines (Figure annexe C - 1). To this end, primers were designed on NEBaseChanger.neb.com and mutated plasmids were amplified by PCR using the Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, cat# M0491L). PCR products were then phosphorylated and ligated for one hour at 37 °C using the T4 Polynucleotide Kinase (New England Biolabs, cat# M0201L) and the T4 DNA ligase (New England Biolabs, cat# M0202L) respectively. The ligations were digested with DpnI for two hours at 37 °C before transforming *Escherichia coli* (DH5 α) grown overnight at 37 °C on agar plate with CircleGrow medium (MP Biomedicals, cat# 113000152) and supplemented with ampicillin (100 μ g/mL). For DNA sequencing, positive clones were amplified overnight in CircleGrow medium supplemented with ampicillin (100 μ g/mL) and purified by QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, cat# 27106). The positive mutated cDNA of Fc γ Rs were sub-cloned into their original pTT5TM expression vectors and plasmids were amplified as explained before and purified by Maxiprep for transfection.

6.2.6.4 Fc γ receptors

6.2.6.4.1 Production

The E5-tagged Fc γ Rs (mutated or not) were produced by transient gene expression in CHO-3E7 in 250 mL Erlenmeyer ventilated flasks shaken at 120 rpm in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO₂ (Cambay et al., 2019). Different inhibitors of the glycosylation pathway (i.e., kifunensin, mannostatin A, 2F-peracetyl-fucose and 2-deoxy-2-fluoro-D-galactose) were added six hours post-transfection (hpt) to modify the Fc γ R N-glycans profiles. Fc γ Rs with high-mannose (Man8) structure were expressed (designated as ‘high-mannose Fc γ Rs’ in the text) in the presence of 10 μ M kifunensine (Toronto Research Chemicals, cat# K450000). 8 μ M of mannostatin A (Toronto Research Chemicals, cat# M166500) were added to express Fc γ Rs with hybrid N-glycans (designated as ‘hybrid Fc γ Rs’ in the text). Afucosylated Fc γ Rs were expressed (designated as ‘afucosylated Fc γ Rs’ in the text) in the presence of 75 μ M 2F-peracetyl-fucose (Millipore Sigma, cat# 344827). At last, 600 μ M of 2-deoxy-2-fluoro-D-galactose (Carbosynth, cat# MD04718) were added to block the N-glycosylation (designated as ‘degalactosylated Fc γ Rs’ in the text).

6.2.6.4.2 Glycan remodeling

Further modifications of the N-glycan profiles were performed on wild-type Fc γ Rs. Terminal sialic acids in all linkages (α (2,3), α (2,6), α (2,8) and α (2,9)) were removed from wild-type Fc γ Rs (250 μ g, 2-7.5 mg/mL) by the *Arthrobacter ureafaciens* Glyko[®] Sialidase A[™] (Prozyme, cat# GK80040) at 0.5 U/mL (24 h at 37 °C in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0, designated as ‘desialylated Fc γ Rs’ in the text). Desialylated wild-type Fc γ Rs were purified using 1 mL Ni Sepharose[®] Excel columns (GE Healthcare, cat# 17-3712-03). The elution buffer was exchanged against PBS with NAP[™]-5 columns (GE Healthcare, cat# 17-0853-02), then purified desialylated wild-type Fc γ Rs were concentrated on Amicon Ultra-0.5 3K centrifugal filter units (Millipore, cat# UFC500324). Desialylated wild-type Fc γ Rs were *in vitro* α (2,6)-sialylated (designated as ‘ α 2,6-sialylated Fc γ Rs’ in the text) using a truncated human ST6Gal1 expressed in HEK293-6E and purified by IMAC as described elsewhere (Cambay et al., 2019).

6.2.6.4.3 Purification

E5-tagged FcγRs were harvested 5 dpt, centrifuged at 3300 x g for 20 min and supernatants were filtered through 0.45 μm membranes. The clarified supernatants were purified by IMAC with 1 mL Ni Sepharose® Excel columns (GE Healthcare, cat# 17371203). The fractions containing the receptors were pooled and the elution buffer was exchanged against PBS with an illustra NAP-25 column (GE Healthcare, cat# 17085201). Purified FcγRs were concentrated on Amicon Ultra-4 10K centrifugal filter units (Millipore, cat# UFC801024) and further purified by SEC using a Superdex75 10/300 GL column (GE Healthcare, cat# 17517401) to reduce aggregates. The column was equilibrated with PBS and 0.5 mL of sample was loaded onto the column at 1 mL/min. PBS was used to elute the proteins. The aggregate-reduced E5-tagged FcγRs were individually pooled and quantified by absorbance at 280 nm using a Nanodrop™ spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). The production and purification characteristics of each FcγRs are presented in Figure annexe C - 2 and Table annexe C - 1.

6.2.6.5 Production and purification of TzM glycoforms

TzM (mainly G0F), TzM-gal (mainly G2F) and TzM-afuc (mainly G0) were produced by transient gene expression in CHO-3E7 cells then purified as described elsewhere (Cambay et al., 2019).

6.2.6.6 Coomassie-stained gels and lectin blots

The proteins were loaded on NuPAGE™ Novex 4-12 % Bis-Tris protein gels (Life Technologies, cat# NP0322BOX) or 4-12% Criterion™ XT Bis-Tris protein gels (Bio-Rad, cat# 3450125) ran in XT MES buffer (Bio-Rad, cat# 1610789) at 170 V for 60 minutes. For the Coomassie staining, 1.5 μg of protein per well were loaded. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue for 15 min then destained overnight in a solution made of acetic acid 7.5 % (v:v) and ethanol 20 % (v:v). For lectin blots, biotinylated lectins *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), *Erythrina cristagalli* lectin (ECL), *Maackia amurensis* lectin II (MALII), *Lens culinaris* agglutinin (LCA), concanavalin A (Con A) and succinylated wheat germ agglutinin (sWGA) as well as fluorescein labeled *Aleuria aurantia* lectin (AAL) were purchased from Vector Laboratories (cat# SNA: B-1305, ECL: B-1145, MALII: B-1265, LCA: B-1045, Con A: B-1005, sWGA: B-1025S, AAL: FL-1391). Samples were treated with DTT (10 min at 70 °C) and 0.75 μg of purified FcγRs

was loaded on the gels for SNA blots and 1 µg for the other lectin blots. After protein transfer, the nitrocellulose membrane was incubated one hour in blocking reagent, then with a given lectin for two hours (5 µg/mL ECL, 5 µg/mL MALII, 10 µg/mL SNA, 10 µg/mL LCA, 10 µg/mL Con A, 10 µg/mL sWGA and 5 µg/mL AAL). For blots with biotinylated lectins, an incubation with 1:1000 Streptavidin-HRP (BD Biosciences, cat# 554066) for one hour was performed followed by a signal revelation with the ImmunStar™ Western C™ Substrate Kit (Bio-Rad, cat# 170-5070). The images were recorded with a Chemidoc MP Imaging System (Bio-Rad). The membranes were thoroughly washed with PBS-Tween 0.1 % before each incubation step. Ponceau red staining was performed to control the amount of protein loaded.

6.2.6.7 Surface plasmon resonance analysis

SPR experiments were performed using a Biacore T100 system (GE Healthcare) and HBS-EP+ (10 mM HEPES, 0,15 M NaCl, 3 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], and 0.05 % [v/v] surfactant P20, pH 7.4) as running buffer. Analysis and sample compartment temperatures were set to 25 °C and 4 °C, respectively. The surface plasmon resonance experiments were performed on research-grade CM5 sensor chips. HBS-EP+ (cat# BR100669), Series S Sensor chip CM5 (cat# 29104988) were all from GE Healthcare. E5-tagged FcγRs (i.e., FcγRIIIa_{F158}, FcγRIIIa_{V158}, FcγRIIa, FcγRIIb and FcγRI) were produced as explained above. Each E5-tagged FcγR (0.25 µg/mL) was stably captured upon Kcoil previously immobilized at the biosensor surface via coiled-coil interactions as described elsewhere (Chapitre 5) (Cambay et al., 2019). TzM glycoforms were injected in triplicate (i.e., 0.5 nM to 100 nM for FcγRI; 50 nM to 5000 nM for FcγRIIa and FcγRIIb; 40 nM to 4000 nM (TzM and TzM-gal) and 20 nM to 2000 nM (TzM-afuc) for FcγRIIIa_{F158}; 20 nM to 2000 nM (TzM and TzM-gal) and 3 nM to 1000 nM (TzM-afuc) for FcγRIIIa_{V158}) over captured FcγRs and control surfaces at 30 µL/min (FcγRIIIa_{V158}) or 50 µL/min (other FcγRs). The receptor/IgG dissociation was monitored by injecting running buffer. The surfaces were regenerated with one 15 s injection of 6 M guanidine/HCl at 100 µL/min.

6.2.6.8 Data analysis

6.2.6.8.1 General

Data were collected at a rate of 10 Hz. Prior to analysis, sensorgrams were double-referenced using BiaEvaluation 3.1 software, by subtracting data from the reference flow cell and then subtracting a blank cycle where buffer was injected instead of protein sample. To reduce the influence of spikes in data analysis, 0.5 s of data was removed at injection start and stop. A minimum of one replication for each condition was collected on different days. The replicates were performed on different Kcoil surfaces and by four different operators. Representative results are shown. For the low-affinity FcγRs, the apparent K_D values were calculated through a steady-state analysis assuming a one-to-one binding model. In the case of FcγRI, data were globally fit as explained elsewhere (Chapitre 5).

6.2.6.8.2 Similarity score

To assess sensorgram differences, similarity scores and deviation plots were obtained for each experiment using a distance measurements procedure described in our previous study (Cambay et al., 2019) and adapted from Karlsson *et al.* (Karlsson et al., 2016). Briefly, similarity scores were calculated for the dissociation phases of double-referenced and normalized sensorgrams.

6.2.6.9 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The level of significance was set at $p < 0.05$ using two-tailed tests.

6.2.7 Acknowledgements

We thank Gilles Saint-Laurent, Denis L'Abbé and Christian Gervais for their exceptional technical support and fruitful discussions. This work was initially supported by the National Research Council Canada: Human Health Therapeutics Research Center (YD), the Canada Research Chair on Protein-Enhanced Biomaterials (GDC), the NSERC discovery program (GDC) and by the TransMedTech Institute (NanoBio Technology Platform) and its main funding partner, the Canada First Research Excellence Fund.

6.2.8 References

- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., & Hemmings, B. A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.*, *15*(23), 6541-6551. doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb01045.x
- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D. A., Fernandez, N., Jorieux, S., & Daëron, M. (2009). Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, *113*(16), 3716-3725. doi:10.1182/blood-2008-09-179754
- Butler, M. (2006). Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. *Cytotechnology*, *50*(1-3), 57-76. doi:10.1007/s10616-005-4537-x
- Cambay, F., Henry, O., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2019). Impact of N-glycosylation on Fcγ receptor / IgG interactions: unravelling differences with an enhanced surface plasmon resonance biosensor assay based on coiled-coil interactions. *MAbs*, *11*(3), 435-452. doi:10.1080/19420862.2019.1581017
- Cosgrave, E. F. J., Struwe, W. B., Hayes, J. M., Harvey, D. J., Wormald, M. R., & Rudd, P. M. (2013). N-linked glycan structures of the human Fcγ receptors produced in NS0 cells. *J. Proteome Res.*, *12*(8), 3721-3737. doi:10.1021/pr400344h
- Dekkers, G., Plomp, R., Koeleman, C. A., Visser, R., von Horsten, H. H., Sandig, V., . . . Vidarsson, G. (2016). Multi-level glyco-engineering techniques to generate IgG with defined Fc-glycans. *Sci. Rep.*, *6*, 36964. doi:10.1038/srep36964
- Dekkers, G., Treffers, L., Plomp, R., Bentlage, A. E. H., de Boer, M., Koeleman, C. A. M., . . . Vidarsson, G. (2017). Decoding the Human Immunoglobulin G-Glycan Repertoire Reveals a Spectrum of Fc-Receptor- and Complement-Mediated-Effector Activities. *Front. Immunol.*, *8*, 877. doi:10.3389/fimmu.2017.00877
- Dorion-Thibaudeau, J., St-Laurent, G., Raymond, C., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2016). Biotinylation of the Fc gamma receptor ectodomains by mammalian cell co-transfection: application to the development of a surface plasmon resonance-based assay. *J. Mol. Recognit.*, *29*(2), 60-69. doi:10.1002/jmr.2495
- Durocher, Y., Perret, S., & Kamen, A. (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.*, *30*(2), E9. doi:10.1093/nar/30.2.e9
- Edberg, J. C., & Kimberly, R. P. (1997). Cell type-specific glycoforms of Fc gamma RIIa (CD16): differential ligand binding. *J. Immunol.*, *159*(8), 3849-3857. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9378972>
- Ehret, J., Zimmermann, M., Eichhorn, T., & Zimmer, A. (2019). Impact of cell culture media additives on IgG glycosylation produced in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.*, *116*(4), 816-830. doi:10.1002/bit.26904
- Falconer, D. J., Subedi, G. P., Marcella, A. M., & Barb, A. W. (2018). Antibody Fucosylation Lowers the FcγRIIIa/CD16a Affinity by Limiting the Conformations Sampled by the N162-Glycan. *ACS Chem. Biol.*, *13*(8), 2179-2189. doi:10.1021/acscchembio.8b00342

- Ferrara, C., Grau, S., Jager, C., Sondermann, P., Brunker, P., Waldhauer, I., . . . Benz, J. (2011). Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγRIII and antibodies lacking core fucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(31), 12669-12674. doi:10.1073/pnas.1108455108
- Ferrara, C., Stuart, F., Sondermann, P., Brunker, P., & Umana, P. (2006). The carbohydrate at FcγRIIIa Asn-162. An element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms. *J. Biol. Chem.*, 281(8), 5032-5036. doi:10.1074/jbc.M510171200
- Hayes, J. M., Cosgrave, E. F., Struwe, W. B., Wormald, M., Davey, G. P., Jefferis, R., & Rudd, P. M. (2014). Glycosylation and Fc receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 382, 165-199. doi:10.1007/978-3-319-07911-0_8
- Hayes, J. M., Frostell, A., Cosgrave, E. F., Struwe, W. B., Potter, O., Davey, G. P., . . . Rudd, P. M. (2014). Fc gamma receptor glycosylation modulates the binding of IgG glycoforms: a requirement for stable antibody interactions. *J. Proteome Res.*, 13(12), 5471-5485. doi:10.1021/pr500414q
- Hayes, J. M., Frostell, A., Karlsson, R., Muller, S., Martin, S. M., Pauers, M., . . . Rudd, P. M. (2017). Identification of Fc Gamma Receptor Glycoforms That Produce Differential Binding Kinetics for Rituximab. *Mol. Cell. Proteomics*, 16(10), 1770-1788. doi:10.1074/mcp.M117.066944
- Hayes, J. M., Wormald, M. R., Rudd, P. M., & Davey, G. P. (2016). Fc gamma receptors: glycobiology and therapeutic prospects. *J. Inflamm. Res.*, 9, 209-219. doi:10.2147/JIR.S121233
- Jefferis, R. (2009). Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends Pharmacol. Sci.*, 30(7), 356-362. doi:10.1016/j.tips.2009.04.007
- Jefferis, R. (2010). The antibody paradigm: present and future development as a scaffold for biopharmaceutical drugs. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 26, 1-42. doi:10.5661/bger-26-1
- Karlsson, R., Pol, E., & Frostell, A. (2016). Comparison of surface plasmon resonance binding curves for characterization of protein interactions and analysis of screening data. *Anal. Biochem.*, 502, 53-63. doi:10.1016/j.ab.2016.03.007
- Kawasaki, N., Okumoto, T., Yamaguchi, Y., Takahashi, N., Fridman, W. H., Sautes-Fridman, C., . . . Kato, K. (2014). Site-specific classification of N-linked oligosaccharides of the extracellular regions of Fcγ receptor IIIb expressed in baby hamster kidney cells. *J. Glycomics Lipidomics*, 4(2), 116. doi:10.4172/2153-0637.1000116
- Kiyoshi, M., Caaveiro, J. M., Kawai, T., Tashiro, S., Ide, T., Asaoka, Y., . . . Tsumoto, K. (2015). Structural basis for binding of human IgG1 to its high-affinity human receptor FcγRI. *Nat. Commun.*, 6, 6866. doi:10.1038/ncomms7866
- Kommineni, V., Markert, M., Ren, Z., Palle, S., Carrillo, B., Deng, J., . . . Holtz, B. (2019). In Vivo Glycan Engineering via the Mannosidase I Inhibitor (Kifunensine) Improves Efficacy of Rituximab Manufactured in *Nicotiana benthamiana* Plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(1), 194. doi:10.3390/ijms20010194

- Kuntz, D. A., Zhong, W., Guo, J., Rose, D. R., & Boons, G. J. (2009). The molecular basis of inhibition of Golgi alpha-mannosidase II by mannostatin A. *Chembiochem*, *10*(2), 268-277. doi:10.1002/cbic.200800538
- Lejeune, J., Thibault, G., Cartron, G., Ohresser, M., & Watier, H. (2010). [Implications of receptors for the Fc portion of IgG (FcgammaRs) in mechanism of action of therapeutic antibodies]. *Bull Cancer*, *97*(5), 511-522. doi:10.1684/bdc.2010.1077
- Liu, L. (2015). Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *J. Pharm. Sci.*, *104*(6), 1866-1884. doi:10.1002/jps.24444
- Lu, J., Chu, J., Zou, Z., Hamacher, N. B., Rixon, M. W., & Sun, P. D. (2015). Structure of FcgammaRI in complex with Fc reveals the importance of glycan recognition for high-affinity IgG binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *112*(3), 833-838. doi:10.1073/pnas.1418812112
- Lu, J., & Sun, P. D. (2015). Structural mechanism of high affinity FcgammaRI recognition of immunoglobulin G. *Immunol. Rev.*, *268*(1), 192-200. doi:10.1111/imr.12346
- Mizushima, T., Yagi, H., Takemoto, E., Shibata-Koyama, M., Isoda, Y., Iida, S., . . . Kato, K. (2011). Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans. *Genes Cells*, *16*(11), 1071-1080. doi:10.1111/j.1365-2443.2011.01552.x
- Nagae, M., & Yamaguchi, Y. (2012). Function and 3D structure of the N-glycans on glycoproteins. *Int. J. Mol. Sci.*, *13*(7), 8398-8429. doi:10.3390/ijms13078398
- Nimmerjahn, F., Gordan, S., & Lux, A. (2015). FcgammaR dependent mechanisms of cytotoxic, agonistic, and neutralizing antibody activities. *Trends Immunol.*, *36*(6), 325-336. doi:10.1016/j.it.2015.04.005
- Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2007). Antibodies, Fc receptors and cancer. *Curr. Opin. Immunol.*, *19*(2), 239-245. doi:10.1016/j.coi.2007.01.005
- Oganesyan, V., Mazor, Y., Yang, C., Cook, K. E., Woods, R. M., Ferguson, A., . . . Dall'Acqua, W. F. (2015). Structural insights into the interaction of human IgG1 with FcgammaRI: no direct role of glycans in binding. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, *71*(11), 2354-2361. doi:10.1107/S1399004715018015
- Patel, K. R., Roberts, J. T., Subedi, G. P., & Barb, A. W. (2018). Restricted processing of CD16a/Fc gamma receptor IIIa N-glycans from primary human NK cells impacts structure and function. *J. Biol. Chem.*, *293*(10), 3477-3489. doi:10.1074/jbc.RA117.001207
- Sakae, Y., Satoh, T., Yagi, H., Yanaka, S., Yamaguchi, T., Isoda, Y., . . . Kato, K. (2017). Conformational effects of N-glycan core fucosylation of immunoglobulin G Fc region on its interaction with Fcgamma receptor IIIa. *Sci. Rep.*, *7*(1), 13780. doi:10.1038/s41598-017-13845-8
- Shibata-Koyama, M., Iida, S., Okazaki, A., Mori, K., Kitajima-Miyama, K., Saitou, S., . . . Satoh, M. (2009). The N-linked oligosaccharide at Fc gamma RIIIa Asn-45: an inhibitory element for high Fc gamma RIIIa binding affinity to IgG glycoforms lacking core fucosylation. *Glycobiology*, *19*(2), 126-134. doi:10.1093/glycob/cwn110

- Subedi, G. P., & Barb, A. W. (2015). The Structural Role of Antibody N-Glycosylation in Receptor Interactions. *Structure*, 23(9), 1573-1583. doi:10.1016/j.str.2015.06.015
- Subedi, G. P., & Barb, A. W. (2016). The immunoglobulin G1 N-glycan composition affects binding to each low affinity Fc gamma receptor. *MAbs*, 8(8), 1512-1524. doi:10.1080/19420862.2016.1218586
- Subedi, G. P., & Barb, A. W. (2018). CD16a with oligomannose-type N-glycans is the only "low-affinity" Fc gamma receptor that binds the IgG crystallizable fragment with high affinity in vitro. *J. Biol. Chem.*, 293(43), 16842-16850. doi:10.1074/jbc.RA118.004998
- Subedi, G. P., Falconer, D. J., & Barb, A. W. (2017). Carbohydrate-Polypeptide Contacts in the Antibody Receptor CD16A Identified through Solution NMR Spectroscopy. *Biochemistry*, 56(25), 3174-3177. doi:10.1021/acs.biochem.7b00392
- Takahashi, N., Cohen-Solal, J., Galinha, A., Fridman, W. H., Sautes-Fridman, C., & Kato, K. (2002). N-glycosylation profile of recombinant human soluble Fcgamma receptor III. *Glycobiology*, 12(8), 507-515. doi:10.1093/glycob/cwf063
- Wada, R., Matsui, M., & Kawasaki, N. (2019). Influence of N-glycosylation on effector functions and thermal stability of glycoengineered IgG1 monoclonal antibody with homogeneous glycoforms. *MAbs*, 11(2), 350-372. doi:10.1080/19420862.2018.1551044
- Walsh, G. (2018). Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.*, 36(12), 1136-1145. doi:10.1038/nbt.4305
- Yagi, H., Takakura, D., Roumenina, L. T., Fridman, W. H., Sautes-Fridman, C., Kawasaki, N., & Kato, K. (2018). Site-specific N-glycosylation analysis of soluble Fcgamma receptor IIIb in human serum. *Sci. Rep.*, 8(1), 2719. doi:10.1038/s41598-018-21145-y
- Zeck, A., Pohlentz, G., Schlothauer, T., Peter-Katalinic, J., & Regula, J. T. (2011). Cell type-specific and site directed N-glycosylation pattern of FcgammaRIIIa. *J. Proteome Res.*, 10(7), 3031-3039. doi:10.1021/pr1012653
- Zhang, J., Liu, X., Bell, A., To, R., Baral, T. N., Azizi, A., . . . Durocher, Y. (2009). Transient expression and purification of chimeric heavy chain antibodies. *Protein Expr. Purif.*, 65(1), 77-82. doi:10.1016/j.pep.2008.10.011
- Zhang, P., Woen, S., Wang, T., Liao, B., Zhao, S., Chen, C., . . . Rudd, P. M. (2016). Challenges of glycosylation analysis and control: an integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs. *Drug Discov. Today*, 21(5), 740-765. doi:10.1016/j.drudis.2016.01.006

CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE

La N-glycosylation des protéines thérapeutiques est critique pour leur efficacité et leur innocuité puisqu'elle module certaines propriétés incluant l'immunogénicité, la demi-vie ou encore les fonctions effectrices de la protéine. D'un point de vue réglementaire, l'obtention d'un produit pharmaceutique sûr et efficace est basée sur une glycosylation constante et compatible avec l'humain. Or, la biosynthèse des glycanes résulte d'un réseau complexe de réactions métaboliques et enzymatiques influencées par de nombreux facteurs (le profil génétique des cellules, l'épigénétique et l'environnement extracellulaire) (cf. partie 2.2.2). Ainsi, les glycoprotéines thérapeutiques se présentent souvent comme un ensemble hétérogène de glycanes.

Les anticorps monoclonaux sont la classe de glycoprotéines thérapeutiques majoritaire et appartiennent pour la plupart à la sous-classe des IgG1. Ces dernières interagissent de façon spécifique avec les FcγR présents à la surface des cellules de l'immunité innée menant au déclenchement de fonctions effectrices comme l'ADCC (cf. partie 2.1.3.2). Il a été établi que les deux N-glycanes de l'IgG1 sont essentiels pour l'interaction avec les FcγR et que leurs glycoprofiles influencent leur affinité pour les FcγR et permettent une modulation des fonctions effectrices et *in fine* de leur efficacité thérapeutique (cf. partie 2.4.2.2). Le développement rationnel d'IgG thérapeutique via l'enrichissement sélectif de glycoformes d'IgG nécessite donc une compréhension de l'influence complexe des glycoprofiles des IgG1 sur leurs interactions avec les FcγR.

Une complication supplémentaire s'ajoute à l'influence déjà complexe de la N-glycosylation des IgG. En effet, la N-glycosylation des FcγR influence également l'interaction avec les IgG (cf. partie 2.4.3). En effet, plusieurs études ont révélé des profils glycaniques spécifiques à certaines cellules immunitaires (Edberg & Kimberly, 1997) puis l'influence de la N-glycosylation du FcγRIIIa sur la conformation de la protéine et l'affinité des IgG (Ferrara et al., 2011; Ferrara, Stuart, et al., 2006; Subedi & Barb, 2018; Subedi et al., 2017). Ces études nous font nous questionner quant à l'influence du type cellulaire et de son glycome sur l'affinité des FcγR et sur la promotion de certaines fonctions des FcγR. Selon un angle de vue différent, nous pouvons également nous interroger sur une potentielle variation du glycome des cellules immunitaires en fonction de l'état de santé d'une personne voire même en fonction d'une pathologie spécifique afin d'activer ou inhiber certaines fonctions effectrices. Enfin, dans le cadre du développement d'IgG

thérapeutiques, il est essentiel de définir si les effets de la glycosylation des IgG sont dépendants de l'état de glycosylation des FcγR.

Nous ne sommes pas les premiers à nous interroger sur ces questions et de nombreuses études se sont penchées sur l'influence des glycoprofiles des IgG ou des N-glycanes du FcγRIIIa. Cependant, deux problématiques ont motivé nos travaux :

1. La divergence des résultats menant à une ambiguïté sur l'influence de glycanes ou de glycoprofiles :

Une telle ambiguïté est attribuable à de nombreux paramètres dont les principaux sont :

- La divergence des méthodes utilisées pour la mesure des interactions/affinités et de l'activité biologique, voire l'utilisation de méthodes ou de conditions inappropriées
- Le manque d'homogénéité des glycanes étudiés
- Plus rarement, une caractérisation insuffisante des glycanes

2. Le manque d'étude conjointe de l'influence des glycanes des IgG et des FcγR :

En effet, les études sur le sujet se sont concentrées sur la glycosylation des IgG ou des FcγR ou encore sur des sujets plus spécifiques. Dans le cas des IgG, beaucoup se sont intéressés à l'effet spécifique d'une modification comme la fucosylation, la galactosylation ou la sialylation sans tenir compte parfois de la complexité inhérente à chacune de ces modifications. En effet, le terme galactosylation regroupe des glycoprofiles présentant un ou deux galactoses tandis que la sialylation réunit de nombreux profils ayant un ou deux acides sialiques de type et de liaison différents. Finalement, de nombreuses études ont exploré le rôle de la N-glycosylation des FcγR mais sous des angles différents, que ce soit en analysant un ou plusieurs récepteurs, la macro- ou la microhétérogénéité, de façon globale ou site par site, des formes recombinantes ou naturelles.

Nous avons tenu compte de ces deux problématiques pour la planification de nos travaux portant sur **l'étude de l'influence de la N-glycosylation des IgG** (cf. Chapitre 5) **et des FcγR** (cf. Chapitre 6). En effet, nous avons étudié **conjointement les effets des glycanes des IgG et des FcγR via une méthode SPR fiable** (cf. Chapitre 4), permettant de lever toutes les ambiguïtés observées dans les nombreuses études ayant traité du sujet.

Analyse des interactions par SPR

Les techniques biophysiques de mesure des interactions biomoléculaires sont de parfaites alternatives aux essais cellulaires et tests *in vivo* difficiles à mettre en place et à interpréter. En

effet, les méthodes biophysiques permettent d'éliminer l'influence de multiples variables présentes dans les études d'activation cellulaire comme la taille/construction du complexe immunitaire, la viabilité des cellules, la densité des FcγR ou encore la multivalence des interactions du complexe immunitaire avec la surface cellulaire. Les biocapteurs dont le principe de détection repose sur la résonance des plasmons de surface sont les plus largement utilisés par les études traitant de l'interaction IgG/FcγR. En effet, les biocapteurs SPR ont pour avantage de mesurer les interactions sans marquage, en temps réel, avec une sensibilité élevée et avec très peu de matériel, permettant ainsi le calcul de constantes cinétiques et de l'affinité (cf. partie 2.4.1.1). Il faut noter que plusieurs études ont également utilisé l'ELISA pour la mesure des interactions mais cette technique manque de sensibilité pour l'analyse d'impacts plus subtils. Au fil des années, les biocapteurs SPR et les logiciels de traitement de données se sont améliorés permettant à cette technique de devenir une référence dans l'analyse des interactions. Cependant, une utilisation appropriée du biocapteur est critique pour l'obtention de données cinétiques et d'affinité fiables. En effet, les profils cinétiques obtenus peuvent être biaisés par des phénomènes apparaissant lorsque les conditions opératoires ne sont pas adaptées. Parmi ces phénomènes, nous pouvons citer la limitation par transfert de masse, l'encombrement de la surface ou encore la reliaison de l'analyte qui peuvent être engendrées par de mauvaises conditions opératoires comme un débit trop faible et/ou une quantité trop élevée de ligand immobilisé à la surface. En effet, le débit influe sur la diffusion de l'analyte vers la surface de ligand ainsi que sur l'élution du ligand. Comme précisé précédemment, les différences observées dans la littérature laissent entrevoir qu'une utilisation parfois laxiste de diverses méthodologies SPR est responsable de la confusion de l'impact de certains glycoprotéomes d'IgG et de glycanes du FcγRIIIa (cf. Table 6-1 et Tableau annexe A - 1). En effet, certaines études utilisant la SPR ont basé leur conclusion sur des profils cinétiques biaisés obtenus avec des conditions opératoires inadéquates. La méthode d'immobilisation du ligand est l'une des conditions opératoires les plus critiques pour l'obtention de données cinétiques sûres. C'est aussi le paramètre présentant l'une des plus fortes variabilités au travers des études (cf. Tableau 2-12).

Les méthodes d'immobilisation du ligand peuvent être divisées en deux catégories : immobilisation covalente et immobilisation via un agent de capture. Les avantages et inconvénients de ces deux types d'immobilisation sont présentés dans la partie 2.4.1.1 et permettent d'entrevoir les causes de l'obtention d'artéfacts pouvant biaiser l'analyse des profils cinétiques. Brièvement, dans le cas de l'immobilisation covalente, la régénération et l'obtention d'une surface de ligand

hétérogène sont les principaux facteurs menant à l'obtention de données cinétiques biaisées. L'immobilisation par un agent de capture a permis d'outrepasser ces inconvénients mais elle n'assure pas l'obtention de données non biaisées. En effet, il est nécessaire de déterminer si la méthode d'immobilisation répond à certains critères tels que la stabilité de l'immobilisation du ligand. Nous avons observé que de nombreuses études utilisant un biocapteur SPR associé à une immobilisation par un agent de capture ont obtenu des profils cinétiques biaisés sans même en soulever la problématique. C'est particulièrement le cas de la méthode d'immobilisation de ligand avec une étiquette histidine via un anticorps anti-histidine qui présente une forte diminution de signal en fin de phase d'injection (Dorion-Thibaut et al., 2014; Hayes, Frostell, et al., 2014; Zeck et al., 2011). Dans ce cas spécifique, plusieurs hypothèses ont été proposées mais aucune n'a vraiment été validée : interaction non spécifique des FcγR avec l'anticorps anti-histidine, interaction non spécifique des IgG avec l'anticorps anti-histidine, changement de conformation du récepteur diminuant l'affinité de l'anticorps anti-histidine / étiquette histidine ou présence de différentes populations d'IgG ayant des affinités différentes pour les FcγR. Pour éviter cet artéfact, une autre méthode reposant sur le couple biotine / streptavidine avec des récepteurs biotinylés immobilisés sur une surface de streptavidine préalablement immobilisée avec de l'ADN a été développée dans notre laboratoire. Cependant, cette méthode présente une mauvaise reproductibilité (probablement liée à un besoin de stabilisation de la surface d'ADN) et repose sur l'utilisation d'un kit commercial dispendieux ne permettant pas des analyses à grande échelle. En effet, étant donné l'étendue de nos travaux portant sur l'influence de la N-glycosylation des IgG et des FcγR, il était attendu de devoir comparer des milliers de profils cinétiques avec souvent la nécessité de distinguer des différences subtiles. Se baser sur les méthodes d'immobilisation précédemment mentionnées était donc contre-indiqué. Par conséquent, il était fondamental de développer une méthode d'analyse ayant tous les avantages nécessaires pour une analyse cinétique sensible, fiable, rapide, peu coûteuse et permettant d'obtenir des résultats clairs sur l'influence de la N-glycosylation des IgG et des FcγR sur leurs interactions. Dans ce contexte, nous avons décidé de baser notre nouvelle méthode d'immobilisation sur l'interaction superhélice, une expertise de notre laboratoire. Les caractéristiques et les applications de cette technologie ont été développées dans la partie 2.4.1.1. Nous avons également choisi d'utiliser des conditions opératoires comme un débit plus élevé et une faible densité de ligand puisqu'ils avaient déjà fait l'objet d'optimisation pour limiter plusieurs artéfacts. Le développement et la caractérisation de cette nouvelle méthode

d'immobilisation sont rapportés dans le Chapitre 4 (Cambay et al., 2019). Les résultats de cette étude nous ont permis de constater que notre méthode surpasse l'ensemble des méthodes d'immobilisation existantes et dispose de l'ensemble des caractéristiques nécessaires à notre étude.

Fort de cette nouvelle méthode, nous nous sommes attelés à l'étude de l'influence de la glycosylation des IgG sur leurs interactions avec les FcγR. De nombreuses études se sont penchées sur le sujet mais très peu ont réalisé une analyse complète et/ou rigoureuse. Certaines ne permettent donc pas une compréhension globale de l'influence tandis que d'autres présentent des résultats peu fiables et non corrélés à des essais cellulaires. Ainsi, l'influence de certaines modifications montre une certaine variation selon les études (cf. Tableau annexe A - 1). En prenant compte de ces observations et de la première problématique présentée précédemment, et tout en cherchant à apporter une contribution au domaine, nous avons construit notre étude selon les points suivants :

- Étude d'un large panel de glycoformes d'IgG
- Caractérisation fine des glycanes
- Analyse sur un large panel de FcγR
- Utilisation rigoureuse d'un essai SPR fiable
- Corrélation des affinités avec un essai cellulaire

Génération et caractérisation du panel de glycoformes d'IgG

Il existe de nombreuses méthodes pour modifier le glycoprofil des IgG (cf. partie 2.3). Nous avons opté pour la génération de glycoformes d'IgG via une plateforme de production en cellules CHO par expression transitoire de l'IgG et coexpression de glycosyltransférases. La transfection transitoire est une technique rapide et peu coûteuse de génération de protéines recombinantes. Nous avons combiné cette méthode avec le remodelage *in vitro* afin d'augmenter le taux de disialylation puisque la sialylation obtenue *in vivo* se limite à un faible taux de monosialylation (Raymond et al., 2015). Ces méthodes sont basées sur des conditions opératoires optimisées par des travaux préliminaires au sein de notre laboratoire (Raymond, 2016).

Afin de discuter adéquatement l'effet des glycoprofiles, nous devons valider notre méthodologie de génération de glycoformes d'IgG. De nombreuses méthodes permettent une évaluation de la glycosylation mais avec des degrés de précision variables (cf. partie 2.3.4). Comme expliqué, certaines études ont basé leur caractérisation de glycanes sur des méthodes peu précises comme les *lectin blots* (Kaneko et al., 2006; Peschke et al., 2017). Dans notre cas, nous avons

caractérisé nos glycoformes via une plateforme analytique comptant trois méthodes orthogonales. Cette plateforme a permis d'évaluer la composition hétérogène des glycoformes rapidement (*lectin blots* et cIEF - pour le développement de la méthodologie de génération des glycoformes) et précisément (évaluation des glycanes libres par HILIC – pour la détermination de l'efficacité de notre méthodologie).

Mesure des interactions par SPR

À l'aide de notre essai SPR basé sur l'immobilisation des FcγR étiquetés avec le peptide E5, nous avons mesuré les affinités des interactions entre FcγR et glycoformes d'IgG1. L'atteinte d'équilibres avec les FcγR de faible affinité (FcγRIIIa_{F158/V158} et FcγRIIa/b) nous a permis de calculer les affinités via la méthode des plateaux (cf. partie 2.4.1.1). En effet, l'utilisation du modèle cinétique simple était contre-indiquée au vu de la complexité des profils cinétiques. Dans le cas du FcγRI, nous avons utilisé le modèle cinétique « ligand hétérogène » puisque les phases d'équilibre n'ont pu être atteintes. Ces données nous ont permis d'observer que le glycoprofil des IgG module principalement l'interaction avec les FcγRIIIa_{F158/V158}. Plus précisément, nous avons pu montrer la forte augmentation d'affinité due à l'absence de fucose ainsi que la légère augmentation d'affinité due à la digalactosylation. Concernant la sialylation, nos résultats suggèrent que, comparées aux formes digalactosylées, la monosialylation n'a pas d'influence tandis que la disialylation diminue légèrement l'affinité. Cette différence démontre la complexité subtile de l'influence de la N-glycosylation des IgG et peut partiellement expliquer l'ambiguïté de la sialylation (pas d'effet vs effet négatif) (cf. Tableau annexe A - 1) (Dekkers et al., 2017; Shivatare et al., 2018; Subedi & Barb, 2016; Thomann et al., 2015; Wada et al., 2019).

Nous avons également mesuré l'influence de la N-glycosylation des IgG sur la réponse ADCC à partir de cellules Jurkat n'exprimant que le FcγRIIIa_{F158} ou le FcγRIIIa_{V158} à leurs surfaces. Les données obtenues avec cet essai cellulaire ont été en parfaite adéquation avec les affinités obtenues via notre essai SPR.

Par ailleurs, il est intéressant de constater que nos résultats obtenus pour le FcγRIIIa_{V158} sont en accord avec une étude récente comparant des glycoformes d'IgG homogènes obtenus par modification chimioenzymatique (Wada et al., 2019).

Analyse de l'influence des glycanes de FcγR

Après avoir évalué les effets du glycoprofil d'une IgG1 sur des formes recombinantes de FcγR non modifiés, nous avons décidé de mesurer l'influence de la N-glycosylation des FcγR. Comme précédemment, les études qui se sont penchées sur le sujet ont montré une certaine disparité que ce soit en termes d'objectif (mesure de l'influence de la macrohétérogénéité, de la microhétérogénéité ou analyse des profils de glycosylation) ou de conditions opératoires (cf. partie 2.4.3). De nouveau, ceci a mené à une variation des effets observés (cf. Table 6-1). Au vu de cette pluralité d'études, nous avons cherché à cristalliser l'ensemble par une double analyse conjointe des interactions via notre essai SPR :

- Analyse conjointe de la macrohétérogénéité et de la microhétérogénéité

Pour ce faire, nous avons d'abord muté les FcγR afin de retirer leurs sites de N-glycosylation, permettant ainsi une détermination très précise de l'effet de chaque glycanes des FcγR. Étant donné l'influence avérée des FcγRIIIa, nous nous sommes attardés sur l'effet du glycoprofil de chaque site de glycosylation du FcγRIIIa_{V158}. Pour cela, nous avons muté ce récepteur séquentiellement afin d'obtenir des mutants monoglycosylés (chacun possédant un des cinq sites de N-glycosylation). Nous avons ensuite modifié le glycoprofil des FcγR non mutés et des mutants de FcγRIIIa_{V158} monoglycosylés (inhibiteurs et remodelage *in vitro*) afin d'étudier l'effet global de certaines structures glycaniques ou de certains sucres puis l'effet spécifique des sites de N-glycosylation du FcγRIIIa.

- Analyse conjointe de l'influence de la N-glycosylation des FcγR et de l'IgG

Nous avons mesuré l'interaction de l'ensemble des glycoformes de FcγR (non mutés, mutés, non mutés/modifiés et mutés/modifiés) avec plusieurs glycoformes d'IgG. Ceci nous a permis de déterminer si les effets de certains glycoprofils d'IgG varient selon l'état de glycosylation des récepteurs. Nous avons choisi les trois glycoformes ayant montré le plus d'impact sur l'interaction avec les FcγR (c.-à-d., glycoformes enrichis en G0F, G2F ou G0).

De nouveau, la complexité des profils cinétiques ne nous a pas permis d'utiliser des modèles cinétiques pour l'obtention des affinités. Nous avons donc utilisé la méthode des plateaux pour obtenir les affinités et comparer les interactions des glycoformes de FcγR et d'IgG entre eux et avec les données de la littérature. Bien qu'avantageuse, cette méthode ne permet pas de tenir compte de la complexité des profils cinétiques, surtout dans le cas des FcγRIIIa. De plus, certaines

différences subtiles peuvent ne pas transparaître dans les affinités obtenues par la méthode des plateaux. C'est la raison pour laquelle nous avons accentué notre analyse avec la méthode de comparaison des profils cinétiques développée par Karlsson et collègues (cf. Chapitre 4) (Karlsson et al., 2016). L'utilisation combinée de ces deux méthodes d'analyse des données nous a permis de distinguer toutes les différences d'interaction.

L'analyse des données nous a permis d'observer que seuls les N-glycanes des FcγRIIIa_{F158/V158} ont un impact significatif sur l'interaction avec les glycoformes d'IgG1. Plus précisément, le glycane sur l'Asn-162 influence positivement l'affinité avec les IgG1 afucosylées tandis que le glycane sur l'Asn-45 présente un léger impact négatif pour tous les glycoformes d'IgG1. Finalement, lorsque le glycane sur l'Asn-162 du FcγRIIIa présente une structure oligomannosidique, l'affinité augmente pour les glycoformes d'IgG1. Par ailleurs, selon nos résultats, seul l'effet de l'afucosylation est dépendant de la glycosylation du FcγRIIIa et plus précisément du glycane sur l'Asn-162 (Ferrara et al., 2011; Mizushima et al., 2011). Finalement, nous avons pu observer que la complexité des profils cinétiques entre les FcγRIIIa et les formes fucosylées d'IgG1 disparaît en l'absence du glycane sur l'Asn-162. L'hypothèse, posée par plusieurs équipes, était que cette complexité est liée à l'hétérogénéité des glycoformes d'IgG (Dorion-Thibaudeau, 2016; Hayes et al., 2017). Nos résultats valident cette hypothèse et nous indiquent que la complexité des profils cinétiques de l'interaction FcγRIIIa / IgG fucosylée est liée à un faible pourcentage d'IgG afucosylée dans le mélange interagissant avec une plus forte affinité. Étant donné la fiabilité de notre essai SPR, ces résultats permettent d'éclaircir les effets de la N-glycosylation des FcγR parfois contradictoires dans la littérature (cf. Table 6-1). Ils fournissent également des informations précieuses sur l'influence complexe et forte de la N-glycosylation sur la liaison FcγR/IgG1 et permettent de comprendre l'impact des glycanes de FcγR sous leurs formes naturelles.

CHAPITRE 8 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

La caractérisation des impacts de la N-glycosylation des IgG et des FcγR sur leurs interactions est fondamentale pour le développement rationnel d'IgG thérapeutiques.

Dans ce contexte, nous avons apporté une contribution notable et originale en menant trois études approfondies qui nous ont permis de démêler la complexité et l'ambiguïté portant sur l'influence des glycanes des IgG et des FcγR.

Dans la première étude, un essai SPR basé sur l'immobilisation des FcγR via l'interaction superhélice a été développé. Une comparaison de méthodes nous a permis de constater que notre approche d'immobilisation surpasse les méthodes d'immobilisation les plus utilisées dans l'évaluation des interactions IgG/FcγR. Une analyse approfondie nous a permis de montrer que notre méthode dispose des caractéristiques suivantes :

- Immobilisation orientée
- Excellente régénération de la surface K5
 - ✓ La surface de K5 ne se détériore pas, permettant l'immobilisation d'un niveau de FcγR stable au cours des cycles et une durabilité élevée de la surface
 - ✓ Parfaite reproductibilité des sensogrammes et *in fine* des affinités calculées (fiabilité)
- Pas d'interaction non-spécifique des IgG sur la surface de K5
- Pas de gêne du E5 sur le FcγR, que ce soit sur la capture ou sur l'interaction avec l'IgG
- Stabilité de l'immobilisation du ligand sur la surface de K5
 - ✓ Pas d'artéfact en fin de phase d'injection
- Sensibilité
 - ✓ Peu de matériel (FcγR) nécessaire
- Affinité et profils cinétiques en accord avec la littérature :
 - ✓ Affinités de glycoformes d'IgG
 - ✓ Profils cinétiques d'interaction entre une IgG1 et des glycoformes de FcγRIIIa
 - ✓ Discrimination de profils cinétiques de plusieurs glycoformes d'IgG
- Peu coûteux (matériel, récepteur, réactif)
- Analyse rapide (moins d'étapes)

Cette méthode a été utilisée dans la suite du projet pour l'évaluation de l'influence de la N-glycosylation des IgG et des FcγR. Les résultats obtenus ont montré que cette méthode est

pertinente pour l'évaluation des glycanes d'IgG ainsi que des formes recombinantes de Fc γ R ayant des glycoprofiles similaires aux Fc γ R naturels. Cette méthode pourra donc contribuer à la prédiction des résultats physiologiques des AcM thérapeutiques.

Au-delà de cet outil, les résultats obtenus dans les deux dernières études de ce projet permettent de contribuer à l'avancement des connaissances dans le domaine de l'immunothérapie et plus particulièrement des AcM thérapeutiques liés aux Fc γ R.

Influence de la N-glycosylation des IgG

Le profil de glycosylation des IgG influence significativement l'interaction avec les Fc γ R et plus particulièrement les Fc γ RIIIa. Nos résultats nous ont permis de déterminer les effets suivants :

- La mesure des interactions par SPR montre que le profil glycanique des IgG possède une influence majeure sur l'interaction avec les Fc γ RIIIa, un impact mineur sur les interactions avec le Fc γ RIIa et le Fc γ RI et aucun effet mesurable sur l'interaction avec le Fc γ RIIb.
- L'absence de fucose mène à une augmentation importante de l'affinité uniquement pour les Fc γ RIIIa.
- La digalactosylation des glycanes d'IgG augmente légèrement l'affinité pour les Fc γ RIIIa, le Fc γ RIIa et le Fc γ RI.
- Par rapport aux profils digalactosylés, la mono- α 2,6-sialylation n'impacte pas l'affinité pour les Fc γ RIIIa tandis que la di- α 2,6-sialylation mène à une légère diminution de l'affinité.
- Les valeurs d'affinité obtenues avec notre essai SPR sont parfaitement traduites dans les réponses cellulaires observées dans l'essai d'activité ADCC.

Influence de la N-glycosylation des Fc γ R :

Le profil de glycosylation des Fc γ R, et plus particulièrement des Fc γ RIIIa, influence significativement l'interaction avec divers glycoformes d'IgG1. Nos résultats nous ont permis de souligner les effets suivants :

- Seuls les N-glycanes des Fc γ RIIIa ont un impact significatif sur l'interaction avec les IgG1.
- Le glycanes sur l'Asn162 des Fc γ RIIIa est essentielle pour la forte affinité avec les IgG1 afucosylées.
- Le glycanes sur l'Asn45 des Fc γ RIIIa impacte négativement l'affinité pour tous les glycoformes d'IgG1.
- Seul le glycoprofil des Fc γ RIIIa a un effet sur l'interaction avec les IgG1.

- L'affinité pour tous les glycoformes d'IgG1 est augmenté lorsque le glycanes sur l'Asn162 des FcγRIIIa présente une structure oligomannosidique.

Le projet de doctorat présentait toutefois certaines limitations et contraintes en termes de temps et de ressources. Certaines ont été prises en compte et surmontées. Pour les autres, nous présentons des recommandations :

Interactions monovalentes

Les méthodes biophysiques pour l'analyse d'interactions sont très avantageuses mais elles présentent une limitation inhérente à leur principe. En effet, l'analyse des interactions monovalentes entre un analyte injecté et un ligand immobilisé sur une surface est réducteur. Il est difficile d'évaluer si les différences observées en termes d'affinité ont une influence lors d'interactions multivalentes dues à l'opsonisation d'une cible à la surface d'une cellule immunitaire. Il est très probable que les affinités d'interaction mesurées avec un tel essai ne représentent pas entièrement les mêmes interactions dans un milieu plus complexe avec de multiples facteurs comme des anticorps concurrents. Afin de nous assurer que les différences observées par SPR soient représentatives d'une activité dans un milieu plus complexe, nous avons utilisé un essai cellulaire permettant la mesure de la réponse ADCC dépendante uniquement du FcγRIIIa.

La multivalence des interactions pourrait également être modélisée dans notre essai SPR soit en dimérisant les récepteurs ou encore en injectant des complexes immuns. Ceci pourrait mener à une meilleure compréhension de l'avidité sur la réponse immunitaire *in vivo*.

Hétérogénéité des glycanes d'IgG

L'une des principales limitations de certaines études est le manque d'homogénéité des glycanes des IgG. Ici, notre méthodologie basée sur une expression transitoire des glycosyltransférases a mené à une hétérogénéité des glycanes, proportionnelle au nombre d'enzymes coexprimées. Toutefois, cette approche nous a permis de générer rapidement des résultats conclusifs quant à l'influence de la glycosylation puisque nous nous sommes assurés d'obtenir des glycoformes d'IgG avec un enrichissement des profils glycaniques souhaités suffisant pour corréliser les effets observés aux glycoprofiles. Nous avons ainsi fait le choix de l'équilibre entre temps, coût, quantité et homogénéité.

La modification chimioenzymatique aurait permis de pallier cet inconvénient puisque cette méthode permet la synthèse de glycoformes homogènes. Il faut tout de même noter qu'il s'agit d'un traitement post-production nécessitant de nombreuses étapes et peu adapté à la production de grandes quantités d'IgG (Wada et al., 2019).

La synthèse de glycoformes homogènes d'IgG pourrait également être réalisée par un système acellulaire. En effet, cette méthode a déjà montré son potentiel pour la synthèse de l'érythropoïétine, une autre glycoprotéine thérapeutique (Gurramkonda et al., 2018; Zemella et al., 2018).

Caractérisation des glycanes de FcγR

Nous avons réalisé la caractérisation des glycoformes de FcγR avec des *lectin blots*. Cette méthode de caractérisation est rapide mais ne permet pas une caractérisation quantitative des glycoformes hétérogènes de FcγR. Cependant, nous avons choisi cette méthode en toute conscience puisque nous cherchions une analyse qualitative des modifications du glycoprofil effectuées et l'étude précédente nous avez montré que les *lectin blots* étaient efficace pour prouver les modifications effectuées. De plus, l'analyse quantitative par une méthode comme l'HILIC de certains FcγR non mutés modifiés aurait été difficiles car des études ont montré jusqu'à 30-40 glycoformes différents. Enfin, il aurait été techniquement difficile de réaliser ce genre d'analyse sur un nombre aussi élevé d'échantillons.

Enfin, dans la poursuite des travaux effectués selon les différents axes abordés dans ce doctorat, plusieurs voies nous semblent prometteuses :

Développement de nouveaux récepteurs et du C1q

Nos études ont porté sur un large panel de FcγR. Cependant, il serait intéressant d'appliquer notre méthode d'immobilisation basée sur l'interaction superhélice à d'autres ligands afin d'étudier finement leurs interactions avec divers glycoformes d'anticorps.

- **FcγRIIIb** : En effet, des études ont rapporté les effets de la N-glycosylation des IgG sur l'interaction avec le FcγRIIIb (Dekkers et al., 2017; Subedi & Barb, 2016). De plus, une étude a analysé les profils de glycosylation de FcγRIIIb soluble dans le sérum humain (Yagi et al., 2018). Nous pourrions donc déterminer l'influence de ces profils de glycosylation.

- **C1q** : Des études ont rapporté un effet positif de la galactosylation et de la sialylation des IgG sur leurs interactions avec le C1q et donc sur la CDC (Dekkers et al., 2017; Wada et al., 2019). Notre approche pourrait permettre de confirmer ces résultats et plus largement d'étudier l'influence de la glycosylation des IgG sur leurs interactions avec le C1q.
- **FcRn** : Étant donné qu'une augmentation de l'affinité de l'IgG pour le FcRn permet d'augmenter la demi-vie de l'anticorps et son efficacité (Abdiche et al., 2015), l'utilisation de notre approche permettrait une étude détaillée de l'effet de mutations ou de profils de glycosylation sur la demi-vie de l'IgG.
- **Antigène** : L'application de notre approche avec l'antigène pourrait permettre de déterminer si une modification ou un traitement de l'IgG affecte la liaison avec l'antigène.
- **Lectines** : L'analyse du profil de glycosylation via des *lectin blots* est peu précise. Ainsi, l'immobilisation de lectines sur la surface du biocapteur via notre approche permettrait d'analyser finement les profils glycaniques de glycoprotéines (Geuijen et al., 2015).

Variation de la température d'analyse SPR

Une variation de la température mène, dans la grande majorité des cas, à des différences cinétiques et thermodynamiques importantes dans le cas des interactions entre macromolécules. Les biocapteurs SPR dont nous disposons au laboratoire permettent de contrôler très finement la température d'analyse entre 5 à 45 °C. Cette capacité n'est que peu exploitée par les expérimentateurs. Elle est cependant très prometteuse dans notre cas. Plus précisément, il serait intéressant de varier la température d'analyse pour étudier les interactions entre IgG et FcγRIIIa afin d'amplifier les différences entre les profils cinétiques et plus particulièrement la phase de dissociation. Pour les récepteurs FcγRIIa et FcγRIIb, dont les cinétiques sont très rapides (trop rapides pour observer une quelconque différence entre IgG1 à 25°C), une baisse de température d'analyse est suggérée. Ainsi, il serait possible de ralentir les cinétiques des récepteurs FcγRIIa et FcγRIIb, mettant possiblement en évidence des différences d'interactions entre anticorps aux glycoprofiles différents. Si tel était le cas, FcγRIIa et FcγRIIb, dont la N-glycosylation est plus simple que les FcγRIIIa, auraient alors un intérêt analytique élevé. Inversement, la haute affinité du FcγRI (due notamment à la grande stabilité de l'interaction, c.-à-d., une faible constante cinétique de dissociation) ne permet de différencier les glycoformes d'IgG qu'en dissociant les complexes sur de longues périodes (une contrainte limitant grandement la capacité de criblage de

la méthode). Il serait dans ce cas intéressant de travailler à de plus hautes températures afin de déstabiliser l'interaction entre IgG1 et FcγRI.

Développement d'un essai SPR pour la mesure en ligne du profil de glycosylation des IgG

Ces dernières années, le développement de diverses techniques basées sur la spectrométrie de masse (Yang, X. et al., 2016), des techniques de séparation (Donczo et al., 2015; Reusch et al., 2014; Zauner, Deelder, & Wuhler, 2011) ou sur l'affinité des lectines (Onitsuka & Omasa, 2014; Shang et al., 2016; Zhang, L. et al., 2016) a permis une analyse structurale sensible et à haut débit (HTP) de la glycosylation. Cependant, l'état de glycosylation des anticorps est influencé par de nombreux facteurs, notamment les conditions d'opération utilisées lors des cultures et des étapes de purification (Costa et al., 2013; Fan, Y. et al., 2015; Ivarsson, Villiger, Morbidelli, & Soos, 2014; Sou et al., 2015). De plus, pendant les phases de développement et de mise à l'échelle d'un procédé de production d'anticorps, les changements de conditions opératoires mènent à des déviations non-souhaitées au niveau de la qualité du produit. Dans ce contexte, la capacité de suivre et de contrôler en ligne l'état de glycosylation des anticorps en cours de culture serait hautement souhaitable, et ce dans le but d'assurer l'obtention d'un profil glycanique le plus homogène possible. L'outil développé devrait permettre l'ajustement rationnel des conditions d'opération afin de maintenir la qualité du produit tout au long du développement, de la mise à l'échelle et lors de la production. Cependant, à ce jour, le contrôle en ligne n'a jamais été implanté dans l'industrie biopharmaceutique en raison du manque d'outils de mesure adaptés à cette fin. Le développement d'une approche analytique reposant sur l'utilisation d'un biocapteur SPR et l'immobilisation des FcγR avec l'interaction superhélice est une des solutions visant à combler ce manque. En effet, nous avons montré que l'utilisation de cette approche associée à l'utilisation des FcγR permettait de discriminer les glycoformes d'IgG (Cambay et al., 2019).

•

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., & Pillai, S. (2014). *Cellular and molecular immunology*: Elsevier Health Sciences.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., & Pillai, S. (2015). *Basic Immunology E-Book: Functions and Disorders of the Immune System*: Elsevier Health Sciences.
- Abdiche, Y. N., Yeung, Y. A., Chaparro-Riggers, J., Barman, I., Strop, P., Chin, S. M., . . . Lindquist, K. (2015). *The neonatal Fc receptor (FcRn) binds independently to both sites of the IgG homodimer with identical affinity*. Communication présentée à MABs (vol. 7, p. 331-343). doi:10.1080/19420862.2015.1008353
- Adamczyk, B., Tharmalingam-Jaikaran, T., Schomberg, M., Szekrényes, Á., Kelly, R. M., Karlsson, N. G., . . . Rudd, P. M. (2014). Comparison of separation techniques for the elucidation of IgG N-glycans pooled from healthy mammalian species. *Carbohydrate research*, 389, 174-185. doi:10.1016/j.carres.2014.01.018
- Aebi, M. (2013). N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta*, 1833(11), 2430-2437. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.04.001
- Aghamohseni, H., Ohadi, K., Spearman, M., Krahn, N., Moo-Young, M., Scharer, J. M., . . . Budman, H. M. (2014). Effects of nutrient levels and average culture pH on the glycosylation pattern of camelid-humanized monoclonal antibody. *Journal of biotechnology*, 186, 98-109. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.05.024
- Ahmad, A.-S., Olech, E., McClellan, J. E., & Kirchhoff, C. F. (2016). *Development of biosimilars*. Communication présentée à Seminars in arthritis and rheumatism (vol. 45, p. S11-S18). doi:10.1016/j.semarthrit.2016.01.002
- Ahmed, A. A., Giddens, J., Pincetic, A., Lomino, J. V., Ravetch, J. V., Wang, L.-X., & Bjorkman, P. J. (2014). Structural characterization of anti-inflammatory immunoglobulin G Fc proteins. *J. Mol. Biol.*, 426(18), 3166-3179. doi:10.1016/j.jmb.2014.07.006
- Aich, U., Lakbub, J., & Liu, A. (2016). State of the art technologies for rapid and high-throughput sample preparation and analysis of n-glycans from antibodies. *Electrophoresis*. doi:10.1002/elps.201500551
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., & Hemmings, B. A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.*, 15(23), 6541-6551. doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb01045.x
- Ambrosi, M., Cameron, N. R., & Davis, B. G. (2005). Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Organic & biomolecular chemistry*, 3(9), 1593-1608. doi:10.1039/B414350G
- Andersen, D. C., & Krummen, L. (2002). Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current opinion in biotechnology*, 13(2), 117-123. doi:10.1016/S0958-1669(02)00300-2
- Anderson, C. L., Ganesan, L. P., & Robinson, J. M. (2015). The biology of the classical Fcγ receptors in non-hematopoietic cells. *Immunological reviews*, 268(1), 236-240. doi:10.1111/imr.12335

- Anthony, R. M., Nimmerjahn, F., Ashline, D. J., Reinhold, V. N., Paulson, J. C., & Ravetch, J. V. (2008). A recombinant IgG Fc that recapitulates the anti-inflammatory activity of IVIG. *Science*, 320(5874), 373. doi:10.1126/science.1154315
- Anthony, R. M., & Ravetch, J. V. (2010). A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. *Journal of clinical immunology*, 30(1), 9-14. doi:10.1007/s10875-010-9405-6
- Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M., & Dwek, R. A. (2007). The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 21-50. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702
- Asaoka, Y., Hatayama, K., Ide, T., Tsumoto, K., & Tomita, M. (2013). The binding of soluble recombinant human Fc γ receptor I for human immunoglobulin G is conferred by its first and second extracellular domains. *Molecular immunology*, 54(3-4), 403-407. doi:10.1016/j.molimm.2013.01.007
- Barb, A. W., Meng, L., Gao, Z., Johnson, R. W., Moremen, K. W., & Prestegard, J. H. (2012). NMR characterization of immunoglobulin G Fc glycan motion on enzymatic sialylation. *Biochemistry*, 51(22), 4618-4626. doi:10.1021/bi300319q
- Beck, A., Wurch, T., Bailly, C., & Corvaia, N. (2010). Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol*, 10(5), 345-352. doi:10.1038/nri2747
- Biacore, A. (2003). Biacore sensor surface handbook. *GE Healthcare Bio-Sciences AB: Uppsala, Sweden*.
- Bigge, J. C., Patel, T. P., Bruce, J. A., Goulding, P. N., Charles, S. M., & Parekh, R. B. (1995). Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Anal. biochem.*, 230(2), 229-238. doi:10.1006/abio.1995.1468
- Bischoff, J., Liscum, L., & Kornfeld, R. (1986). The use of 1-deoxymannojirimycin to evaluate the role of various alpha-mannosidases in oligosaccharide processing in intact cells. *Journal of Biological Chemistry*, 261(10), 4766-4774.
- Boisseau, P., & Lahmani, M. (2009). *Nanoscience: Nanobiotechnology and nanobiology*: Springer Science & Business Media.
- 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. *Biotechnology progress*, 21(1), 17-21. doi:10.1021/bp049825t
- Borys, M. C., Dalal, N. G., Abu-Absi, N. R., Khattak, S. F., Jing, Y., Xing, Z., & Li, Z. J. (2010). Effects of culture conditions on N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) content of a recombinant fusion protein produced in CHO cells. *Biotechnology and bioengineering*, 105(6), 1048-1057. doi:10.1002/bit.22644
- Boucher, C., Ruiz, J.-C., Thibault, M., Buschmann, M. D., Wertheimer, M. R., Jolicoeur, M., . . . De Crescenzo, G. (2010). Human corneal epithelial cell response to epidermal growth factor tethered via coiled-coil interactions. *Biomaterials*, 31(27), 7021-7031. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.072

- Boucher, C., St-Laurent, G., Jolicoeur, M., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2010). Protein detection by Western blot via coiled–coil interactions. *Analytical biochemistry*, 399(1), 138-140. doi:10.1016/j.ab.2009.12.007
- Boucher, C., St-Laurent, G., Loignon, M., Jolicoeur, M., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2008). The bioactivity and receptor affinity of recombinant tagged EGF designed for tissue engineering applications is defined by the nature and position of the tags. *Tissue Eng Part A*, 14(12), 2069-2077. doi:10.1089/ten.tea.2008.0037
- Bournazos, S., Hart, S. P., Chamberlain, L. H., Glennie, M. J., & Dransfield, I. (2009). Association of FcγRIIa (CD32a) with lipid rafts regulates ligand binding activity. *The Journal of Immunology*, 182(12), 8026-8036. doi:10.4049/jimmunol.0900107
- Boyd, P. N., Lines, A. C., & Patel, A. K. (1995). The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of Campath-1H. *Molecular immunology*, 32(17-18), 1311-1318. doi:10.1016/0161-5890(95)00118-2
- Branden, C., & Tooze, J. (1991). Alpha/beta structures. *Introduction to Protein Structure*, 43-57.
- Brooks, S. A. (2009). Protein glycosylation: the basic science. *Post-translational modification of protein biopharmaceuticals*, 15-49. doi:10.1002/9783527626601.ch2
- Bruggeman, C. W., Dekkers, G., Bentlage, A. E. H., Treffers, L. W., Nagelkerke, S. Q., Lissenberg-Thunnissen, S., . . . Rispen, T. (2017). Enhanced effector functions due to antibody defucosylation depend on the effector cell Fcγ receptor profile. *The Journal of Immunology*, 1700116. doi:10.4049/jimmunol.1700116
- Brühlmann, D., Muhr, A., Parker, R., Vuillemin, T., Bucsella, B., Kalman, F., . . . Haas, T. (2017). Cell culture media supplemented with raffinose reproducibly enhances high mannose glycan formation. *Journal of biotechnology*, 252, 32-42. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.04.026
- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D. A., Fernandez, N., Jorieux, S., & Daëron, M. (2009). Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, 113(16), 3716-3725. doi:10.1182/blood-2008-09-179754
- Burleigh, S. C., van de Laar, T., Stroop, C. J., van Grunsven, W. M. J., O'Donoghue, N., Rudd, P. M., & Davey, G. P. (2011). Synergizing metabolic flux analysis and nucleotide sugar metabolism to understand the control of glycosylation of recombinant protein in CHO cells. *BMC biotechnology*, 11(1), 1. doi:10.1186/1472-6750-11-95
- Buss, N. A. P. S., Henderson, S. J., McFarlane, M., Shenton, J. M., & de Haan, L. (2012). Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Current opinion in pharmacology*, 12(5), 615-622. doi:10.1016/j.coph.2012.08.001
- Butler, M. (2006). Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. *Cytotechnology*, 50(1-3), 57-76. doi:10.1007/s10616-005-4537-x
- Butler, M. (2009). Mammalian cell lines and glycosylation: a case study. *Post-translational Modification of Protein Biopharmaceuticals*, 51-77. doi:10.1002/9783527626601.ch3
- Butler, M., & Spearman, M. (2014). The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Curr Opin Biotechnol*, 30, 107-112. doi:10.1016/j.copbio.2014.06.010

- Bynum, M. A., Yin, H., Felts, K., Lee, Y. M., Monell, C. R., & Killeen, K. (2009). Characterization of IgG N-glycans employing a microfluidic chip that integrates glycan cleavage, sample purification, LC separation, and MS detection. *Analytical chemistry*, 81(21), 8818-8825. doi:10.1021/ac901326u
- Cambay, F., Henry, O., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2019). Impact of N-glycosylation on Fcγ receptor / IgG interactions: unravelling differences with an enhanced surface plasmon resonance biosensor assay based on coiled-coil interactions. *MAbs*, 11(3), 435-452. doi:10.1080/19420862.2019.1581017
- Campbell, I. K., Miescher, S., Branch, D. R., Mott, P. J., Lazarus, A. H., Han, D., . . . Leontyev, D. (2014). Therapeutic effect of IVIG on inflammatory arthritis in mice is dependent on the Fc portion and independent of sialylation or basophils. *The Journal of Immunology*, 192(11), 5031-5038. doi:10.4049/jimmunol.1301611
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., & Watier, H. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*, 99(3), 754-758. doi:10.1182/blood.V99.3.754
- Cassard, L., Cohen-Solal, J., Camilleri-Broet, S., Fournier, E., Fridman, W. H., & Sautes-Fridman, C. (2006). Fc gamma receptors and cancer. *Springer Seminars in Immunopathology*, 28(4), 321-328. doi:10.1007/s00281-006-0058-8
- Chan, K. F., Shahreel, W., Wan, C., Teo, G., Hayati, N., Tay, S. J., . . . Zhang, P. (2016). Inactivation of GDP-fucose transporter gene (Slc35c1) in CHO cells by ZFNs, TALENs and CRISPR-Cas9 for production of fucose-free antibodies. *Biotechnology journal*, 11(3), 399-414. doi:10.1002/biot.201500331
- Chang, V. T., Crispin, M., Aricescu, A. R., Harvey, D. J., Nettleship, J. E., Fennelly, J. A., . . . Stuart, D. I. (2007). Glycoprotein structural genomics: solving the glycosylation problem. *Structure*, 15(3), 267-273. doi:10.1016/j.str.2007.01.011
- Chao, H., Bautista, D. L., Litowski, J., Irvin, R. T., & Hodges, R. S. (1998). Use of a heterodimeric coiled-coil system for biosensor application and affinity purification. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 715(1), 307-329. doi:10.1016/S0378-4347(98)00172-8
- Chao, H., Houston, M. E., Grothe, S., Kay, C. M., O'Connor-McCourt, M., Irvin, R. T., & Hodges, R. S. (1996). Kinetic study on the formation of a de novo designed heterodimeric coiled-coil: use of surface plasmon resonance to monitor the association and dissociation of polypeptide chains. *Biochemistry*, 35(37), 12175-12185. doi:10.1021/bi9530604
- Chavane, N., Jacquemart, R., Hoemann, C. D., Jolicoeur, M., & De Crescenzo, G. (2008). At-line quantification of bioactive antibody in bioreactor by surface plasmon resonance using epitope detection. *Analytical biochemistry*, 378(2), 158-165. doi:10.1016/j.ab.2008.04.019
- Chen, P., & Harcum, S. W. (2006). Effects of elevated ammonium on glycosylation gene expression in CHO cells. *Metabolic Engineering*, 8(2), 123-132. doi:10.1016/j.ymben.2005.10.002

- Chowdhury, D., & Lieberman, J. (2008). Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annual review of immunology*, 26, 389. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090404
- Chu, S. Y., Vostiar, I., Karki, S., Moore, G. L., Lazar, G. A., Pong, E., . . . Desjarlais, J. R. (2008). Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and Fc γ RIIb with Fc-engineered antibodies. *Molecular immunology*, 45(15), 3926-3933. doi:10.1016/j.molimm.2008.06.027
- Chung, C. Y., Wang, Q., Yang, S., Ponce, S. A., Kirsch, B. J., Zhang, H., & Betenbaugh, M. J. (2017). Combinatorial genome and protein engineering yields monoclonal antibodies with hypergalactosylation from CHO cells. *Biotechnology and bioengineering*, 114(12), 2848-2856. doi:10.1002/bit.26375
- Chung, C. Y., Wang, Q., Yang, S., Yin, B., Zhang, H., & Betenbaugh, M. (2017). Integrated genome and protein editing swaps α -2, 6 sialylation for α -2, 3 sialic acid on recombinant antibodies from CHO. *Biotechnology journal*, 12(2), 1600502. doi:10.1002/biot.201600502
- Chung, S., Quarmby, V., Gao, X., Ying, Y., Lin, L., Reed, C., . . . Shen, A. (2012). Quantitative evaluation of fucose reducing effects in a humanized antibody on Fc γ receptor binding and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activities. *MAbs*, 4(3), 326-340. doi:10.4161/mabs.19941
- Clincke, M. F., Guedon, E., & Goergen, J.-L. (2011). Procédés biotechnologiques pour la production de protéines recombinantes à usage thérapeutiques: vers une maîtrise de la glycosylation.
- Cohen-Solal, J. L. F., Cassard, L., Fridman, W. H., & Sautes-Fridman, C. (2004). Fc gamma receptors. *Immunology Letters*, 92(3), 199-205. doi:10.1016/j.imlet.2004.01.012
- Cosgrave, E. F. J., Struwe, W. B., Hayes, J. M., Harvey, D. J., Wormald, M. R., & Rudd, P. M. (2013). N-linked glycan structures of the human Fc γ receptors produced in NS0 cells. *J. Proteome Res.*, 12(8), 3721-3737. doi:10.1021/pr400344h
- Costa, A. R., Withers, J., Rodrigues, M. E., McLoughlin, N., Henriques, M., Oliveira, R., . . . Azeredo, J. (2013). The impact of cell adaptation to serum-free conditions on the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by Chinese hamster ovary cells. *N Biotechnol*, 30(5), 563-572. doi:10.1016/j.nbt.2012.12.002
- Cox, K. M., Sterling, J. D., Regan, J. T., Gasdaska, J. R., Frantz, K. K., Peele, C. G., . . . Srinivasan, M. (2006). Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. *Nature biotechnology*, 24(12), 1591. doi:10.1038/nbt1260
- Crowell, C. K., Grampp, G. E., Rogers, G. N., Miller, J., & Scheinman, R. I. (2007). Amino acid and manganese supplementation modulates the glycosylation state of erythropoietin in a CHO culture system. *Biotechnology and bioengineering*, 96(3), 538-549. doi:10.1002/bit.21141
- Daëron, M. (2014). Fc receptors as adaptive immunoreceptors. Dans *Fc Receptors* (p. 131-164): Springer.

- Dashivets, T., Thomann, M., Rueger, P., Knaupp, A., Buchner, J., & Schlothauer, T. (2015). Multi-angle effector function analysis of human monoclonal IgG glycovariants. *PLoS one*, 10(12), e0143520. doi:10.1371/journal.pone.0143520
- Davies, J., Jiang, L. Y., Pan, L. Z., LaBarre, M. J., Anderson, D., & Reff, M. (2001). Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for Fc gamma RIII. *Biotechnology and Bioengineering*, 74(4), 288-294. doi:10.1002/bit.1119
- De Crescenzo, G., Boucher, C., Durocher, Y., & Jolicoeur, M. (2008). Kinetic characterization by surface plasmon resonance-based biosensors: principle and emerging trends. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 1(4), 204-215. doi:10.1007/s12195-008-0035-5
- De Crescenzo, G., Litowski, J. R., Hodges, R. S., & O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. *Biochemistry*, 42(6), 1754-1763. doi:10.1021/bi0268450
- De Crescenzo, G., Pham, P. L., Durocher, Y., Chao, H., & O'Connor-McCourt, M. D. (2004). Enhancement of the antagonistic potency of transforming growth factor- β receptor extracellular domains by coiled coil-induced homo- and heterodimerization. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26013-26018. doi:10.1074/jbc.M400655200
- De Crescenzo, G., Pham, P. L., Durocher, Y., & O'Connor-McCourt, M. D. (2003). Transforming growth factor-beta (TGF- β) binding to the extracellular domain of the type II TGF- β receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding. *Journal of molecular biology*, 328(5), 1173-1183. doi:10.1016/S0022-2836(03)00360-7
- De Muynck, B., Navarre, C., & Boutry, M. (2010). Production of antibodies in plants: status after twenty years. *Plant biotechnology journal*, 8(5), 529-563. doi:10.1111/j.1467-7652.2009.00494.x
- De Pourcq, K., De Schutter, K., & Callewaert, N. (2010). Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(5), 1617-1631. doi:10.1007/s00253-010-2721-1
- Dekkers, G., Plomp, R., Koeleman, C. A., Visser, R., von Horsten, H. H., Sandig, V., . . . Vidarsson, G. (2016). Multi-level glyco-engineering techniques to generate IgG with defined Fc-glycans. *Sci. Rep.*, 6, 36964. doi:10.1038/srep36964
- Dekkers, G., Treffers, L., Plomp, R., Bentlage, A. E. H., de Boer, M., Koeleman, C. A. M., . . . Vidarsson, G. (2017). Decoding the Human Immunoglobulin G-Glycan Repertoire Reveals a Spectrum of Fc-Receptor- and Complement-Mediated-Effector Activities. *Front. Immunol.*, 8, 877. doi:10.3389/fimmu.2017.00877
- del Val, I. J., Kontoravdi, C., & Nagy, J. M. (2010). Towards the implementation of quality by design to the production of therapeutic monoclonal antibodies with desired glycosylation patterns. *Biotechnol Prog*, 26(6), 1505-1527. doi:10.1002/btpr.470
- Desjarlais, J. R., & Lazar, G. A. (2011). Modulation of antibody effector function. *Experimental Cell Research*, 317(9), 1278-1285. doi:10.1016/j.yexcr.2011.03.018

- Donczó, B., Szigeti, M., Ostoros, G., Gacs, A., Tovari, J., & Guttman, A. (2015). N-Glycosylation analysis of formalin fixed paraffin embedded samples by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. doi:10.1002/elps.201500446
- Dorion-Thibaudéau, J. (2016). *Études des interactions entre les immunoglobulines G et leurs récepteurs Fc gamma afin d'évaluer le patron de glycosylation des anticorps*. (École Polytechnique de Montréal). Tiré de <https://publications.polymtl.ca/2064/>
- Dorion-Thibaudéau, J., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2017). Quantification and simultaneous evaluation of the bioactivity of antibody produced in CHO cell culture—The use of the ectodomain of FcγRI and surface plasmon resonance-based biosensor. *Molecular immunology*, 82, 46-49. doi:10.1016/j.molimm.2016.12.017
- Dorion-Thibaudéau, J., Raymond, C., Lattova, E., Perreault, H., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2014). Towards the development of a surface plasmon resonance assay to evaluate the glycosylation pattern of monoclonal antibodies using the extracellular domains of CD16a and CD64. *J. Immunol. Methods*, 408, 24-34. doi:10.1016/j.jim.2014.04.010
- Dorion-Thibaudéau, J., St-Laurent, G., Raymond, C., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2016). Biotinylation of the Fc gamma receptor ectodomains by mammalian cell co-transfection: application to the development of a surface plasmon resonance-based assay. *J. Mol. Recognit.*, 29(2), 60-69. doi:10.1002/jmr.2495
- Durocher, Y., & Butler, M. (2009). Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6), 700-707. doi:10.1016/j.copbio.2009.10.008
- Durocher, Y., Perret, S., & Kamen, A. (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.*, 30(2), E9. doi:10.1093/nar/30.2.e9
- 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
- Edberg, J. C., Barinsky, M., Redecha, P. B., Salmon, J. E., & Kimberly, R. P. (1990). Fc gamma RIII expressed on cultured monocytes is a N-glycosylated transmembrane protein distinct from Fc gamma RIII expressed on natural killer cells. *The Journal of Immunology*, 144(12), 4729-4734.
- Edberg, J. C., & Kimberly, R. P. (1997). Cell type-specific glycoforms of Fc gamma RIIIa (CD16): differential ligand binding. *J. Immunol.*, 159(8), 3849-3857. Tiré de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9378972>
- Ehret, J., Zimmermann, M., Eichhorn, T., & Zimmer, A. (2019). Impact of cell culture media additives on IgG glycosylation produced in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 116(4), 816-830. doi:10.1002/bit.26904
- Elvin, J. G., Couston, R. G., & van der Walle, C. F. (2013). Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *International journal of pharmaceutics*, 440(1), 83-98. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.12.039
- Fairbanks, A. J. (2018). Synthetic and semi-synthetic approaches to unprotected N-glycan oxazolines. *Beilstein journal of organic chemistry*, 14(1), 416-429. doi:10.3762/bjoc.14.30

- Falconer, D. J., Subedi, G. P., Marcella, A. M., & Barb, A. W. (2018). Antibody Fucosylation Lowers the FcγRIIIa/CD16a Affinity by Limiting the Conformations Sampled by the N162-Glycan. *ACS Chem. Biol.*, 13(8), 2179-2189. doi:10.1021/acscchembio.8b00342
- Fan, S.-Q., Huang, W., & Wang, L.-X. (2012). Remarkable transglycosylation activity of glycosynthase mutants of endo-D, an endo-β-N-acetylglucosaminidase from *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(14), 11272-11281. doi:10.1074/jbc.M112.340497
- 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
- Fanger, N. A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T. F., & Guyre, P. M. (1996). Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 157(2), 541-548.
- Ferrara, C., Brunker, P., Suter, T., Moser, S., Puntener, U., & Umana, P. (2006). Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous beta1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi alpha-mannosidase II. *Biotechnol Bioeng*, 93(5), 851-861. doi:10.1002/bit.20777
- Ferrara, C., Grau, S., Jager, C., Sondermann, P., Brunker, P., Waldhauer, I., . . . Benz, J. (2011). Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγRIII and antibodies lacking core fucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(31), 12669-12674. doi:10.1073/pnas.1108455108
- Ferrara, C., Stuart, F., Sondermann, P., Brunker, P., & Umana, P. (2006). The carbohydrate at FcγRIIIa Asn-162. An element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms. *J. Biol. Chem.*, 281(8), 5032-5036. doi:10.1074/jbc.M510171200
- Foddy, L., & Hughes, R. C. (1988). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides in baby hamster kidney cells treated with castanospermine, an inhibitor of processing glucosidases. *European journal of biochemistry*, 175(2), 291-299. doi:10.1111/j.1432-1033.1988.tb14196.x
- Forthal, D. N., Gach, J. S., Landucci, G., Jez, J., Strasser, R., Kunert, R., & Steinkellner, H. (2010). Fc-glycosylation influences Fcγ receptor binding and cell-mediated anti-HIV activity of monoclonal antibody 2G12. *The Journal of Immunology*, 1002600. doi:10.4049/jimmunol.1002600
- Fortier, C., De Crescenzo, G., & Durocher, Y. (2013). A versatile coiled-coil tethering system for the oriented display of ligands on nanocarriers for targeted gene delivery. *Biomaterials*, 34(4), 1344-1353. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.10.047
- Frank, M., Walker, R. C., Lanzilotta, W. N., Prestegard, J. H., & Barb, A. W. (2014). Immunoglobulin G1 Fc domain motions: implications for Fc engineering. *J. Mol. Biol.*, 426(8), 1799-1811. doi:10.1016/j.jmb.2014.01.011
- Galon, J., Robertson, M. W., Galinha, A., Mazières, N., Spagnoli, R., Fridman, W. H., & Sautès, C. (1997). Affinity of the interaction between Fcγ receptor type III (FcγRIII) and

- monomeric human IgG subclasses. Role of FcγRIII glycosylation. *European journal of immunology*, 27(8), 1928-1932. doi:10.1002/eji.1830270816
- Gan, S. D., & Patel, K. R. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), 1-3. doi:10.1038/jid.2013.287
- Garcia-Vallejo, J. J., & van Kooyk, Y. (2013). The physiological role of DC-SIGN: a tale of mice and men. *Trends in immunology*, 34(10), 482-486. doi:10.1016/j.it.2013.03.001
- Gawlitsek, M., Estacio, M., Fürch, T., & Kiss, R. (2009). Identification of cell culture conditions to control N-glycosylation site-occupancy of recombinant glycoproteins expressed in CHO cells. *Biotechnology and bioengineering*, 103(6), 1164-1175. doi:10.1002/bit.22348
- Geisler, C., & Jarvis, D. (2009). Insect cell glycosylation patterns in the context of biopharmaceuticals. *Post-translational Modification of Protein Biopharmaceuticals*, 165-191. doi:10.1002/9783527626601.ch7
- Geuijen, K. P. M., Halim, L. A., Schellekens, H., Schasfoort, R. B., Wijffels, R. H., & Eppink, M. H. (2015). Label-Free Glycoprofiling with Multiplex Surface Plasmon Resonance: A Tool To Quantify Sialylation of Erythropoietin. *Analytical Chemistry*, 87(16), 8115-8122. doi:10.1021/acs.analchem.5b00870
- Gilar, M., Yu, Y.-Q., Ahn, J., Xie, H., Han, H., Ying, W., & Qian, X. (2011). Characterization of glycoprotein digests with hydrophilic interaction chromatography and mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 417(1), 80-88. doi:10.1016/j.ab.2011.05.028
- Goetze, A. M., Liu, Y. D., Zhang, Z., Shah, B., Lee, E., Bondarenko, P. V., & Flynn, G. C. (2011). High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans. *Glycobiology*, 21(7), 949-959. doi:10.1093/glycob/cwr027
- Gomord, V., Fitchette, A. C., Menu-Bouaouiche, L., Saint-Jore-Dupas, C., Plasson, C., Michaud, D., & Faye, L. (2010). Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant biotechnology journal*, 8(5), 564-587. doi:10.1111/j.1467-7652.2009.00497.x
- Gramer, M. J., Eckblad, J. J., Donahue, R., Brown, J., Shultz, C., Vickerman, K., . . . van Berkel, P. H. C. (2011). Modulation of antibody galactosylation through feeding of uridine, manganese chloride, and galactose. *Biotechnology and bioengineering*, 108(7), 1591-1602. doi:10.1002/bit.23075
- Gramer, M. J., Goochee, C. F., Chock, V. Y., Brousseau, D. T., & Sliwkowski, M. B. (1995). Removal of sialic acid from a glycoprotein in CHO cell culture supernatant by action of an extracellular CHO cell sialidase. *Bio/technology*, 13(7), 692. doi:10.1038/nbt0795-692
- Green, E. D., Adelt, G., Baenziger, J. U., Wilson, S., & Van Halbeek, H. (1988). The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. Structural analysis of N-glycanase-released oligosaccharides by 500-megahertz ¹H NMR spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 263(34), 18253-18268.
- Grilo, A. L., & Mantalaris, A. (2019). The increasingly human and profitable monoclonal antibody market. *Trends in biotechnology*, 37(1), 9-16. doi:10.1016/j.tibtech.2018.05.014

- Grodzki, A. C., & Berenstein, E. (2010). Antibody purification: affinity chromatography–protein A and protein G Sepharose. *Immunocytochemical Methods and Protocols*, 33-41. doi:10.1007/978-1-59745-324-0_5
- Gross, V., Tran-Thi, T. A., Schwarz, R. T., Elbein, A. D., Decker, K., & Heinrich, P. C. (1986). Different effects of the glucosidase inhibitors 1-deoxynojirimycin, N-methyl-1-deoxynojirimycin and castanospermine on the glycosylation of rat α 1-proteinase inhibitor and α 1-acid glycoprotein. *Biochemical Journal*, 236(3), 853-860. doi:10.1042/bj2360853
- Gu, X., & Wang, D. I. C. (1998). Improvement of interferon- γ sialylation in Chinese hamster ovary cell culture by feeding of N-acetylmannosamine. *Biotechnology and bioengineering*, 58(6), 642-648. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19980620)58:6<642::AID-BIT10>3.0.CO;2-9
- Gurramkonda, C., Rao, A., Borhani, S., Pilli, M., Deldari, S., Ge, X., . . . Rao, G. (2018). Improving the recombinant human erythropoietin glycosylation using microsome supplementation in CHO cell-free system. *Biotechnol Bioeng*, 115(5), 1253-1264. doi:10.1002/bit.26554
- Ha, S., Ou, Y., Vlasak, J., Li, Y., Wang, S., Vo, K., . . . Zhang, N. (2011). Isolation and characterization of IgG1 with asymmetrical Fc glycosylation. *Glycobiology*, 21(8), 1087-1096. doi:10.1093/glycob/cwr047
- Hamilton, R. G. (1987). Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. *Clinical chemistry*, 33(10), 1707-1725.
- Hanson, Q. M., & Barb, A. W. (2015). A perspective on the structure and receptor binding properties of immunoglobulin G Fc. *Biochemistry*, 54(19), 2931-2942. doi:10.1021/acs.biochem.5b00299
- Haryadi, R., Zhang, P., Chan, K. F., & Song, Z. (2013). CHO-gmt5, a novel CHO glycosylation mutant for producing afucosylated and asialylated recombinant antibodies. *Bioengineered*, 4(2), 90-94. doi:10.4161/bioe.22262
- Hayes, J. M., Cosgrave, E. F., Struwe, W. B., Wormald, M., Davey, G. P., Jefferis, R., & Rudd, P. M. (2014). Glycosylation and Fc receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 382, 165-199. doi:10.1007/978-3-319-07911-0_8
- Hayes, J. M., Frostell, A., Cosgrave, E. F., Struwe, W. B., Potter, O., Davey, G. P., . . . Rudd, P. M. (2014). Fc gamma receptor glycosylation modulates the binding of IgG glycoforms: a requirement for stable antibody interactions. *J. Proteome Res.*, 13(12), 5471-5485. doi:10.1021/pr500414q
- Hayes, J. M., Frostell, A., Karlsson, R., Muller, S., Martin, S. M., Pauers, M., . . . Rudd, P. M. (2017). Identification of Fc Gamma Receptor Glycoforms That Produce Differential Binding Kinetics for Rituximab. *Mol. Cell. Proteomics*, 16(10), 1770-1788. doi:10.1074/mcp.M117.066944
- Hayes, J. M., Wormald, M. R., Rudd, P. M., & Davey, G. P. (2016). Fc gamma receptors: glycobiology and therapeutic prospects. *J. Inflamm. Res.*, 9, 209-219. doi:10.2147/JIR.S121233
- Healthcare, G. (2012). Biacore™ Assay Handbook. *General Electric Company: Boston, MA, USA*.
- Higel, F., Seidl, A., Sörgel, F., & Friess, W. (2016). N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc

- fusion proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. doi:10.1016/j.ejpb.2016.01.005
- Hill, D. R., Aumiller, J. J., Shi, X., & Jarvis, D. L. (2006). Isolation and analysis of a baculovirus vector that supports recombinant glycoprotein sialylation by SfSWT-1 cells cultured in serum-free medium. *Biotechnology and bioengineering*, 95(1), 37-47. doi:10.1002/bit.20945
- Hodoniczky, J., Zheng, Y. Z., & James, D. C. (2005). Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling in vitro. *Biotechnology progress*, 21(6), 1644-1652. doi:10.1021/bp050228w
- Hogarth, P. M., & Pietersz, G. A. (2012). Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nature reviews Drug discovery*, 11(4), 311-331. doi:10.1038/nrd2909
- Hollister, J., Conradt, H., & Jarvis, D. L. (2003). Evidence for a sialic acid salvaging pathway in lepidopteran insect cells. *Glycobiology*, 13(6), 487-495. doi:10.1093/glycob/cwg053
- Hong, J. K., Cho, S. M., & Yoon, S. K. (2010). Substitution of glutamine by glutamate enhances production and galactosylation of recombinant IgG in Chinese hamster ovary cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 88(4), 869-876. doi:10.1007/s00253-010-2790-1
- Hossler, P., Khattak, S. F., & Li, Z. J. (2009). Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology*, 19(9), 936-949. doi:10.1093/glycob/cwp079
- Hossler, P., McDermott, S., Racicot, C., Chumsae, C., Raharimampionona, H., Zhou, Y., . . . Fann, J. (2014). Cell culture media supplementation of uncommonly used sugars sucrose and tagatose for the targeted shifting of protein glycosylation profiles of recombinant protein therapeutics. *Biotechnology progress*, 30(6), 1419-1431. doi:10.1002/btpr.1968
- Houde, D., Peng, Y., Berkowitz, S. A., & Engen, J. R. (2010). Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *Mol. Cell. Proteomics*, 9(8), 1716-1728. doi:10.1074/mcp.M900540-MCP200
- Hristodorov, D., Fischer, R., & Linden, L. (2013). With or without sugar? (A)glycosylation of therapeutic antibodies. *Mol Biotechnol*, 54(3), 1056-1068. doi:10.1007/s12033-012-9612-x
- Huang, W., Giddens, J., Fan, S.-Q., Toonstra, C., & Wang, L.-X. (2012). Chemoenzymatic glycoengineering of intact IgG antibodies for gain of functions. *Journal of the American Chemical Society*, 134(29), 12308-12318. doi:10.1021/ja3051266
- Hulett, M. D., & Hogarth, P. M. (1998). The second and third extracellular domains of FcγRI (CD64) confer the unique high affinity binding of IgG2a. *Molecular immunology*, 35(14), 989-996. doi:10.1016/S0161-5890(98)00069-8
- Indik, Z. K., Park, J.-G., Hunter, S., & Schreiber, A. D. (1995). The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood*, 86(12), 4389-4399.
- Ivarsson, M., Villiger, T. K., Morbidelli, M., & Soos, M. (2014). Evaluating the impact of cell culture process parameters on monoclonal antibody N-glycosylation. *J Biotechnol*, 188C, 88-96. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.08.026

- Jacquemart, R., Chavane, N., Durocher, Y., Hoemann, C. D., De Crescenzo, G., & Jolicoeur, M. (2008). At-line monitoring of bioreactor protein production by surface plasmon resonance. *Biotechnology and bioengineering*, 100(1), 184-188. doi:10.1002/bit.21725
- Jedrzejewski, P. M., del Val, I. J., Polizzi, K. M., & Kontoravdi, C. (2013). Applying quality by design to glycoprotein therapeutics: experimental and computational efforts of process control. *Pharmaceutical Bioprocessing*, 1(1), 51-69. doi:10.4155/pbp.13.4
- Jefferis, R. (2005). Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnology Progress*, 21(1), 11-16. doi:10.1021/bp040016j
- Jefferis, R. (2007). Antibody therapeutics: isotype and glycoform selection. *Expert Opin Biol Ther*, 7(9), 1401-1413. doi:10.1517/14712598.7.9.1401
- Jefferis, R. (2009a). Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 8(3), 226-234. doi:10.1038/nrd2804
- Jefferis, R. (2009b). Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends Pharmacol. Sci.*, 30(7), 356-362. doi:10.1016/j.tips.2009.04.007
- Jefferis, R. (2010). The antibody paradigm: present and future development as a scaffold for biopharmaceutical drugs. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 26, 1-42. doi:10.5661/bger-26-1
- Jefferis, R. (2012). Isotype and glycoform selection for antibody therapeutics. *Arch Biochem Biophys*, 526(2), 159-166. doi:10.1016/j.abb.2012.03.021
- Jiang, X.-R., Song, A., Bergelson, S., Arroll, T., Parekh, B., May, K., . . . Schenerman, M. (2011). Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies. *Nature reviews Drug discovery*, 10(2), 101-111. doi:10.1038/nrd3365
- Jin, C., Altmann, F., Strasser, R., Mach, L., Schähs, M., Kunert, R., . . . Steinkellner, H. (2008). A plant-derived human monoclonal antibody induces an anti-carbohydrate immune response in rabbits. *Glycobiology*, 18(3), 235-241. doi:10.1093/glycob/cwm137
- Jing, Y., Qian, Y., & Li, Z. J. (2010). Sialylation enhancement of CTLA4-Ig fusion protein in Chinese hamster ovary cells by dexamethasone. *Biotechnology and bioengineering*, 107(3), 488-496. doi:10.1002/bit.22827
- Johnsson, B., Löfås, S., Lindquist, G., Edström, A., Hillgren, R. M. M., & Hansson, A. (1995). Comparison of methods for immobilization to carboxymethyl dextran sensor surfaces by analysis of the specific activity of monoclonal antibodies. *Journal of Molecular Recognition*, 8(1-2), 125-131. doi:10.1002/jmr.300080122
- Jones, M. B., Teng, H., Rhee, J. K., Lahar, N., Baskaran, G., & Yarema, K. J. (2004). Characterization of the cellular uptake and metabolic conversion of acetylated N-acetylmannosamine (ManNAc) analogues to sialic acids. *Biotechnology and bioengineering*, 85(4), 394-405. doi:10.1002/bit.10901
- Jung, S. T., Reddy, S. T., Kang, T. H., Borrok, M. J., Sandlie, I., Tucker, P. W., & Georgiou, G. (2010). Aglycosylated IgG variants expressed in bacteria that selectively bind FcγRI potentiate tumor cell killing by monocyte-dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(2), 604-609. doi:10.1073/pnas.0908590107

- Kamińska, J., Dzieciol, J., & Kościelak, J. (1999). Triazine dyes as inhibitors and affinity ligands of glycosyltransferases. *Glycoconjugate journal*, 16(11), 719-723. doi:10.1023/A:1007111526799
- Kanda, Y., Imai-Nishiya, H., Kuni-Kamochi, R., Mori, K., Inoue, M., Kitajima-Miyama, K., . . . Satoh, M. (2007). Establishment of a GDP-mannose 4, 6-dehydratase (GMD) knockout host cell line: a new strategy for generating completely non-fucosylated recombinant therapeutics. *Journal of biotechnology*, 130(3), 300-310. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.04.025
- Kanda, Y., Yamada, T., Mori, K., Okazaki, A., Inoue, M., Kitajima-Miyama, K., . . . Kakita, S. (2006). Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types. *Glycobiology*, 17(1), 104-118. doi:10.1093/glycob/cwl057
- Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2006). Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*, 313(5787), 670-673. doi:10.1126/science.1129594
- Kaplon, H., & Reichert, J. M. (2018). Antibodies to watch in 2019. *MAbs*. doi:10.1080/19420862.2018.1556465
- Karlsson, R., Pol, E., & Frostell, A. (2016). Comparison of surface plasmon resonance binding curves for characterization of protein interactions and analysis of screening data. *Anal. Biochem.*, 502, 53-63. doi:10.1016/j.ab.2016.03.007
- Kawasaki, N., Okumoto, T., Yamaguchi, Y., Takahashi, N., Fridman, W. H., Sautes-Fridman, C., . . . Kato, K. (2014). Site-specific classification of N-linked oligosaccharides of the extracellular regions of Fcγ receptor IIIb expressed in baby hamster kidney cells. *J. Glycomics Lipidomics*, 4(2), 116. doi:10.4172/2153-0637.1000116
- Kayser, V., Chennamsetty, N., Voynov, V., Forrer, K., Helk, B., & Trout, B. L. (2011). Glycosylation influences on the aggregation propensity of therapeutic monoclonal antibodies. *Biotechnol J*, 6(1), 38-44. doi:10.1002/biot.201000091
- Kelly, R. M., Kowle, R. L., Lian, Z., Striffler, B. A., Witcher, D. R., Parekh, B. S., . . . Frye, C. C. (2018). Modulation of IgG1 immunoeffector function by glycoengineering of the GDP-fucose biosynthesis pathway. *Biotechnology and bioengineering*, 115(3), 705-718. doi:10.1002/bit.26496
- Keppler, O. T., Horstkorte, R., Pawlita, M., Schmidt, C., & Reutter, W. (2001). Biochemical engineering of the N-acyl side chain of sialic acid: biological implications. *Glycobiology*, 11(2), 11R-18R. doi:10.1093/glycob/11.2.11R
- Kimberly, R. P., Tappe, N. J., Merriam, L. T., Redecha, P. B., Edberg, J. C., Schwartzman, S., & Valinsky, J. E. (1989). Carbohydrates on human Fc gamma receptors. Interdependence of the classical IgG and nonclassical lectin-binding sites on human Fc gamma RIII expressed on neutrophils. *The Journal of Immunology*, 142(11), 3923-3930.
- Kiyoshi, M., Caaveiro, J. M., Kawai, T., Tashiro, S., Ide, T., Asaoka, Y., . . . Tsumoto, K. (2015). Structural basis for binding of human IgG1 to its high-affinity human receptor FcγRI. *Nat. Commun.*, 6, 6866. doi:10.1038/ncomms7866

- Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *nature*, 256, 495-497.
- Kommineni, V., Markert, M., Ren, Z., Palle, S., Carrillo, B., Deng, J., . . . Holtz, B. (2019). In Vivo Glycan Engineering via the Mannosidase I Inhibitor (Kifunensine) Improves Efficacy of Rituximab Manufactured in *Nicotiana benthamiana* Plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(1), 194. doi:10.3390/ijms20010194
- Koprivova, A., Stemmer, C., Altmann, F., Hoffmann, A., Kopriva, S., Gorr, G., . . . Decker, E. L. (2004). Targeted knockouts of *Physcomitrella* lacking plant-specific immunogenic N-glycans. *Plant biotechnology journal*, 2(6), 517-523. doi:10.1111/j.1467-7652.2004.00100.x
- Kornfeld, R., & Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual review of biochemistry*, 54(1), 631-664. doi:10.1146/annurev.bi.54.070185.003215
- Kowarik, M., & Feldman, M. F. (2009). Getting Bacteria to Glycosylate. Dans G. Walsh (édit.), *Post-translational Modification of Protein Biopharmaceuticals* (p. 193-208): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Krapp, S., Mimura, Y., Jefferis, R., Huber, R., & Sonderrmann, P. (2003). Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *Journal of molecular biology*, 325(5), 979-989. doi:10.1016/S0022-2836(02)01250-0
- Kumar, N., Gammell, P., & Clynes, M. (2007). Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture. *Cytotechnology*, 53(1-3), 33-46. doi:10.1007/s10616-007-9047-6
- Kunert, R., & Reinhart, D. (2016). Advances in recombinant antibody manufacturing. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(8), 3451-3461. doi:10.1007/s00253-016-7388-9
- Kunkel, J. P., Jan, D. C. H., Jamieson, J. C., & Butler, M. (1998). Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *Journal of biotechnology*, 62(1), 55-71. doi:10.1016/S0168-1656(98)00044-3
- Kuntz, D. A., Zhong, W., Guo, J., Rose, D. R., & Boons, G. J. (2009). The molecular basis of inhibition of Golgi alpha-mannosidase II by mannostatin A. *Chembiochem*, 10(2), 268-277. doi:10.1002/cbic.200800538
- Kuroguchi, M., Mori, M., Osumi, K., Tojino, M., Sugawara, S.-I., Takashima, S., . . . Amano, J. (2015). Glycoengineered monoclonal antibodies with homogeneous glycan (M3, G0, G2, and A2) using a chemoenzymatic approach have different affinities for FcγRIIIa and variable antibody-dependent cellular cytotoxicity activities. *PLoS One*, 10(7), e0132848. doi:10.1371/journal.pone.0132848
- La Merie Publishing. (2019). Blockbuster Biologics 2018: Sales of Recombinant Therapeutic Antibodies & Proteins. Tiré de <https://lamerie.com/report/blockbuster-biologics-2018-sales-of-recombinant-therapeutic-antibodies-proteins/>
- Lalonde, M.-E., & Durocher, Y. (2017). Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *Journal of biotechnology*, 251, 128-140. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.04.028

- Langdon, R. H., Cuccui, J., & Wren, B. W. (2009). N-linked glycosylation in bacteria: an unexpected application. doi:10.2217/fmb.09.10
- Lee, E. U., Roth, J., & Paulson, J. C. (1989). Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2, 6-sialyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 264(23), 13848-13855.
- Lejeune, J., Thibault, G., Cartron, G., Ohresser, M., & Watier, H. (2010). [Implications of receptors for the Fc portion of IgG (FcgammaRs) in mechanism of action of therapeutic antibodies]. *Bull Cancer*, 97(5), 511-522. doi:10.1684/bdc.2010.1077
- Li, C., Zhu, S., Ma, C., & Wang, L.-X. (2017). Designer α 1, 6-Fucosidase Mutants Enable Direct Core Fucosylation of Intact N-Glycopeptides and N-Glycoproteins. *Journal of the American Chemical Society*, 139(42), 15074-15087. doi:10.1021/jacs.7b07906
- Li, J., & McClane, B. A. (2014). The sialidases of *Clostridium perfringens* type D strain CN3718 differ in their properties and sensitivities to inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(5), 1701-1709. doi:10.1128/AEM.03440-13
- Li, J., & Zhu, Z. (2010). Research and development of next generation of antibody-based therapeutics. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(9), 1198-1207. doi:10.1038/aps.2010.120
- Li, M. Y., Ebel, B., Blanchard, F., Paris, C., Guedon, E., & Marc, A. (2019). Control of IgG glycosylation by in situ and real-time estimation of specific growth rate of CHO cells cultured in bioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 116(5), 985-993. doi:10.1002/bit.26914
- Li, M. Y., Ebel, B., Paris, C., Chauchard, F., Guedon, E., & Marc, A. (2018). Real-time monitoring of antibody glycosylation site occupancy by in situ Raman spectroscopy during bioreactor CHO cell cultures. *Biotechnology progress*, 34(2), 486-493. doi:10.1002/btpr.2604
- Li, P., Jiang, N., Nagarajan, S., Wohlueter, R., Selvaraj, P., & Zhu, C. (2007). Affinity and kinetic analysis of Fc γ receptor IIIa (CD16a) binding to IgG ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 282(9), 6210-6221. doi:10.1074/jbc.M609064200
- Li, T., DiLillo, D. J., Bournazos, S., Giddens, J. P., Ravetch, J. V., & Wang, L.-X. (2017). Modulating IgG effector function by Fc glycan engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114(13), 3485-3490. doi:10.1073/pnas.1702173114
- Liberelle, B., Bartholin, L., Boucher, C., Murschel, F., Jolicœur, M., Durocher, Y., . . . De Crescenzo, G. (2010). New ELISA approach based on coiled-coil interactions. *Journal of immunological methods*, 362(1), 161-167. doi:10.1016/j.jim.2010.09.027
- Lin, C.-W., Tsai, M.-H., Li, S.-T., Tsai, T.-I., Chu, K.-C., Liu, Y.-C., . . . Shivatare, S. S. (2015). A common glycan structure on immunoglobulin G for enhancement of effector functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112(34), 10611-10616. doi:10.1073/pnas.1513456112
- Lipscomb, M. L., Palomares, L. A., Hernández, V., Ramírez, O. T., & Kompala, D. S. (2005). Effect of production method and gene amplification on the glycosylation pattern of a secreted reporter protein in CHO cells. *Biotechnology progress*, 21(1), 40-49. doi:10.1021/bp049761m

- Litowski, J. R., & Hodges, R. S. (2001). Designing heterodimeric two-stranded α -helical coiled-coils: the effect of chain length on protein folding, stability and specificity. *The Journal of peptide research*, 58(6), 477-492. doi:10.1034/j.1399-3011.2001.10972.x
- Liu, J. K. H. (2014). The history of monoclonal antibody development—Progress, remaining challenges and future innovations. *Annals of Medicine and Surgery*, 3(4), 113-116. doi:10.1016/j.amsu.2014.09.001
- Liu, L. (2015). Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *J. Pharm. Sci.*, 104(6), 1866-1884. doi:10.1002/jps.24444
- Liu, L., Stadheim, A., Hamuro, L., Pittman, T., Wang, W., Zha, D., . . . Prueksaritanont, T. (2011). Pharmacokinetics of IgG1 monoclonal antibodies produced in humanized *Pichia pastoris* with specific glycoforms: a comparative study with CHO produced materials. *Biologicals*, 39(4), 205-210. doi:10.1016/j.biologicals.2011.06.002
- Liu, Y. D., & Flynn, G. C. (2016). Effect of high mannose glycan pairing on IgG antibody clearance. *Biologicals*, 44(3), 163-169. doi:10.1016/j.biologicals.2016.02.003
- Louie, S., Haley, B., Marshall, B., Heidersbach, A., Yim, M., Brozynski, M., . . . Shaw, D. (2017). FX knockout CHO hosts can express desired ratios of fucosylated or afucosylated antibodies with high titers and comparable product quality. *Biotechnology and bioengineering*, 114(3), 632-644. doi:10.1002/bit.26188
- Lu, J., Chu, J., Zou, Z., Hamacher, N. B., Rixon, M. W., & Sun, P. D. (2015). Structure of Fc γ RI in complex with Fc reveals the importance of glycan recognition for high-affinity IgG binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112(3), 833-838. doi:10.1073/pnas.1418812112
- Lu, J., Ellsworth, J. L., Hamacher, N., Oak, S. W., & Sun, P. D. (2011). Crystal structure of Fc γ RI and its implication in high affinity gamma-immunoglobulin binding. *J Biol Chem*, 286(47), 40608-40613. doi:10.1074/jbc.M111.257550
- Lu, J., & Sun, P. D. (2015). Structural mechanism of high affinity Fc γ RI recognition of immunoglobulin G. *Immunol. Rev.*, 268(1), 192-200. doi:10.1111/imr.12346
- Lund, J., Takahashi, N., Pound, J. D., Goodall, M., & Jefferis, R. (1996). Multiple interactions of IgG with its core oligosaccharide can modulate recognition by complement and human Fc gamma receptor I and influence the synthesis of its oligosaccharide chains. *The Journal of Immunology*, 157(11), 4963-4969.
- Luo, Y., Lu, Z., Raso, S. W., Entrican, C., & Tangarone, B. (2009). *Dimers and multimers of monoclonal IgG1 exhibit higher in vitro binding affinities to Fc γ receptors*. Communication présentée à MAbs (vol. 1, p. 491-504). doi:10.4161/mabs.1.5.9631
- Maenaka, K., van der Merwe, P. A., Stuart, D. I., Jones, E. Y., & Sonderrmann, P. (2001). The human low affinity Fc γ receptors IIa, IIb, and III bind IgG with fast kinetics and distinct thermodynamic properties. *J Biol Chem*, 276(48), 44898-44904. doi:10.1074/jbc.M106819200
- Mahmood, T., & Yang, P.-C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4(9), 429. doi:10.4103/1947-2714.100998

- Mallery, D. L., McEwan, W. A., Bidgood, S. R., Towers, G. J., Johnson, C. M., & James, L. C. (2010). Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(46), 19985-19990. doi:10.1073/pnas.1014074107
- Manz, R. A., Hauser, A. E., Hiepe, F., & Radbruch, A. (2005). Maintenance of serum antibody levels. *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 367-386. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115723
- Marquart, A. (2019). SPR - Pages. Tiré de <https://www.sprpages.nl/data-fitting>
- McCracken, N. A., Kowle, R., & Ouyang, A. (2014). Control of galactosylated glycoforms distribution in cell culture system. *Biotechnology progress*, 30(3), 547-553. doi:10.1002/btpr.1906
- Mellahi, K., Cambay, F., Brochu, D., Gilbert, M., Perrier, M., Ansorge, S., . . . Henry, O. (2019). Process development for an inducible rituximab-expressing Chinese hamster ovary cell line. *Biotechnol Prog*, 35(1), e2742. doi:10.1002/btpr.2742
- Meuwly, F., Weber, U., Ziegler, T., Gervais, A., Mastrangeli, R., Crisci, C., . . . Kadouri, A. (2006). Conversion of a CHO cell culture process from perfusion to fed-batch technology without altering product quality. *Journal of biotechnology*, 123(1), 106-116. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.10.013
- Mimura, Y., Church, S., Ghirlando, R., Ashton, P. R., Dong, S., Goodall, M., . . . Jefferis, R. (2000). The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms. *Molecular immunology*, 37(12), 697-706. doi:10.1016/S0161-5890(00)00105-X
- Mimura, Y., Sondermann, P., Ghirlando, R., Lund, J., Young, S. P., Goodall, M., & Jefferis, R. (2001). Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in FcγRIIb binding. *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 45539-45547. doi:10.1074/jbc.M107478200
- Mitchelson, F., Hughes, E. H., Mondia, J., & Hyde-Deruysscher, R. P. (2017). *Brevet*.
- Mizushima, T., Yagi, H., Takemoto, E., Shibata-Koyama, M., Isoda, Y., Iida, S., . . . Kato, K. (2011). Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans. *Genes Cells*, 16(11), 1071-1080. doi:10.1111/j.1365-2443.2011.01552.x
- Moorkens, E., Jonker-Exler, C., Huys, I., Declerck, P., Simoens, S., & Vulto, A. (2016). Overcoming barriers to the market access of biosimilars in the European Union: The case of biosimilar monoclonal antibodies. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 193. doi:10.3389/fphar.2016.00193
- Murschel, F., Fortier, C., Jolicoeur, M., Hodges, R., & De Crescenzo, G. (2017). Two Complementary Approaches for the Controlled Release of Biomolecules Immobilized via Coiled-Coil Interactions: Peptide Core Mutations and Multivalent Presentation. *Biomacromolecules*, 18(3), 965-975. doi:10.1021/acs.biomac.6b01830
- Murschel, F., Liberelle, B., St-Laurent, G., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2013). Coiled-coil-mediated grafting of bioactive vascular endothelial growth factor. *Acta Biomater*, 9(6), 6806-6813. doi:10.1016/j.actbio.2013.02.032

- Murschel, F., Zaimi, A., Noel, S., Jolicoeur, M., & De Crescenzo, G. (2015). Specific adsorption via peptide tags: oriented grafting and release of growth factors for tissue engineering. *Biomacromolecules*, 16(11), 3445-3454. doi:10.1021/acs.biomac.5b00955
- Müthing, J., Kemminer, S. E., Conradt, H. S., Šagi, D., Nimtz, M., Kärst, U., & Peter-Katalinić, J. (2003). Effects of buffering conditions and culture pH on production rates and glycosylation of clinical phase I anti-melanoma mouse IgG3 monoclonal antibody R24. *Biotechnology and bioengineering*, 83(3), 321-334. doi:10.1002/bit.10673
- Myszka, D. G. (1997). Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Current opinion in biotechnology*, 8(1), 50-57. doi:10.1016/S0958-1669(97)80157-7
- Myszka, D. G. (1999). Improving biosensor analysis. *Journal of molecular recognition*, 12(5), 279-284. doi:10.1002/(SICI)1099-1352(199909/10)12:5<279::AID-JMR473>3.0.CO;2-3
- Nagae, M., & Yamaguchi, Y. (2012). Function and 3D structure of the N-glycans on glycoproteins. *Int. J. Mol. Sci.*, 13(7), 8398-8429. doi:10.3390/ijms13078398
- Naso, M. F., Tam, S. H., Scallon, B. J., & Raju, T. S. (2010). Engineering host cell lines to reduce terminal sialylation of secreted antibodies. *Mabs*, 2(5), 519-527. doi:10.4161/mabs.2.5.13078
- Nimmerjahn, F., Gordan, S., & Lux, A. (2015). FcγR dependent mechanisms of cytotoxic, agonistic, and neutralizing antibody activities. *Trends Immunol.*, 36(6), 325-336. doi:10.1016/j.it.2015.04.005
- Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2005). Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science*, 310(5753), 1510-1512. doi:10.1126/science.1118948
- Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2007). Antibodies, Fc receptors and cancer. *Curr. Opin. Immunol.*, 19(2), 239-245. doi:10.1016/j.coi.2007.01.005
- Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2008). Fc γ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 8(1), 34-47. doi:10.1038/nri2206
- Niwa, R., Natsume, A., Uehara, A., Wakitani, M., Iida, S., Uchida, K., . . . Shitara, K. (2005). IgG subclass-independent improvement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by fucose removal from Asn297-linked oligosaccharides. *Journal of immunological methods*, 306(1-2), 151-160. doi:10.1016/j.jim.2005.08.009
- Niwa, R., Shoji-Hosaka, E., Sakurada, M., Shinkawa, T., Uchida, K., Nakamura, K., . . . Shitara, K. (2004). Defucosylated chimeric anti-CC chemokine receptor 4 IgG1 with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity shows potent therapeutic activity to T-cell leukemia and lymphoma. *Cancer Research*, 64(6), 2127-2133. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2068
- O'Shannessy, D. J., Brigham-Burke, M., & Peck, K. (1992). Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector. *Analytical biochemistry*, 205(1), 132-136. doi:10.1016/0003-2697(92)90589-Y
- Oganesyan, V., Mazor, Y., Yang, C., Cook, K. E., Woods, R. M., Ferguson, A., . . . Dall'Acqua, W. F. (2015). Structural insights into the interaction of human IgG1 with FcγRI: no

- direct role of glycans in binding. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 71(11), 2354-2361. doi:10.1107/S1399004715018015
- Ohyama, C., Smith, P. L., Angata, K., Fukuda, M. N., Lowe, J. B., & Fukuda, M. (1998). Molecular cloning and expression of GDP-D-mannose-4, 6-dehydratase, a key enzyme for fucose metabolism defective in Lec13 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(23), 14582-14587. doi:10.1074/jbc.273.23.14582
- Okazaki, A., Shoji-Hosaka, E., Nakamura, K., Wakitani, M., Uchida, K., Kakita, S., . . . Shitara, K. (2004). Fucose depletion from human IgG1 oligosaccharide enhances binding enthalpy and association rate between IgG1 and FcγRIIIa. *J. Mol. Biol.*, 336(5), 1239-1249. doi:10.1016/j.jmb.2004.01.007
- Onitsuka, M., & Omasa, T. (2014). Rapid evaluation of N-glycosylation status of antibodies with chemiluminescent lectin-binding assay. *J Biosci Bioeng*. doi:10.1016/j.jbiosc.2014.11.015
- Pan, Q., & Hammarström, L. (2000). Molecular basis of IgG subclass deficiency. *Immunological reviews*, 178(1), 99-110. doi:10.1034/j.1600-065X.2000.17815.x
- Pande, S., Rahardjo, A., Livingston, B., & Mujacic, M. (2015). Monensin, a small molecule ionophore, can be used to increase high mannose levels on monoclonal antibodies generated by Chinese hamster ovary production cell-lines. *Biotechnology and bioengineering*, 112(7), 1383-1394. doi:10.1002/bit.25551
- Parsons, T. B., Struwe, W. B., Gault, J., Yamamoto, K., Taylor, T. A., Raj, R., . . . Benesch, J. L. P. (2016). Optimal synthetic glycosylation of a therapeutic antibody. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(7), 2361-2367. doi:10.1002/anie.201508723
- Patel, K. R., Roberts, J. T., Subedi, G. P., & Barb, A. W. (2018). Restricted processing of CD16a/Fcγ receptor IIIa N-glycans from primary human NK cells impacts structure and function. *J. Biol. Chem.*, 293(10), 3477-3489. doi:10.1074/jbc.RA117.001207
- Patel, R., Johnson, K. K., Andrien, B. A., & Tamburini, P. P. (2013). IgG subclass variation of a monoclonal antibody binding to human Fc-γ receptors. *Am J Biochem Biotechnol*, 9(3), 206. doi:10.3844/ajbbsp.2013.206.218
- Paul, W. E. (2012). *Fundamental immunology*, 7th ed.
- Peipp, M., van Bueren, J. J. L., Schneider-Merck, T., Bleeker, W. W. K., Dechant, M., Beyer, T., . . . van de Winkel, J. G. J. (2008). Antibody fucosylation differentially impacts cytotoxicity mediated by NK and PMN effector cells. *Blood*, 112(6), 2390-2399. doi:10.1182/blood-2008-03-144600
- Pérez-García, J., Muñoz-Couselo, E., Cortés, J., & Scaltriti, M. (2014). *Therapeutic antibodies in breast cancer*. Communication présentée à Seminars in oncology (vol. 41, p. 576-588).
- Peschke, B., Keller, C. W., Weber, P., Quast, I., & Lünemann, J. D. (2017). Fc-galactosylation of human immunoglobulin gamma isotypes improves C1q binding and enhances complement-dependent cytotoxicity. *Frontiers in immunology*, 8, 646. doi:10.3389/fimmu.2017.00646
- Potgieter, T. I., Cukan, M., Drummond, J. E., Houston-Cummings, N. R., Jiang, Y., Li, F., . . . d'Anjou, M. (2009). Production of monoclonal antibodies by glycoengineered *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*, 139(4), 318-325. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.12.015

- Powell, M. S., Barton, P. A., Emmanouilidis, D., Wines, B. D., Neumann, G. M., Peitersz, G. A., . . . Hogarth, P. M. (1999). Biochemical analysis and crystallisation of Fc gamma RIIa, the low affinity receptor for IgG. *Immunology Letters*, 68(1), 17-23. doi:10.1016/S0165-2478(99)00025-5
- Powell, M. S., & Hogarth, P. M. (2008). Fc receptors. *Adv Exp Med Biol*, 640, 22-34. doi:10.1007/978-0-387-09789-3_3
- Quast, I., Keller, C. W., Maurer, M. A., Giddens, J. P., Tackenberg, B., Wang, L.-X., . . . Lünemann, J. D. (2015). Sialylation of IgG Fc domain impairs complement-dependent cytotoxicity. *The Journal of clinical investigation*, 125(11), 4160-4170. doi:10.1172/JCI82695
- Radaev, S., & Sun, P. (2002). Recognition of immunoglobulins by Fc gamma receptors. *Mol Immunol*, 38(14), 1073-1083. doi:10.1016/S0161-5890(02)00036-6
- Raju, T. S. (2008). Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Current opinion in immunology*, 20(4), 471-478. doi:10.1016/j.coi.2008.06.007
- Raju, T. S., Briggs, J. B., Chamow, S. M., Winkler, M. E., & Jones, A. J. S. (2001). Glycoengineering of therapeutic glycoproteins: in vitro galactosylation and sialylation of glycoproteins with terminal N-acetylglucosamine and galactose residues. *Biochemistry*, 40(30), 8868-8876. doi:10.1021/bi010475i
- Ravetch, J. V., & Bolland, S. (2001). IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol*, 19, 275-290. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.275
- Ravetch, J. V., & Clynes, R. A. (1998). Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annu Rev Immunol*, 16, 421-432. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.421
- Raymond, C. (2016). *Production d'IgG sialylées en CHO et impact sur leurs fonctions effectrices*. (Université de Montréal).
- Raymond, C., Robotham, A., Kelly, J., Lattova, E., Perreault, H., & Durocher, Y. (2012). Production of highly sialylated monoclonal antibodies. Dans S. Petrescu (édit.), *Glycosylation*: IntechOpen Publisher.
- Raymond, C., Robotham, A., Spearman, M., Butler, M., Kelly, J., & Durocher, Y. (2015). Production of alpha2,6-sialylated IgG1 in CHO cells. *MAbs*, 7(3), 571-583. doi:10.1080/19420862.2015.1029215
- Reusch, D., Habeger, M., Falck, D., Peter, B., Maier, B., Gassner, J., . . . Wuhler, M. (2015). Comparison of methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles-Part 2: Mass spectrometric methods. *Mabs*, 7(4), 732-742. doi:10.1080/19420862.2015.1045173
- Reusch, D., Habeger, M., Kailich, T., Heidenreich, A.-K., Kampe, M., Bulau, P., & Wuhler, M. (2014). *High-throughput glycosylation analysis of therapeutic immunoglobulin G by capillary gel electrophoresis using a DNA analyzer*. Communication présentée à MAbs (vol. 6, p. 185-196). doi:10.4161/mabs.26712
- Ribatti, D. (2014). From the discovery of monoclonal antibodies to their therapeutic application: An historical reappraisal. *Immunology letters*, 161(1), 96-99. doi:10.1016/j.imlet.2014.05.010

- Richards, J. O., Karki, S., Lazar, G. A., Chen, H., Dang, W., & Desjarlais, J. R. (2008). Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Molecular cancer therapeutics*, 7(8), 2517-2527. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0201
- Rillahan, C. D., Antonopoulos, A., Lefort, C. T., Sonon, R., Azadi, P., Ley, K., . . . Paulson, J. C. (2012). Global metabolic inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases remodel the glycome. *Nature chemical biology*, 8(7), 661-668. doi:10.1038/nchembio.999
- Ripka, J., Adamany, A., & Stanley, P. (1986). Two Chinese hamster ovary glycosylation mutants affected in the conversion of GDP-mannose to GDP-fucose. *Archives of biochemistry and biophysics*, 249(2), 533-545. doi:10.1016/0003-9861(86)90031-7
- Rodriguez, J., Spearman, M., Huzel, N., & Butler, M. (2005). Enhanced Production of Monomeric Interferon-β by CHO Cells through the Control of Culture Conditions. *Biotechnology progress*, 21(1), 22-30. doi:10.1021/bp049807b
- Roth, J., Zuber, C., Park, S., Jang, I., Lee, Y., Kysela, K. G., . . . Cho, J. W. (2010). Protein N-glycosylation, protein folding, and protein quality control. *Molecules and Cells*, 30(6), 497-506. doi:10.1007/s10059-010-0159-z
- Royle, L., Radcliffe, C. M., Dwek, R. A., & Rudd, P. M. (2007). Detailed structural analysis of N-glycans released from glycoproteins in SDS-PAGE gel bands using HPLC combined with exoglycosidase array digestions. *Glycobiology protocols*, 125-143. doi:10.1385/1-59745-167-3:125
- Sakae, Y., Satoh, T., Yagi, H., Yanaka, S., Yamaguchi, T., Isoda, Y., . . . Kato, K. (2017). Conformational effects of N-glycan core fucosylation of immunoglobulin G Fc region on its interaction with Fcγ receptor IIIa. *Sci. Rep.*, 7(1), 13780. doi:10.1038/s41598-017-13845-8
- Sanchez-Mejorada, G., & Rosales, C. (1998). Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukoc Biol*, 63(5), 521-533. doi:10.1002/jlb.63.5.521
- Sazinsky, S. L., Ott, R. G., Silver, N. W., Tidor, B., Ravetch, J. V., & Wittrup, K. D. (2008). Aglycosylated immunoglobulin G1 variants productively engage activating Fc receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51), 20167-20172. doi:10.1073/pnas.0809257105
- Scallon, B. J., Tam, S. H., McCarthy, S. G., Cai, A. N., & Raju, T. S. (2007). Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Molecular immunology*, 44(7), 1524-1534. doi:10.1016/j.molimm.2006.09.005
- Schasfoort, R. B. M. (2017). *Handbook of surface plasmon resonance*: Royal Society of Chemistry.
- Schwarz, F., & Aebi, M. (2011). Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Curr Opin Struct Biol*, 21(5), 576-582. doi:10.1016/j.sbi.2011.08.005
- Seo, J. S., Min, B. S., Kim, Y. J., Cho, J. M., Baek, E., Cho, M. S., & Lee, G. M. (2014). Effect of glucose feeding on the glycosylation quality of antibody produced by a human cell line, F2N78, in fed-batch culture. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(8), 3509-3515. doi:10.1007/s00253-013-5462-0

- Serrato, J. A., Hernández, V., Estrada-Mondaca, S., Palomares, L. A., & Ramírez, O. T. (2007). Differences in the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by hybridomas cultured in serum-supplemented, serum-free or chemically defined media. *Biotechnology and applied biochemistry*, 47(2), 113-124. doi:10.1042/BA20060216
- Shang, Y., Zeng, Y., & Zeng, Y. (2016). Integrated Microfluidic Lectin Barcode Platform for High-Performance Focused Glycomic Profiling. *Scientific reports*, 6. doi:10.1038/srep20297
- Shibata-Koyama, M., Iida, S., Misaka, H., Mori, K., Yano, K., Shitara, K., & Satoh, M. (2009). Nonfucosylated rituximab potentiates human neutrophil phagocytosis through its high binding for FcγRIIIb and MHC class II expression on the phagocytotic neutrophils. *Exp Hematol*, 37(3), 309-321. doi:10.1016/j.exphem.2008.11.006
- Shibata-Koyama, M., Iida, S., Okazaki, A., Mori, K., Kitajima-Miyama, K., Saitou, S., . . . Satoh, M. (2009). The N-linked oligosaccharide at Fc gamma RIIIa Asn-45: an inhibitory element for high Fc gamma RIIIa binding affinity to IgG glycoforms lacking core fucosylation. *Glycobiology*, 19(2), 126-134. doi:10.1093/glycob/cwn110
- Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., . . . Presta, L. G. (2002). Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J. Biol. Chem.*, 277(30), 26733-26740. doi:10.1074/jbc.M202069200
- Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., . . . Yamasaki, M. (2003). The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 278(5), 3466-3473. doi:10.1074/jbc.M210665200
- Shivatare, S. S., Huang, L.-Y., Zeng, Y.-F., Liao, J.-Y., You, T.-H., Wang, S.-Y., . . . Chen, L.-T. (2018). Development of glycosynthases with broad glycan specificity for the efficient glyco-remodeling of antibodies. *Chemical Communications*. doi:10.1039/C8CC03384F
- Simmons, L. C., Reilly, D., Klimowski, L., Raju, T. S., Meng, G., Sims, P., . . . Rancatore, P. (2002). Expression of full-length immunoglobulins in *Escherichia coli*: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies. *Journal of immunological methods*, 263(1-2), 133-147. doi:10.1016/S0022-1759(02)00036-4
- Slade, P. G., Caspary, R. G., Nargund, S., & Huang, C. J. (2016). Mannose metabolism in recombinant CHO cells and its effect on IgG glycosylation. *Biotechnology and bioengineering*, 113(7), 1468-1480. doi:10.1002/bit.25924
- Sondermann, P., Kaiser, J., & Jacob, U. (2001). Molecular basis for immune complex recognition: a comparison of Fc-receptor structures. *J Mol Biol*, 309(3), 737-749. doi:10.1006/jmbi.2001.4670
- Sondermann, P., & Szymkowski, D. E. (2016). Harnessing Fc receptor biology in the design of therapeutic antibodies. *Curr Opin Immunol*, 40, 78-87. doi:10.1016/j.coi.2016.03.005
- Sou, S. N., Sellick, C., Lee, K., Mason, A., Kyriakopoulos, S., Polizzi, K. M., & Kontoravdi, C. (2015). How does mild hypothermia affect monoclonal antibody glycosylation? *Biotechnol Bioeng*, 112(6), 1165-1176. doi:10.1002/bit.25524

- Spearman, M., Dionne, B., & Butler, M. (2011). The Role of Glycosylation in Therapeutic Antibodies. Dans M. Al-Rubeai (édit.), *Antibody Expression and Production* (vol. 7, p. 251-292): Springer.
- Stanley, P. (2011). Golgi glycosylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(4). doi:10.1101/cshperspect.a005199
- Stöckmann, H., Duke, R. M., Millán Martín, S., & Rudd, P. M. (2015). Ultrahigh Throughput, Ultrafiltration-Based N-Glycomics Platform for Ultraperformance Liquid Chromatography (ULTRA3). *Analytical chemistry*, 87(16), 8316-8322. doi:10.1021/acs.analchem.5b01463
- Strohl, W. R. (2018). Current progress in innovative engineered antibodies. *Protein & cell*, 9(1), 86-120. doi:10.1007/s13238-017-0457-8
- Struwe, W. B., Cosgrave, E. F. J., Byrne, J. C., Saldova, R., & Rudd, P. M. (2010). Glycoproteomics in health and disease. Dans *Functional and Structural Proteomics of Glycoproteins* (p. 1-38): Springer.
- Subedi, G. P., & Barb, A. W. (2015). The Structural Role of Antibody N-Glycosylation in Receptor Interactions. *Structure*, 23(9), 1573-1583. doi:10.1016/j.str.2015.06.015
- Subedi, G. P., & Barb, A. W. (2016). The immunoglobulin G1 N-glycan composition affects binding to each low affinity Fc gamma receptor. *MAbs*, 8(8), 1512-1524. doi:10.1080/19420862.2016.1218586
- Subedi, G. P., & Barb, A. W. (2018). CD16a with oligomannose-type N-glycans is the only "low-affinity" Fc gamma receptor that binds the IgG crystallizable fragment with high affinity in vitro. *J. Biol. Chem.*, 293(43), 16842-16850. doi:10.1074/jbc.RA118.004998
- Subedi, G. P., Falconer, D. J., & Barb, A. W. (2017). Carbohydrate-Polypeptide Contacts in the Antibody Receptor CD16A Identified through Solution NMR Spectroscopy. *Biochemistry*, 56(25), 3174-3177. doi:10.1021/acs.biochem.7b00392
- Subedi, G. P., Hanson, Q. M., & Barb, A. W. (2014). Restricted motion of the conserved immunoglobulin G1 N-glycan is essential for efficient FcγRIIIa binding. *Structure*, 22(10), 1478-1488. doi:10.1016/j.str.2014.08.002
- Szekrenyes, A., Partyka, J., Varadi, C., Krenkova, J., Foret, F., & Guttman, A. (2015). Sample preparation for N-glycosylation analysis of therapeutic monoclonal antibodies by electrophoresis. *Methods Mol Biol*, 1274, 183-195. doi:10.1007/978-1-4939-2353-3_16
- Takahashi, N., Cohen-Solal, J., Galinha, A., Fridman, W. H., Sautes-Fridman, C., & Kato, K. (2002). N-glycosylation profile of recombinant human soluble FcγR3 receptor III. *Glycobiology*, 12(8), 507-515. doi:10.1093/glycob/cwf063
- Tao, M.-H., & Morrison, S. L. (1989). Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. *The Journal of Immunology*, 143(8), 2595-2601.
- te Velde, A., de Waal Malefijt, R., Huijbens, R. J., De Vries, J. E., & Figdor, C. G. (1992). IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10. *The Journal of Immunology*, 149(12), 4048-4052.

- Thomann, M., Schlothauer, T., Dashivets, T., Malik, S., Avenal, C., Bulau, P., . . . Reusch, D. (2015). In vitro glycoengineering of IgG1 and its effect on Fc receptor binding and ADCC activity. *Plos One*, 10(8). doi:10.1371/journal.pone.0134949
- Thompson, R., Creavin, A., O'Connell, M., O'Connor, B., & Clarke, P. (2011). Optimization of the enzyme-linked lectin assay for enhanced glycoprotein and glycoconjugate analysis. *Analytical biochemistry*, 413(2), 114-122. doi:10.1016/j.ab.2011.02.013
- Tripet, B., Yu, L., Bautista, D. L., Wong, W. Y., Irvin, R. T., & Hodges, R. S. (1996). Engineering a de novo-designed coiled-coil heterodimerization domain for the rapid detection, purification and characterization of recombinantly expressed peptides and proteins. *Protein engineering*, 9(11), 1029-1042. doi:10.1093/protein/9.11.1029
- Tropea, J. E., Kaushal, G. P., Pastuszak, I., Mitchell, M., Aoyagi, T., Molyneux, R. J., & Elbein, A. D. (1990). Mannostatin A, a new glycoprotein-processing inhibitor. *Biochemistry*, 29(43), 10062-10069. doi:10.1021/bi00495a008
- Trummer, E., Fauland, K., Seidinger, S., Schriebl, K., Lattenmayer, C., Kunert, R., . . . Katinger, H. (2006). Process parameter shifting: Part I. Effect of DOT, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, 94(6), 1033-1044. doi:10.1002/bit.21013
- Tsuchikama, K., & An, Z. (2018). Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries. *Protein & cell*, 9(1), 33-46. doi:10.1007/s13238-016-0323-0
- Tsukimura, W., Kurogochi, M., Mori, M., Osumi, K., Matsuda, A., Takegawa, K., . . . Shirai, T. (2017). Preparation and biological activities of anti-HER2 monoclonal antibodies with fully core-fucosylated homogeneous bi-antennary complex-type glycans. *Bioscience, biotechnology, biochemistry*, 81(12), 2353-2359. doi:10.1080/09168451.2017.1394813
- Udpa, N., & Million, R. P. (2015). Monoclonal antibody biosimilars. *Nature Reviews Drug Discovery*. doi:10.1038/nrd.2015.12
- Umana, P., Moudry, R., Amstutz, H., & Bailey, J. E. (1999). Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat. Biotechnol.*, 17(2). doi:10.1038/6179
- Urquhart, L. (2019). Top drugs and companies by sales in 2018.
- van Berkel, P. H. C., Gerritsen, J., van Voskuilen, E., Perdok, G., Vink, T., van de Winkel, J. G. J., & Parren, P. W. H. I. (2010). Rapid production of recombinant human IgG with improved ADCC effector function in a transient expression system. *Biotechnol. Bioeng.*, 105(2), 350-357. doi:10.1002/bit.22535
- Van den Herik-Oudijk, I. E., Ter Bekke, M. W., Tempelman, M. J., Capel, P. J., & Van de Winkel, J. G. (1995). Functional differences between two Fc receptor ITAM signaling motifs. *Blood*, 86(9), 3302-3307.
- van der Poel, C. E., Spaapen, R. M., de Winkel, J. G. J., & Leusen, J. H. W. (2011). Functional Characteristics of the High Affinity IgG Receptor, Fc gamma RI. *Journal of Immunology*, 186(5), 2699-2704. doi:10.4049/jimmunol.1003526

- Varki, A., Cummings, R. D., Aebi, M., Packer, N. H., Seeberger, P. H., Esko, J. D., . . . Kinoshita, T. (2015). Symbol nomenclature for graphical representations of glycans. *Glycobiology*, 25(12), 1323-1324. doi:10.1093/glycob/cwv091
- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispens, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*, 5, 520. doi:10.3389/fimmu.2014.00520
- 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
- Voet, D., & Voet, J. G. (2016). *Biochimie: De Boeck Supérieur*.
- von Horsten, H. H., Ogorek, C., Blanchard, V., Demmler, C., Giese, C., Winkler, K., . . . Sandig, V. (2010). Production of non-fucosylated antibodies by co-expression of heterologous GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase. *Glycobiology*, 20(12), 1607-1618. doi:10.1093/glycob/cwq109
- Wada, R., Matsui, M., & Kawasaki, N. (2019). Influence of N-glycosylation on effector functions and thermal stability of glycoengineered IgG1 monoclonal antibody with homogeneous glycoforms. *MAbs*, 11(2), 350-372. doi:10.1080/19420862.2018.1551044
- Waldman, B. C., & Rudnick, G. (1990). UDP-GlcNAc transport across the Golgi membrane: electroneutral exchange for dianionic UMP. *Biochemistry*, 29(1), 44-52. doi:10.1021/bi00453a006
- Walsh, G. (2009). Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins: An introductory overview. *Post-translational Modification of Protein Biopharmaceuticals*, 1-14.
- Walsh, G. (2018). Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.*, 36(12), 1136-1145. doi:10.1038/nbt.4305
- Walsh, G., & Jefferis, R. (2006). Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotechnol*, 24(10), 1241-1252. doi:10.1038/nbt1252
- Wang, L.-X., Tong, X., Li, C., Giddens, J. P., & Li, T. (2019). Glycoengineering of Antibodies for Modulating Functions. *Annual review of biochemistry*, 88, 433-459. doi:10.1146/annurev-biochem-062917-012911
- Warnock, D., Bai, X., Autote, K., Gonzales, J., Kinealy, K., Yan, B., . . . Bayer, R. J. (2005). In vitro galactosylation of human IgG at 1 kg scale using recombinant galactosyltransferase. *Biotechnology and bioengineering*, 92(7), 831-842. doi:10.1002/bit.20658
- Washburn, N., Schwab, I., Ortiz, D., Bhatnagar, N., Lansing, J. C., Medeiros, A., . . . Sarvaiya, H. (2015). Controlled tetra-Fc sialylation of IVIg results in a drug candidate with consistent enhanced anti-inflammatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(11), E1297-E1306. doi:10.1073/pnas.1422481112
- Wawrzynczak, E. J., Cumber, A. J., Parnell, G. D., Jones, P. T., & Winter, G. (1992). Blood clearance in the rat of a recombinant mouse monoclonal antibody lacking the N-linked oligosaccharide side chains of the CH2 domains. *Molecular immunology*, 29(2), 213-220. doi:10.1016/0161-5890(92)90102-4

- Wei, Y., Li, C., Huang, W., Li, B., Strome, S., & Wang, L.-X. (2008). Glycoengineering of human IgG1-Fc through combined yeast expression and in vitro chemoenzymatic glycosylation. *Biochemistry*, 47(39), 10294-10304. doi:10.1021/bi800874y
- Weiner, G. J. (2015). Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 15(6), 361-370. doi:10.1038/nrc3930
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature biotechnology*, 22(11), 1393. doi:10.1038/nbt1026
- Yagi, H., Takakura, D., Roumenina, L. T., Fridman, W. H., Sautes-Fridman, C., Kawasaki, N., & Kato, K. (2018). Site-specific N-glycosylation analysis of soluble Fcγ receptor IIIb in human serum. *Sci. Rep.*, 8(1), 2719. doi:10.1038/s41598-018-21145-y
- Yamaguchi, Y., Nishimura, M., Nagano, M., Yagi, H., Sasakawa, H., Uchida, K., . . . Kato, K. (2006). Glycoform-dependent conformational alteration of the Fc region of human immunoglobulin G1 as revealed by NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1760(4), 693-700. doi:10.1016/j.bbagen.2005.10.002
- Yamane-Ohnuki, N., Kinoshita, S., Inoue-Urakubo, M., Kusunoki, M., Iida, S., Nakano, R., . . . Satoh, M. (2004). Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnol. Bioeng.*, 87(5), 614-622. doi:10.1002/bit.20151
- Yamane-Ohnuki, N., & Satoh, M. (2009). *Production of therapeutic antibodies with controlled fucosylation*. Communication présentée à MAb (vol. 1, p. 230-236). doi:10.4161/mabs.1.3.8328
- Yang, J., Primack, R., Frohn, M., Wang, W., Luan, P., Retter, M. W., & Flynn, G. C. (2015). Impact of glycation on antibody clearance. *AAPS J*, 17(1), 237-244. doi:10.1208/s12248-014-9694-4
- Yang, W. H., Aziz, P. V., Heithoff, D. M., Mahan, M. J., Smith, J. W., & Marth, J. D. (2015). An intrinsic mechanism of secreted protein aging and turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(44), 13657-13662. doi:10.1073/pnas.1515464112
- Yang, X., Kim, S. M., Ruzanski, R., Chen, Y., Moses, S., Ling, W. L., . . . Ambrogelly, A. (2016). *Ultrafast and high-throughput N-glycan analysis for monoclonal antibodies*. Communication présentée à mAbs (vol. 8, p. 706-717). doi:10.1080/19420862.2016.1156828
- Yang, Z., & Hancock, W. S. (2004). Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column. *Journal of chromatography A*, 1053(1), 79-88. doi:10.1016/j.chroma.2004.08.150
- Yin, B., Wang, Q., Chung, C. Y., Bhattacharya, R., Ren, X., Tang, J., . . . Betenbaugh, M. J. (2017). A novel sugar analog enhances sialic acid production and biotherapeutic sialylation in CHO cells. *Biotechnology and bioengineering*, 114(8), 1899-1902. doi:10.1002/bit.26291
- 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 C. *Biotechnology and bioengineering*, 89(3), 345-356. doi:10.1002/bit.20353

- Yoon, S. K., Song, J. Y., & Lee, G. M. (2003). Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and bioengineering*, 82(3), 289-298. doi:10.1002/bit.10566
- Yu, X., Baruah, K., Harvey, D. J., Vasiljevic, S., Alonzi, D. S., Song, B.-D., . . . Crispin, M. (2013). Engineering hydrophobic protein–carbohydrate interactions to fine-tune monoclonal antibodies. *Journal of the American Chemical Society*, 135(26), 9723-9732. doi:10.1021/ja4014375
- Zauner, G., Deelder, A. M., & Wuhrer, M. (2011). Recent advances in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) for structural glycomics. *Electrophoresis*, 32(24), 3456-3466. doi:10.1002/elps.201100247
- Zauner, G., Selman, M. H. J., Bondt, A., Rombouts, Y., Blank, D., Deelder, A. M., & Wuhrer, M. (2013). Glycoproteomic analysis of antibodies. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(4), 856-865. doi:10.1074/mcp.R112.026005
- Zeck, A., Pohlentz, G., Schlothauer, T., Peter-Katalinic, J., & Regula, J. T. (2011). Cell type-specific and site directed N-glycosylation pattern of FcγRIIIa. *J. Proteome Res.*, 10(7), 3031-3039. doi:10.1021/pr1012653
- Zemella, A., Thoring, L., Hoffmeister, C., Samalikova, M., Ehren, P., Wustenhagen, D. A., & Kubick, S. (2018). Cell-free protein synthesis as a novel tool for directed glycoengineering of active erythropoietin. *Sci Rep*, 8(1), 8514. doi:10.1038/s41598-018-26936-x
- Zhang, A., Tsang, V. L., Markely, L. R., Kurt, L., Huang, Y. M., Prajapati, S., & Kshirsagar, R. (2016). Identifying the differences in mechanisms of mycophenolic acid controlling fucose content of glycoproteins expressed in different CHO cell lines. *Biotechnology and bioengineering*, 113(11), 2367-2376. doi:10.1002/bit.25995
- Zhang, J., Liu, X., Bell, A., To, R., Baral, T. N., Azizi, A., . . . Durocher, Y. (2009). Transient expression and purification of chimeric heavy chain antibodies. *Protein Expr. Purif.*, 65(1), 77-82. doi:10.1016/j.pep.2008.10.011
- Zhang, L., Luo, S., & Zhang, B. (2016). The use of lectin microarray for assessing glycosylation of therapeutic proteins. *MAbs*, 8(3), 524-535. doi:10.1080/19420862.2016.1149662
- Zhang, N., Liu, L., Dan Dumitru, C., Cummings, N. R. H., Cukan, M., Jiang, Y., . . . Mallem, M. R. (2011). Glycoengineered Pichia produced anti-HER2 is comparable to trastuzumab in preclinical study. *MAbs*, 3(3), 289-298. doi:10.4161/mabs.3.3.15532
- Zhang, P., Woen, S., Wang, T., Liau, B., Zhao, S., Chen, C., . . . Rudd, P. M. (2016). Challenges of glycosylation analysis and control: an integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs. *Drug Discov. Today*, 21(5), 740-765. doi:10.1016/j.drudis.2016.01.006
- Zhang, Y. (2015). Understanding the impact of Fc glycosylation on its conformational changes by molecular dynamics simulations and bioinformatics. *Molecular BioSystems*, 11(12), 3415-3424. doi:10.1039/C5MB00602C
- Zheng, K., Bantog, C., & Bayer, R. (2011). *The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability*. Communication présentée à MAbs (vol. 3, p. 568-576). doi:10.4161/mabs.3.6.17922

- Zheng, K., Yarmarkovich, M., Bantog, C., Bayer, R., & Patapoff, T. W. (2014). Influence of glycosylation pattern on the molecular properties of monoclonal antibodies. *MAbs*, 6(3), 649-658. doi:10.4161/mabs.28588
- Zou, G., Ochiai, H., Huang, W., Yang, Q., Li, C., & Wang, L. X. (2011). Chemoenzymatic synthesis and Fcγ receptor binding of homogeneous glycoforms of antibody Fc domain. Presence of a bisecting sugar moiety enhances the affinity of Fc to FcγIIIa receptor. *J Am Chem Soc*, 133(46), 18975-18991. doi:10.1021/ja208390n

ANNEXE A – IMPACT DE LA N-GLYCOSYLATION DE LA RÉGION FC DES IGG

Tableau annexe A - 1 : Impact de la N-glycosylation de la région Fc des IgG sur l'interaction avec les récepteurs Fc et les fonctions effectrices. Les impacts sont représentés par les signes suivants : diminution (- à - - -), augmentation (+ à +++) et aucun effet (0).

Glycoforme	Obtention du glycoforme	Caractérisation	Impact sur l'interaction avec récepteurs				Impact sur les fonctions effectrices			Références
			Récepteur	Méthode	Impact	Commentaire	Fonction	Méthode	Impact	
Aglycosylation	Mutation N297Q	-	C1q	Dosage phase solide	- -	/	/	/	/	(Tao & Morrison, 1989)
	<i>E. coli</i>	-	FcγRI	ELISA	- - -	/	/	/	/	(Simmons et al., 2002)
			FcRn		0					
			C1q		- -					
	PNGase F	Spectroscopie RMN 2D hétéronucléaire	FcγRIIIa Protéine A	SPR	- - 0	/ Pas d'impact sur l'interaction avec la protéine A	/	/	/	(Yamaguchi et al., 2006)
	Mutation N297Q	-	FcγR	SPR	- -	/	/	/	/	(Sazinsky et al., 2008)
			C1q		- -					
	<i>E. coli</i>	-	FcγR (I, IIa/b, IIIa)	ELISA	- -	/	ADCC	PMBC	- -	(Jung et al., 2010)
			FcRn		0	Pas d'impact sur l'interaction avec le FcRn	/	/	/	
	<i>Pichia Pastoris</i>	-	FcRn	SPR	0	/	/	/	/	(Liu, L. et al., 2011)
	Mutation N297Q	-	FcγRIIIa _{F158}	SPR	- -	/	/	/	/	(Dorion-Thibaut et al., 2014)
	Chimioenzymatique	-	FcγRIIIa _{V158}	ELISA	- -	/	ADCC	Kit Promega	- -	(Kuroguchi et al., 2015)
	Mutation N297Q	-	FcγRIIIa _{F158}	SPR	- -	La glycosylation des IgG est nécessaire pour l'interaction avec les FcγRIIIa	/	/	/	(Dorion-Thibaut et al., 2016)
			FcγRI		- -					
	Mutation N297Q	-	FcγRIIIa _{F158/V158}	SPR	- -		/	/	/	(Cambay et al., 2019)

Oligomannose	Inhibiteur (kifunensine et swainosine)	Chromatographie échangeuse d'anions	FcγRIIIa	SPR/ELISA	++	L'impact serait lié à l'absence de fucose /	ADCC	PBMC	++	(Kanda et al., 2006)
			FcRn	SPR	+		/	/	/	
			C1q	Cytométrie en flux	-		CDC	/	-	
	Chimioenzymatique	MALDI-TOF SM	FcγRIIIa	SPR	++	/	/	/	/	(Zou et al., 2011)
			FcγRIIb		0					
Chimioenzymatique	MALDI-TOF SM	FcγRIIIa _{V158}	ELISA	0	/	ADCC	Kit Promega	+++	(Kuroguchi et al., 2015)	
Afucosylation	Cellules Lec13	MALDI-TOF-SM	FcγRIIIa _{F158/V158}	ELISA	++++	/	ADCC	PBMC	++++	(Shields et al., 2002)
			FcγR (I, IIa/b)		0		/	/	/	
			C1q		0					
			FcRn		0					
	Cellules YB2/0 et CHO Enrichissement lectine LCA	HPLC phase inverse	/	/	/	/	ADCC	PBMC	++++	(Shinkawa et al., 2003)
	Cellules YB2/0 et CHO	-	FcγRIIIa _{F158/V158}	SPR	++++	/	ADCC	Lymphoblaste B (WIL2-S)	++++	(Okazaki et al., 2004)
	Knock-out FUT8	HPLC phase inverse	FcγRIIIa _{F158}	ELISA	++++	/	ADCC	PBMC	++++	(Yamane-Ohnuki et al., 2004)
			/		/		CDC	/	0	
	Knock-out FUT8	Chromatographie échangeuse d'anions	FcγRIIIa _{F158/V158}	ELISA	++++	/	ADCC	PBMC	++++	(Niwa et al., 2005)
			/		/		CDC	/	0	
	Surexpression GnT-III	MALDI-TOF-SM	FcγRIIIa _{F158/V158}	SPR	++++	/	/	/	/	(Ferrara, Stuart, et al., 2006)
	Knock-out FUT8	Chromatographie échangeuse d'anions	FcγRIIIa _{F158/V158}	ELISA/SPR	++++	/	ADCC	PBMC	++++	(Kanda et al., 2006)
			/		/		CDC	/	0	
Co-expression transitoire FUT8 Cellules plantes (G0)	CL-ESI-SM	FcγRIIIa	SPR	++++	/	/	/	/	(Forthal et al., 2010)	
Lignée cellulaire déficiente pour l'ajout de fucose Remodelage <i>in vitro</i>	LC-ESI-QTOF- SM	FcγRIIIa	Test de liaison compétitif basé sur la technologie AlphaScreen	++++	/	/	/	/	(Houde et al., 2010)	

Afucoylation (suite)	Surexpression GnT-III	MALDI-TOF-SM	FcγRIIIa	SPR	++++	/	ADCC	PBMC	++++	(Ferrara et al., 2011)
	<i>Knock-out</i> FUT8	CE	FcγRIIIa _{F158/V158}		++++		ADCC	PBMC	++++	
			FcγRIIa/b	ELISA	+	/	/	/	/	(Chung, S. et al., 2012)
			FcγRI		0					
			C1q		0		CDC	/	0	
	Chimioenzymatique	MALDI-TOF SM	FcγRIIIa	SPR	++++	/	/	/	/	(Zou et al., 2011)
	Chimioenzymatique	MALDI-TOF SM	/	/	/	/	ADCC	Kit Promega (Cellules Jurkat)	+++	(Kuroguchi et al., 2015)
	Chimioenzymatique	CL-SM/SM	FcγRIIIa		++		ADCC	PBMC	+++	
			FcγRIIa/b et FcγRI	ELISA	0	/	/	/	/	(Lin et al., 2015)
			C1q		0		CDC	/	0	
	2-déoxy-2-fluoro- L-fucose	MALDI-TOF-SM	FcγRIIIa/b		++++					
			FcγRIIb	SPR	++	/	/	/	/	(Subedi & Barb, 2016)
			FcγRIIa et FcγRI		0					
	2-déoxy-2-fluoro- L-fucose	nanoLC-ESI- QTOF-SM	FcγRIIIa/b	SPR	++++	/	ADCC	Cellules NK	++++	(Bruggeman et al., 2017)
			FcγR (I, IIa/b)		0		/	/	/	
	2-déoxy-2-fluoro- L-fucose	nanoLC-ESI- QTOF-SM	FcγRIIIa/b	SPR	++++		ADCC	Cellules NK	++++	
			FcγR (I, IIa/b)		0	/	/	/	/	(Dekkers et al., 2017)
			C1q	ELISA	0		CDC	/	0	
	Chimioenzymatique	CL-SM	FcγRIIIa _{F158/V158}	SPR/ELISA	++++	/	ADCC	PBMC	++++	(Li, T. et al., 2017)
	Chimioenzymatique	CL-SM/SM	FcγRIIIa	SPR	++++	/	ADCC	Cellules Jurkat	++++	(Tsukimura et al., 2017)
	Surexpression GDP-6-deoxy-D- talose synthétase	UPLC-Phase normale	FcγRIIIa _{V158}	SPR/ELISA	++++	/	ADCC	Cellules Jurkat	++++	(Kelly et al., 2018)
	Chimioenzymatique	CL phase inverse- ESI-QTOF	FcγRIIIa	ELISA	++++	/	/	/	/	(Shivatare et al., 2018)
	Chimioenzymatique	HILIC	FcγRIIIa _{V158}	SPR / Chromatographie d'affinité	++++		ADCC	Cellules Jurkat	++++	
			FcRn		0	/				(Wada et al., 2019)
			C1q	SPR	0		/	/	/	

Galactosylation	Remodelage <i>in vitro</i>	HPLC phase inverse	/	/	/	/	ADCC CDC	PBMC /	0 ++	(Boyd et al., 1995)
	Remodelage <i>in vitro</i>	HPLC	FcγRIIIa	SPR	+	Digalactosylation ≈ 99 % Par rapport à la forme dégalactosylée	/	/	/	(Yamaguchi et al., 2006)
	Remodelage <i>in vitro</i>	CL-ESI-QTOF- SM	FcγRIIIa	Test de liaison compétitif basé sur la technologie AlphaScreen	++	Digalactosylation > 99 % Par rapport à la forme dégalactosylée	/	/	/	(Houde et al., 2010)
	Remodelage <i>in vitro</i>	HPLC	FcγRIIIa et FcγRIIa FcγRI	SPR/Chromatographie d'affinité	++ 0	Digalactosylation ≈ 84 % Par rapport à la forme dégalactosylée	ADCC /	Cellules NK /	++ /	(Thomann et al., 2015)
	Chimioenzymatique	MALDI-TOF SM	FcγRIIIa _{V158}	ELISA	++	Digalactosylation homogène Par rapport à la forme dégalactosylée	ADCC	Kit Promega (Cellules Jurkat)	0	(Kuroguchi et al., 2015)
	Remodelage <i>in vitro</i>	HPLC	FcγRIIIa et FcγRIIa/b FcγRI	SPR/Chromatographie d'affinité	++ 0	Digalactosylation ≈ 84 % Par rapport à la forme dégalactosylée	/	/	/	(Dashivets et al., 2015)
	Remodelage <i>in vitro</i>	MALDI-TOF-SM	FcγRIIIa/b, FcγRIIa/b FcγRI	SPR	++ 0	Digalactosylation homogène Par rapport à la forme dégalactosylée	/	/	/	(Subedi & Barb, 2016)
	Co-expression b4GT1 et inhibiteur (dégalactosylation avec 2FG)	nanoLC-ESI- QTOF-SM	FcγRIIIa _{F158/V158} FcγR (I, IIa/b, IIb) C1q	SPR ELISA	0 fucosylée ++ afucosylée 0 ++	Digalactosylation ≈ 80 % Par rapport à la forme dégalactosylée	ADCC /	Cellules NK /	0 fucosylée ++ fucosylée /	(Dekkers et al., 2017)

Sialylation (suite)	Remodelage <i>in vitro</i>	HPLC	FcγRIIb FcγR (IIIa, IIa et I)	SPR/Chromatographie d'affinité	+	Di-α2,6-sialylation ≈ 30% et mono-α2,6-sialylation ≈ 48 % Par rapport à la forme digalactosylée	/	/	/	(Dashivets et al., 2015)
	Remodelage <i>in vitro</i>	MALDI-TOF-SM	FcγR (IIIa/b, IIa/b et I)	SPR	0	Par rapport à la forme digalactosylée α2,6-sialylation : mélange de formes mono- et disialylés	/	/	/	(Subedi & Barb, 2016)
	Co-expression ST6GalI Remodelage <i>in vitro</i> avec ST6GalI	nanoLC-ESI- QTOF-SM	FcγRIIIa _{F158/V158/b} FcγR (I, IIa/b) C1q	SPR ELISA	- fucosylée -- afucosylée 0 +++	Di-α2,6-sialylation 50 % (fucosylée) et 30 % (afucosylée) Par rapport à la forme digalactosylée	ADCC /	Cellules NK /	- fucosylée afucosylée /	(Dekkers et al., 2017)
	Chimioenzymatique	CL-SM	FcγRIIIa _{F158/V158}	SPR/ELISA	0/-	Par rapport à la forme digalactosylée	ADCC	PBMC	0/-	(Li, T. et al., 2017)
	Chimioenzymatique	CL phase inverse- ESI-qTOF	FcγRIIIa	ELISA	0	α2,6-sialylation Par rapport à la forme digalactosylée	/	/	/	(Shivatare et al., 2018)
	Chimioenzymatique	HILIC	FcγRIIIa _{V158} FcRn C1q	SPR / Chromatographie d'affinité SPR	- 0/+ ++	Di-α2,6-sialylation > 90 % Par rapport à la forme digalactosylée / /	ADCC /	Cellules Jurkat /	- /	(Wada et al., 2019)

ANNEXE B – INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES DU CHAPITRE 5

SUPPLEMENTARY INFORMATION FOR:

Impact of IgG1 N-glycosylation on their interaction with Fc gamma receptors

Florian Cambay^{1,2}, Céline Raymond⁵, Denis Brochu⁴, Michel Gilbert⁴, The Minh Tu², Christiane Cantin², Anne Lenferink², Maxime Grail¹, Olivier Henry¹, Gregory De Crescenzo^{1*} and Yves Durocher^{2,3*}

¹Department of Chemical Engineering, Polytechnique Montréal; Montreal, Canada

²Human Health Therapeutics Research Center, National Research Council of Canada; Montreal, Canada

³Department of Biochemistry and Molecular Medicine; University of Montreal; Montreal, Canada

⁴Human Health Therapeutics Research Center, National Research Council of Canada; Ottawa, Canada

⁵Merck Biodevelopment, Martillac, France

*Corresponding authors: Yves.Durocher@cnrc-nrc.gc.ca and gregory.decrescenzo@polymtl.ca

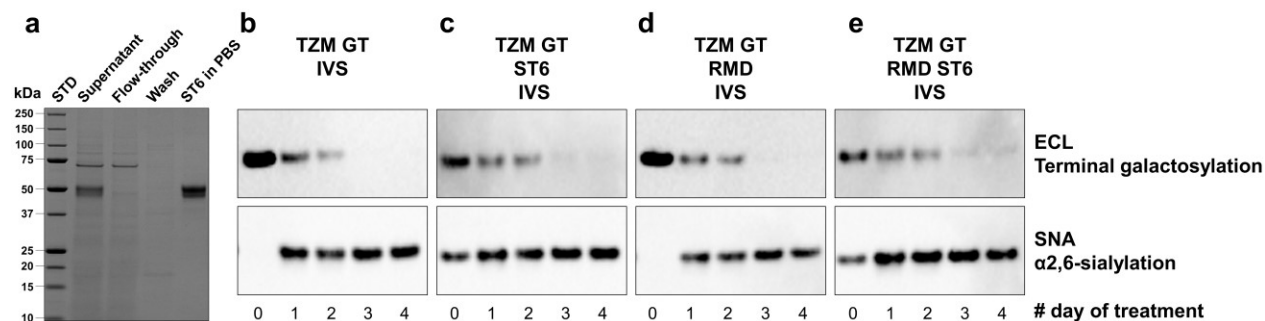


Figure annexe B - 1: Soluble ST6Gal1 purification and characterization. (a) SDS-PAGE analysis (non-reducing conditions) of soluble ST6Gal1 production and purification (Coomassie Blue staining). (b-e) *In vitro* sialylation (IVS) of TzM GT, TzM GTST6, TzM GTRMD and TzM GTRMDST6 was performed with the purified soluble human ST6Gal1. To assess terminal galactosylation and α2,6-sialylation levels during the *in vitro* sialylation process, ECL and SNA blots were performed under reducing conditions, respectively. Only the bands corresponding to the heavy chains of the antibodies are shown.

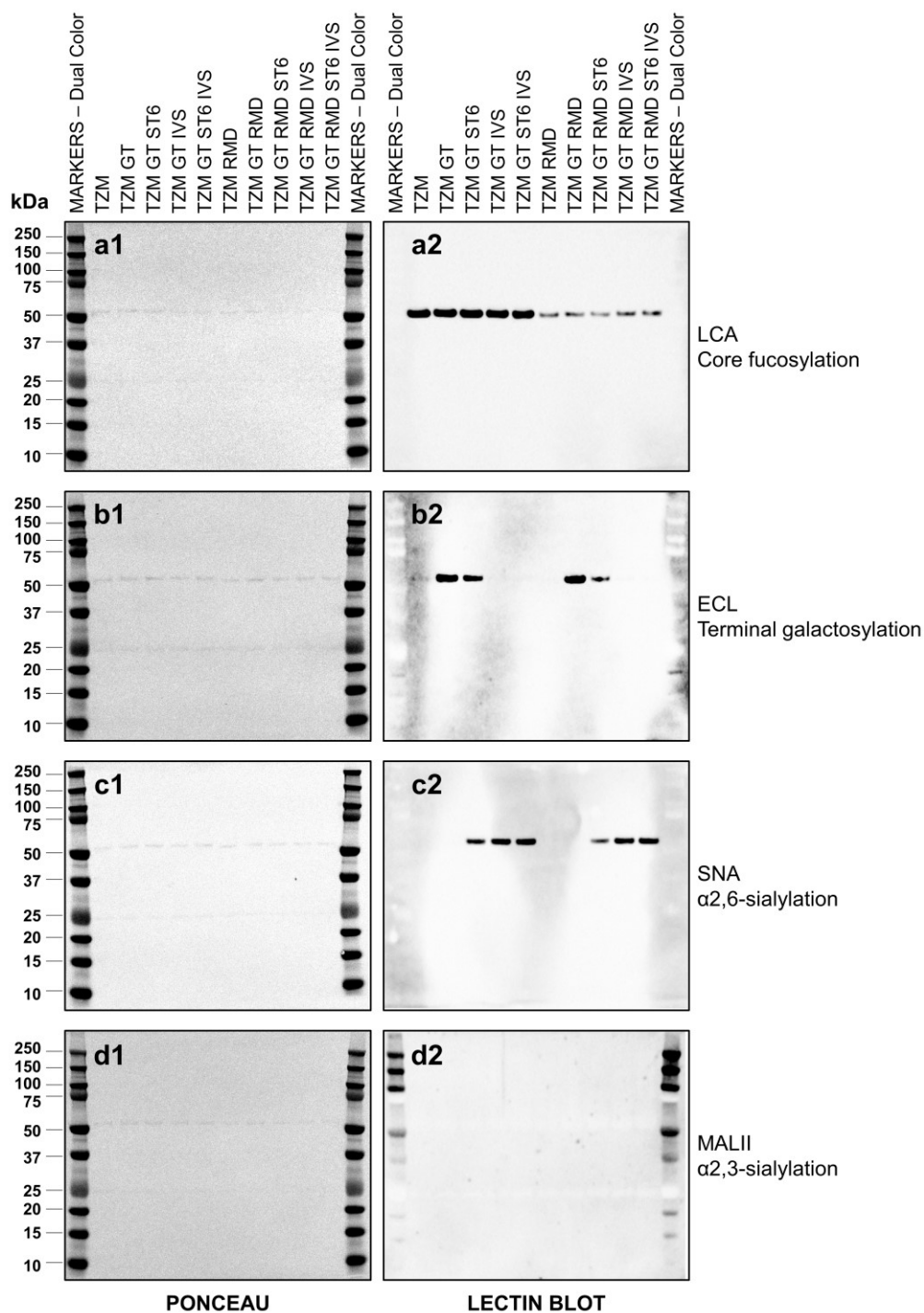


Figure annexe B - 2: Full-length lectin blots. The lectin blots were performed with purified TZM under reducing conditions. LCA (a), ECL (b), SNA (c) and MALII (d) were used to detect core fucosylation, terminal galactosylation, α 2,6-sialylation and α 2,3-sialylation respectively. Ponceau red staining was used to control the protein load.

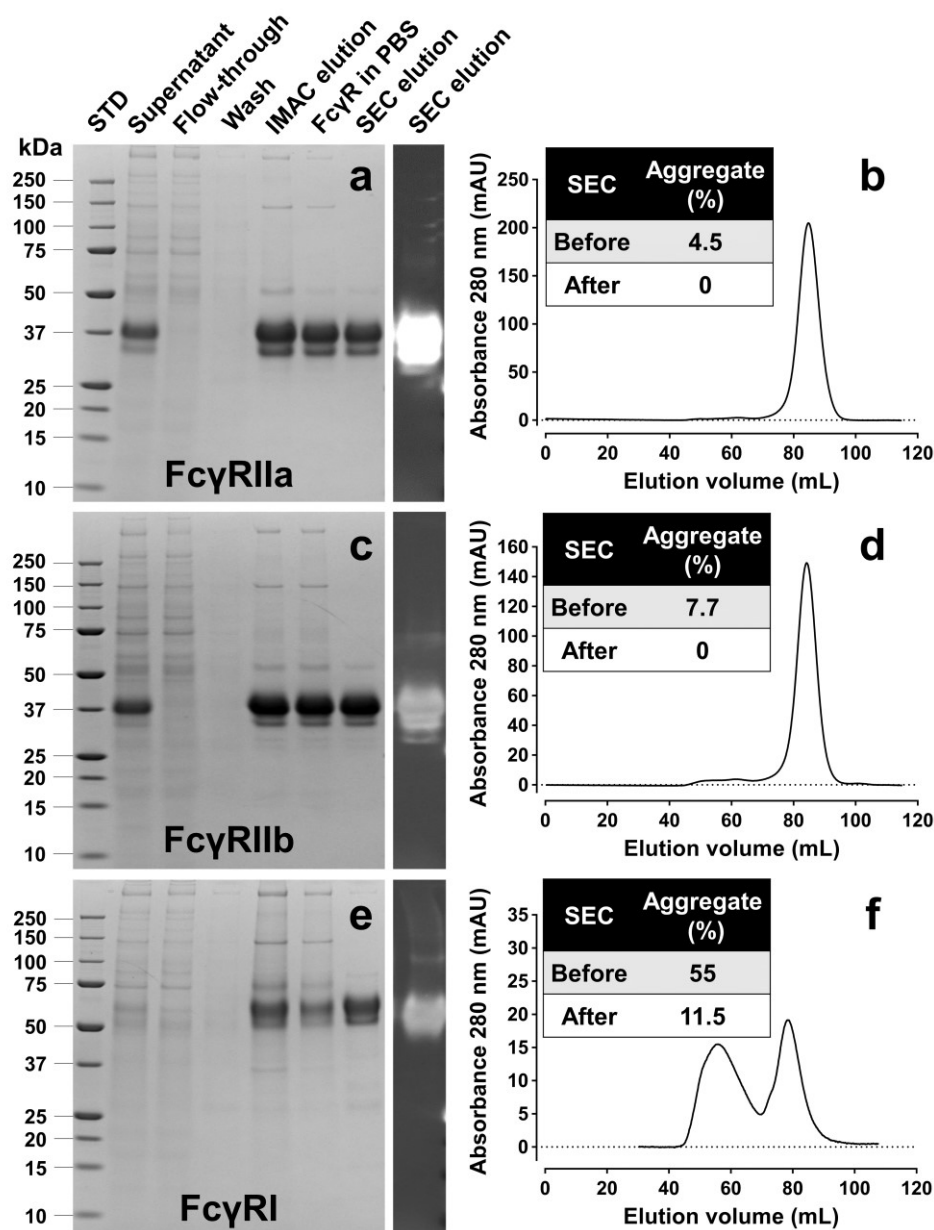


Figure annexe B - 3: E5-tagged FcγRs production and purification. SDS-PAGE analysis (non-reducing conditions) of E5-tagged FcγRIIa (a), E5-tagged FcγRIIb (c) and E5-tagged FcγRI (e) production and purification (Coomassie Blue staining or transfer to nitrocellulose membrane and probing with Penta-HisTM Alexa Fluor[®] 488 Conjugate). Chromatograms corresponding to the SEC of E5-tagged FcγRIIa (b), E5-tagged FcγRIIb (d) and E5-tagged FcγRI (f) using a HiLoad 16/600 Superdex 200 Prep grade. Fractions were pooled then aggregate contents were assessed by analytical SEC (see insets).

Table annexe B - 1: Apparent K_D values measured by our surface plasmon resonance assay.

	FcγRIIIa _{F158} *				FcγRIIIa _{V158} *				FcγRIIIa*				FcγRIIIb*				FcγRI**			
	CHO		HEK293		CHO		HEK293		CHO		HEK293		CHO		HEK293		CHO			
	K_D (nM)	SD	K_D (nM)	SD	K_D (nM)	SD	K_D (nM)	SD	K_D (nM)	SD	K_D (nM)	SD	K_D (nM)	SD	K_D (nM)	SD	K_{D1} (nM)	SD	K_{D2} (nM)	SD
TZM	3852 ± 116		3285 ± 198		879 ± 85		852 ± 144		1916 ± 257		1988 ± 322		4670 ± 407		5245 ± 315		0.19 ± 0.03		1.84 ± 0.24	
TZM GT	1878 ± 368		1608 ± 395		408 ± 74		373 ± 71		1573 ± 153		1639 ± 225		3971 ± 544		3671 ± 1630		0.13 ± 0.01		1.32 ± 0.11	
TZM GTST6	1747 ± 43		1466 ± 44		396 ± 44		358 ± 45		1545 ± 209		1508 ± 166		3651 ± 605		3947 ± 631		0.11 ± 0.01		1.15 ± 0.15	
TZM GTIVS	2055 ± 215		1664 ± 194		473 ± 62		422 ± 51		1816 ± 214		1794 ± 153		4174 ± 933		3853 ± 1733		0.14 ± 0.03		1.26 ± 0.07	
TZM GTST6IVS	2255 ± 37		1916 ± 19		473 ± 21		414 ± 14		1860 ± 161		1811 ± 91		4224 ± 854		3758 ± 1782		0.13 ± 0.01		1.15 ± 0.16	
TZM RMD	120 ± 17		100 ± 15		32 ± 6		27 ± 4		1952 ± 403		1915 ± 374		3435 ± 573		3741 ± 455		0.15 ± 0.04		1.42 ± 0.23	
TZM GTRMD	89 ± 8		76 ± 3		23 ± 4		19 ± 3		1610 ± 205		1598 ± 191		3097 ± 512		2774 ± 1289		0.14 ± 0.05		1.29 ± 0.31	
TZM GTRMDST6	85 ± 3		66 ± 6		22 ± 3		19 ± 2		1523 ± 163		1516 ± 103		2982 ± 302		2982 ± 648		0.14 ± 0.06		1.35 ± 0.41	
TZM GTRMDIVS	107 ± 14		85 ± 13		32 ± 6		26 ± 4		1835 ± 264		1811 ± 217		3378 ± 752		2975 ± 1621		0.14 ± 0.05		1.26 ± 0.49	
TZM GTRMDST6IVS	110 ± 13		87 ± 11		28 ± 1		22 ± 1		1857 ± 119		1833 ± 65		3405 ± 628		2898 ± 1616		0.14 ± 0.03		1.26 ± 0.31	

The K_D values provided here should be used to compare antibodies with one another but not as absolute values.

SD - Standard deviation

*- K_D values were obtained by steady-state affinity with a one-to-one binding model.

** - K_D values were obtained by globally fitting the data with a kinetic model that assumes that monomeric and aggregated FcγRI bind to TZM glycoforms with distinct kinetics.

Table annexe B - 2: EC₅₀ of the TZM glycoforms.

	EC ₅₀ (ng/mL)	
	FcyRIIIa _{F158}	FcyRIIIa _{V158}
Synagis	n.d.	n.d.
Herceptin	24.29	16.11
TZM ng	n.d.	n.d.
TZM	71.04	36.34
TZM GT	46.31	25.02
TZM GT ST6	35.01	20.21
TZM GT IVS	n.d.	22.67
TZM GT ST6 IVS	57.24	26.65
TZM RMD	22.22	9.215
TZM GT RMD	15.51	6.79
TZM GT RMD ST6	14.71	7.251
TZM GT RMD IVS	20.90	8.944
TZM GT RMD ST6 IVS	17.24	7.977

n.d.- not determined

ANNEXE C – INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES DU CHAPITRE 6

SUPPLEMENTARY INFORMATION FOR:

Glycosylation of Fcγ receptors influences their interaction with various IgG1 glycoforms

Florian Cambay^{1,2}, Catherine Forest-Nault^{1,2}, Lea Dumoulin¹, Alexis Seguin¹, Olivier Henry¹, Yves Durocher^{2,3} and Gregory De Crescenzo^{1*}

¹Department of Chemical Engineering, Polytechnique Montréal; Montreal, Canada

²Human Health Therapeutics Research Center, National Research Council of Canada; Montreal, Canada

³Department of Biochemistry and Molecular Medicine; University of Montreal; Montreal, Canada

*Corresponding author: gregory.decrescenzo@polymtl.ca

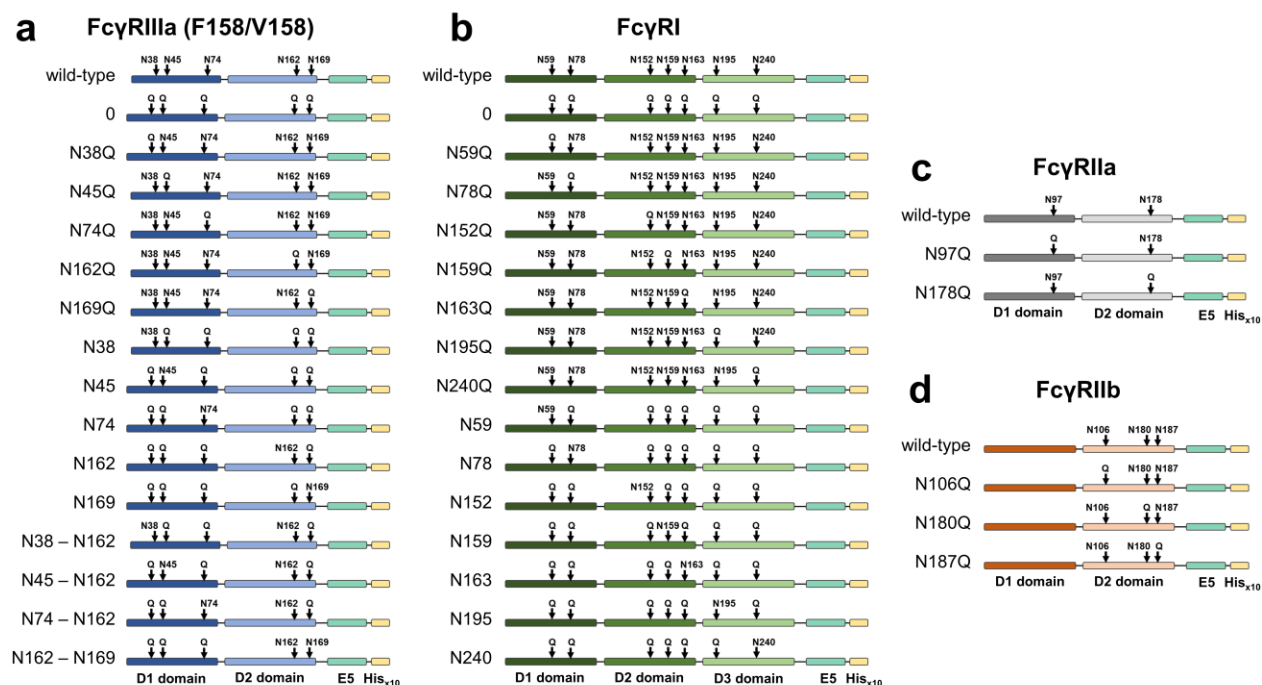


Figure annexe C - 1: Structures of the mutated coil-tagged FcγRs. Schematic representation of the coil-tagged FcγRIIIa_{F158/V158} (**a**), coil-tagged FcγRI (**b**), coil-tagged FcγRIIa (**c**) and coil-tagged FcγRIIb (**d**) expressed in this study. Arrows indicate the N-glycosylation sites of each FcγRs, and Qs represent the replacement of the asparagine of N-glycosylation sites into glutamine by site-directed mutagenesis.

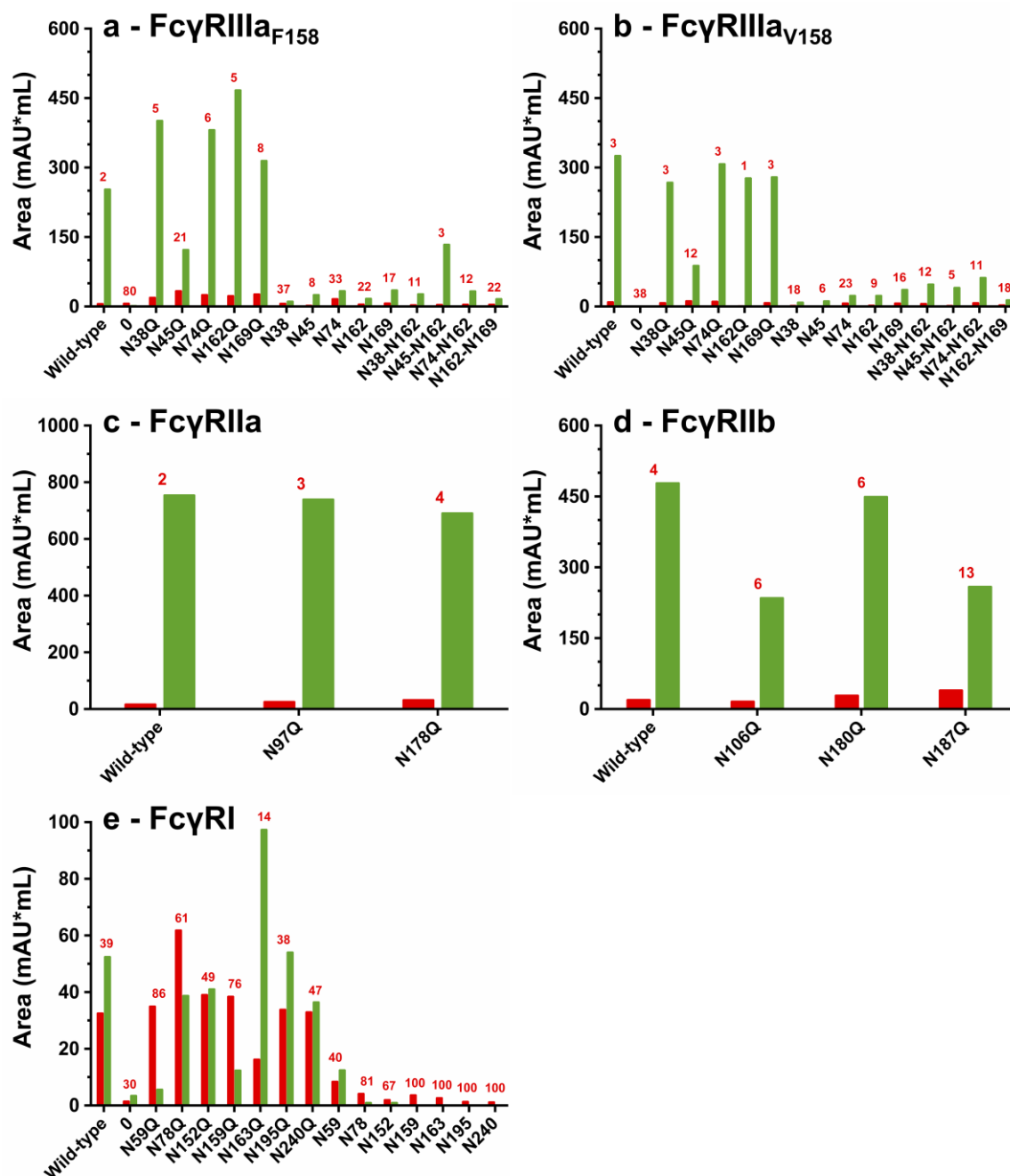


Figure annexe C - 2: Effect of removal of FcγRs N-glycosylation sites on expression and aggregation. The protein expression was assessed via the peaks areas. The area of the aggregate peak (Peak 1, red) and monomeric peak (Peak 2, green) of the mutants of coil-tagged FcγRIIIa_{F158} (a), coil-tagged FcγRIIIa_{V158} (b), coil-tagged FcγRIIa (c), coil-tagged FcγRIIb (d) and coil-tagged FcγRI (e) were calculated via the preparative SEC chromatograms. The aggregate rate of each mutant is shown above the corresponding column.

Table annexe C - 1: Effect of removal of FcγRs N-glycosylation sites on expression and aggregation. The elution volume, peak height and peak area have been measured for all peaks occurring on each SEC chromatogram.

Receptor	Mutant	Peak 1			Peak 2			Aggregate percentage (%)
		Elution volume (mL)	Height (mAU)	Area (mAU*mL)	Elution volume (mL)	Height (mAU)	Area (mAU*mL)	
FcγRIIIa _{F158}	wild-type	9.57	8.6	6.1	10.91	223	253.4	2.4
	0	9.46	3.5	6.9	12.92	1.2	1.7	80.5
	N38Q	9.66	24.4	19.6	11.30	360.9	401.5	4.7
	N45Q	9.67	45.5	33.7	10.98	124.8	122.8	21.5
	N74Q	9.65	34.6	25.5	11.28	393.6	381.7	6.3
	N162Q	9.74	30.3	23.2	11.26	443.2	467.4	4.7
	N169Q	9.66	38	26.9	11.08	303.4	315.0	7.9
	N38	9.52	7.3	6.8	12.14	7.5	11.4	37.2
	N45	9.61	1.3	2.3	12.38	23.7	25.5	8.1
	N74	9.63	19.4	16.5	12.10	28.8	33.7	32.8
	N162	9.55	6.5	5	12.02	15.7	17.2	22.4
	N169	9.59	8.8	7.2	12.23	35.9	35.5	16.9
	N38-N162	9.63	4.1	3.4	11.48	28	27.3	11
	N45-N162	9.61	4.2	4.2	11.88	119.1	134.1	3
	N74-N162	9.57	5.3	4.6	11.51	30.8	33.5	12.2
	N162-N169	9.52	4.4	4.7	11.74	14.1	16.6	22.1
FcγRIIIa _{V158}	wild-type	9.59	16.3	10	10.98	338.9	325.9	3
	0	9.48	0.7	0.1	12.76	1.4	0.1	38.5
	N38Q	9.96	12.3	8.2	11.38	254.8	268.1	3.0
	N45Q	9.69	17.3	12.2	10.99	93.5	88.5	12.1
	N74Q	9.61	13.4	11.2	11.28	304.3	308.1	3.5
	N162Q	9.73	6.7	1.3	11.18	321.7	277.4	0.5
	N169Q	9.68	11.3	8.1	11.09	231.6	279.7	2.8
	N38	9.54	2.2	2.1	12.08	7.4	9.2	18.3
	N45	9.84	0.7	0.8	12.31	10.7	12	6.3
	N74	9.42	8.8	7.2	11.94	20.9	23.7	23.4
	N162	9.71	2.3	2.5	12.14	19.7	23.8	9.4
	N169	9.44	8	7.2	12.12	35.6	36.5	16.5
	N38-N162	9.55	7	6.3	11.63	40.3	48.1	11.6
	N45-N162	9.8	1.9	2	11.77	38	41	4.7
	N74-N162	9.56	8.5	7.9	11.49	54.4	62.5	11.2
	N162-N169	9.51	3.6	3.2	11.73	11.7	14.2	18.3
FcγRIIIa	Wild-type	9.74	15.3	17.2	11.85	604	754.8	2.2
	N97Q	9.76	17.6	26.3	12.46	616.1	740.2	3.4
	N178Q	9.74	33.5	32.7	12.17	563.7	691.6	4.5
FcγRIIb	Wild-type	9.64	20.7	19.9	11.71	390.5	478.7	4.0
	N106Q	9.74	15.9	16.4	12.4	201.8	235.3	6.5
	N180Q	9.77	33.6	29.1	11.74	400.8	449.7	6.1
	N187Q	9.62	39.3	40.1	12.03	203.3	259.4	13.4
FcγRI	Wild-type	9.48	37.2	32.6	10.92	34.8	52.5	38.3
	0	9.41	1.7	1.5	11.1	2.3	3.5	29.8
	N59Q	9.46	42.9	35	-	6.2	5.7	86
	N78Q	9.54	66.7	61.9	11.22	23.8	38.8	61.5
	N152Q	9.54	48.1	39.1	11.33	25.7	41.1	48.8
	N159Q	9.54	41.5	38.5	10.86	10.6	12.4	75.7
	N163Q	9.58	21.3	16.3	11.07	66.5	97.4	14.3
	N195Q	9.52	37.9	33.9	11.23	34.1	54.1	38.5
	N240Q	9.46	38.9	33	11.17	24.1	36.5	47.5
	N59	9.77	9.2	8.5	11.34	7	12.5	40.5
	N78	9.44	4.8	4.2	11.29	0.9	1	81.2
	N152	9.48	2.1	2	11.45	0.9	1	66.6
	N159	9.5	4.2	3.7	-	-	0	100
	N163	9.55	3	2.7	-	-	0	100
	N195	9.52	1.7	1.4	-	-	0	100
	N240	9.51	1.4	1.2	-	-	0	100

Table annexe C - 2: Apparent K_D values measured by surface plasmon resonance for the interactions between mutated FcγRIIIa_{F158/V158} and trastuzumab glycoforms.

	FcγRIIIa _{F158}						FcγRIIIa _{V158}					
	TZM		TZM-gal		TZM-afuc		TZM		TZM-gal		TZM-afuc	
	K_D (nM)	SD	K_D (nM)	SD	K_D (nM)	SD	K_D (nM)	SD	K_D (nM)	SD	K_D (nM)	SD
wild-type	1912 ± 331		977 ± 231		133 ± 7		402 ± 87		199 ± 28		34 ± 4	
N38Q	1964 ± 361		992 ± 248		134 ± 1		460 ± 101		223 ± 34		35 ± 3	
N45Q	1024 ± 180		489 ± 122		64 ± 2		238 ± 43		113 ± 18		19 ± 2	
N74Q	1908 ± 329		980 ± 215		133 ± 2		450 ± 81		220 ± 28		35 ± 2	
N162Q	2796 ± 99		2168 ± 117		1581 ± 52		494 ± 38		387 ± 30		283 ± 6	
N169Q	1991 ± 334		981 ± 236		129 ± 3		418 ± 74		204 ± 22		31 ± 1	
N38	2197 ± 134		1729 ± 114		1292 ± 29		439 ± 36		338 ± 2		237 ± 35	
N45	3661 ± 122		2877 ± 163		2038 ± 164		764 ± 66		585 ± 15		425 ± 13	
N74	2417 ± 74		1719 ± 15		1449 ± 3		442 ± 45		335 ± 1		248 ± 2	
N162	922 ± 170		449 ± 116		61 ± 0		264 ± 53		125 ± 19		18 ± 1	
N169	2102 ± 50		1482 ± 26		1259 ± 12		376 ± 44		290 ± 2		223 ± 4	
N38-N162	978 ± 153		415 ± 88		61 ± 2		238 ± 25		137 ± 38		19 ± 1	
N45-N162	1774 ± 337		786 ± 174		116 ± 1		452 ± 49		195 ± 35		29 ± 2	
N74-N162	957 ± 158		410 ± 88		61 ± 2		212 ± 7		113 ± 32		15 ± 2	
N162-N169	1180 ± 199		502 ± 107		73 ± 2		262 ± 7		142 ± 36		22 ± 1	

SD - Standard deviation

K_D values were obtained by steady-state affinity with a one-to-one binding model.

Table annexe C - 3: Apparent K_D values measured by surface plasmon resonance for the interactions between FcγRIIa/b mutants and trastuzumab glycoforms.

Receptor	Variant	TZM		TZM-gal		TZM-afuc	
		K_D (nM)	SD	K_D (nM)	SD	K_D (nM)	SD
FcγRIIa	wild-type	1422 ± 18		1263 ± 92		1525 ± 79	
	N97Q	1581 ± 30		1435 ± 129		1717 ± 93	
	N178Q	1542 ± 43		1394 ± 91		1636 ± 84	
FcγRIIb	wild-type	3949 ± 62		3527 ± 227		2778 ± 107	
	N106Q	4644 ± 95		4229 ± 320		3329 ± 128	
	N180Q	4516 ± 34		3947 ± 211		3147 ± 88	
	N187Q	5846 ± 57		5281 ± 321		3984 ± 279	

SD - Standard deviation

K_D values were obtained by steady-state affinity with a one-to-one binding model.

Table annexe C - 4: Apparent K_D values measured by surface plasmon resonance for the interactions between FcγRI mutants and trastuzumab glycoforms.

FcγRI variant	K_{D1}			K_{D2}		
	TZM	TZM-gal	TZM-afuc	TZM	TZM-gal	TZM-afuc
	K_{D1} (pM) SD	K_{D1} (pM) SD	K_{D1} (pM) SD	K_{D2} (pM) SD	K_{D2} (pM) SD	K_{D2} (pM) SD
wild-type	834 ± 31	840 ± 8	928 ± 36	99 ± 4	86 ± 4	98 ± 0
N59Q	1957 ± 355	2717 ± 692	6964 ±	40 ± 8	10 ± 14	1 ±
N78Q	977 ± 1	844 ± 109	947 ± 143	129 ± 3	118 ± 2	121 ± 4
N152Q	884 ± 1	858 ± 49	827 ± 59	113 ± 0	97 ± 7	109 ± 15
N159Q	1037 ± 30	943 ± 73	931 ± 72	150 ± 9	128 ± 5	141 ± 9
N163Q	780 ± 11	718 ± 15	711 ± 40	110 ± 3	97 ± 4	110 ± 9
N195Q	886 ± 24	826 ± 13	783 ± 5	122 ± 5	110 ± 1	127 ± 10
N240Q	846 ± 0,3	775 ± 37	737 ± 27	112 ± 5	105 ± 2	109 ± 4

SD - Standard deviation

K_D values were obtained by globally fitting the data with a kinetic model that assumes that monomeric and aggregated FcγRI bind to trastuzumab glycoforms with distinct kinetics.

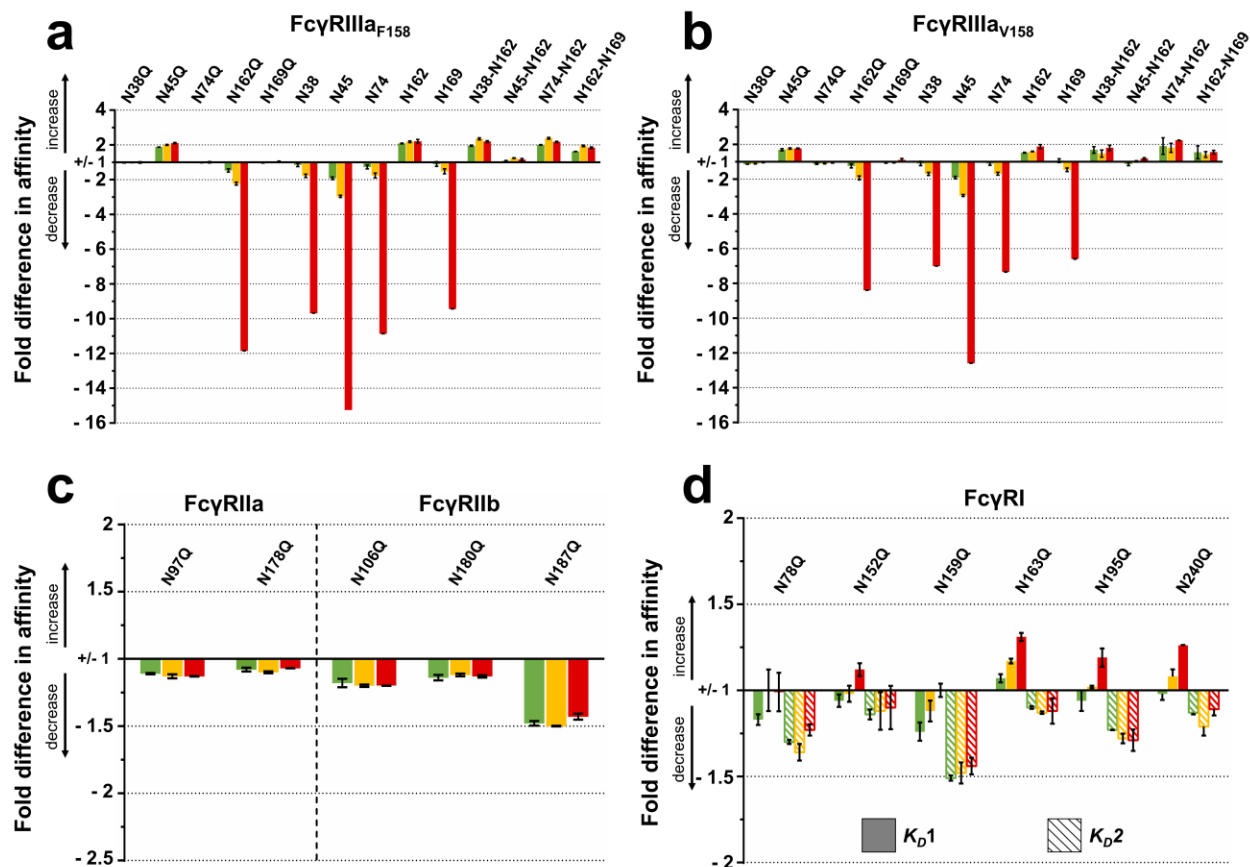


Figure annexe C - 3: Influence of FcγRs N-glycosylation sites on trastuzumab glycoforms affinity. The relative impact of the serial mutations of FcγRIIIa_{F158} (a), FcγRIIIa_{V158} (b), FcγRIIa/b (c) and FcγRI (d) on the affinity for TzM (green), TzM-gal (yellow) or TzM-afuc (red). The ratios are representative of at least 2 independent experiments and SD are shown.

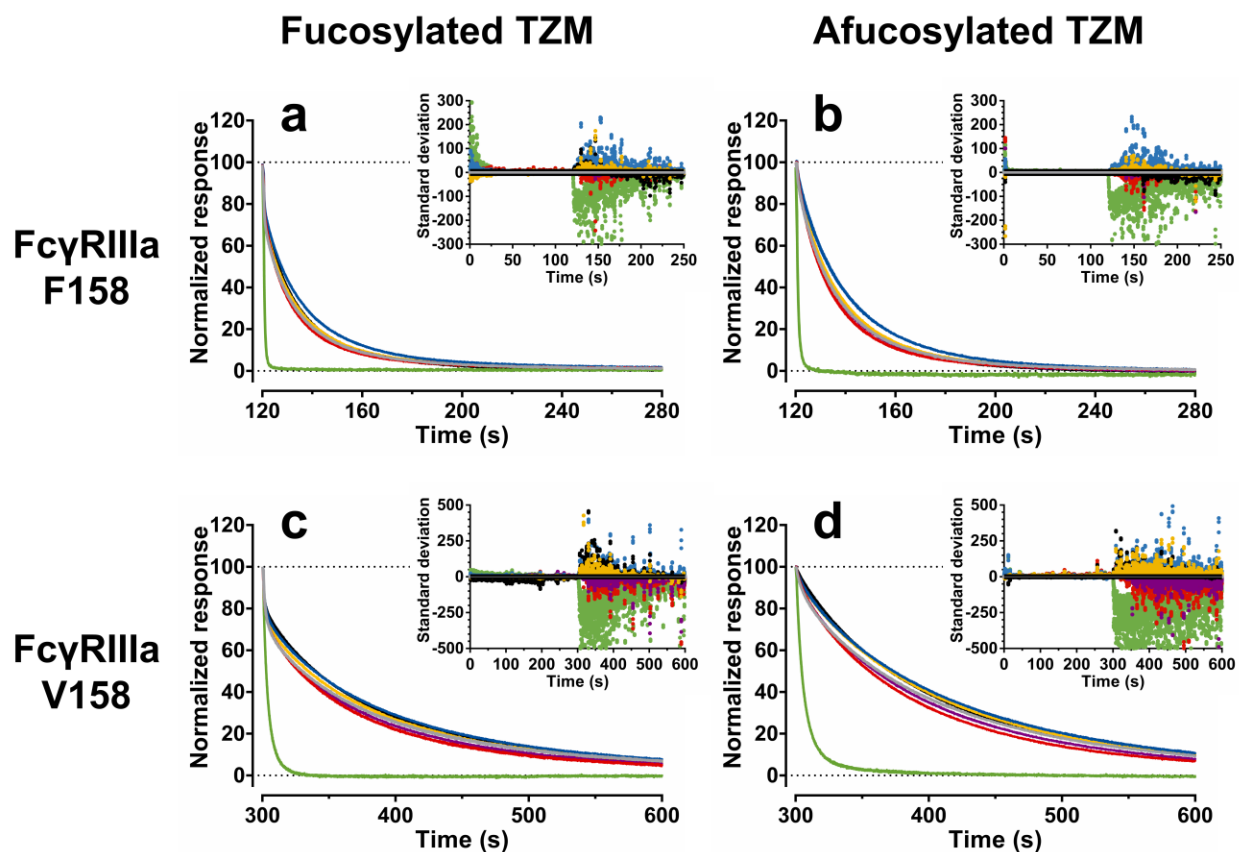


Figure annex C - 4: Influence of FcγRIIIa N-glycosylation sites on binding to trastuzumab glycoforms binding. Overlay of normalized control-corrected sensorgrams (dissociation phases) corresponding to the interactions between coil-tagged FcγRIIIa mutants (FcγRIIIa_{F158} (**a,b**) and FcγRIIIa_{V158} (**c,d**)) and injected fucosylated TzM (left column) (FcγRIIIa_{F158}: 4,000 nM and FcγRIIIa_{V158}: 2,000 nM) or afucosylated TzM (right column) (FcγRIIIa_{F158}: 2,000 nM and FcγRIIIa_{V158}: 1,000 nM) in triplicate. Grey: wild-type. Red: N38Q; Blue: N45Q; Purple: N74Q; Green: N162Q; Yellow: N169Q and Black: N45-N162. Deviation plots on an SD versus time scale are shown in the inset. The standard data (wild-type FcγRIIIa – grey) fall between the sensorgram comparison window (in this case ± 10 SD). The dotted line indicates that the figure displays normalized response data.

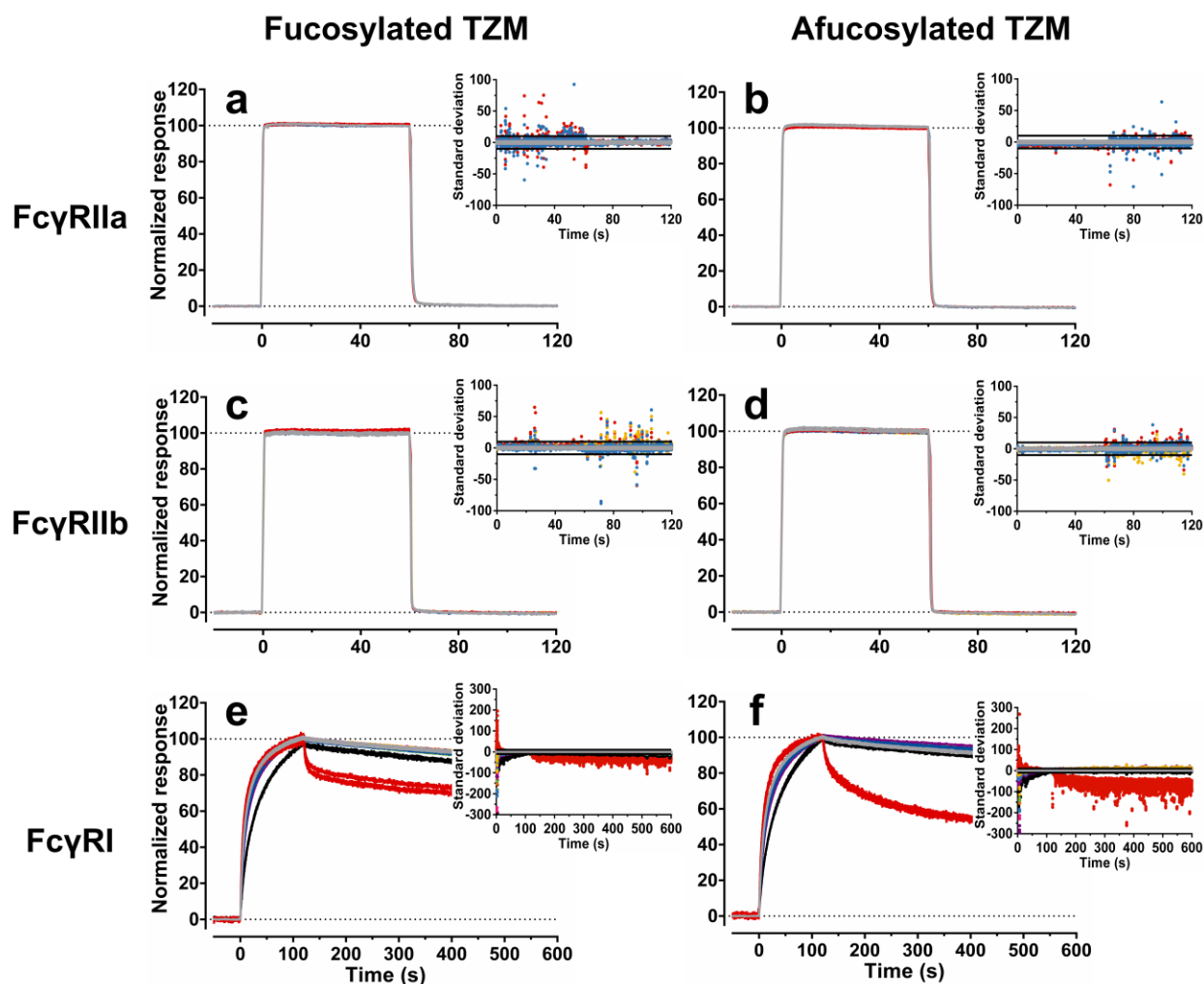


Figure annex C - 5: Influence of FcγRIIa/b and FcγRI N-glycosylation sites on binding to trastuzumab glycoforms binding. Overlay of normalized control-corrected sensorgrams corresponding to the interactions between coil-tagged FcγRs mutants (FcγRIIa (**a,b**), FcγRIIb (**c,d**), FcγRI (**e,f**)) and injected fucosylated TzM (left column) or afucosylated TzM (right column) (FcγRIIa/b: 5000 nM and FcγRI: 100 nM) in triplicate. For FcγRIIa: Grey: wild-type; Red: N97Q and Blue: N178Q (**a,b**). For FcγRIIb: Grey: wild-type; Red: N106Q; Blue: N180Q and Yellow: N187Q (**c,d**). For FcγRI: Grey: wild-type; Red: N59Q; Blue: N78Q; Purple: N152Q; Green: N159Q; Yellow: N163Q; Pink: N195Q; Orange: N240Q and Black: N59 (**e,f**). Deviation plots on an SD versus time scale are shown in the inset. The standard data (wild-type FcγRs – grey) fall between the sensorgram comparison window (in this case ± 10 SD). The dotted line indicates that the figure displays normalized response data.

Table annexe C - 5: Similarity scores of mutated FcγRs compared to wild-type FcγRs.

Receptor	Mutant	IgG1 glycoform						Time interval used to calculate the similarity score
		TZM		TZM-gal		TZM-afuc		
		Mean (%)	SD	Mean (%)	SD	Mean (%)	SD	
FcγRIIIa F158	N38Q	79.53 ± 1.79		95.15 ± 0.83		90.56 ± 1.78		120 s to 250 s
	N45Q	61.19 ± 1.13		57.94 ± 2.33		61.66 ± 1.61		
	N74Q	99.24 ± 0.31		99.41 ± 0.05		97.43 ± 0.2		
	N162Q	10.55 ± 1.33		21.93 ± 1.59		6.01 ± 0.34		
	N169Q	95.13 ± 1.2		95.91 ± 0.54		96.42 ± 0.56		
	N38	24.68 ± 1.39		31.31 ± 1.32		18.4 ± 1.33		
	N45	4.91 ± 0.63		18.32 ± 1.15		7.95 ± 0.88		
	N74	2.89 ± 0.27		21.02 ± 2.35		9.43 ± 0.53		
	N162	44.71 ± 0.28		52.13 ± 1.81		51.64 ± 1.69		
	N169	1.5 ± 0.09		18.66 ± 0.42		10.75 ± 1.05		
	N38-N162	57.68 ± 1.2		48.78 ± 1.43		44.41 ± 1.59		
	N45-N162	79.75 ± 1.23		92.91 ± 1.24		93.72 ± 0.48		
	N74-N162	67.01 ± 1.04		59.83 ± 1.17		71.76 ± 0.41		
	N162-N169	86.71 ± 0.4		94.32 ± 1.45		85.01 ± 0.71		
FcγRIIIa V158	N38Q	67.28 ± 3.33		80.03 ± 2.36		30.58 ± 0.23		300 s to 600 s
	N45Q	65.09 ± 0.35		45.69 ± 3.04		36.19 ± 0.95		
	N74Q	89.18 ± 1.61		99.09 ± 0.19		64.34 ± 1.35		
	N162Q	1.56 ± 0.01		1.09 ± 0.05		0.38 ± 0.05		
	N169Q	89.87 ± 0.94		67.73 ± 6.08		60.83 ± 0.33		
	N38	1.7 ± 0.01		1.16 ± 0.01		0.42 ± 0.0006		
	N45	1.56 ± 0.01		1.07 ± 0.004		0.32 ± 0.02		
	N74	1.67 ± 0.01		1.14 ± 0.01		0.38 ± 0.0005		
	N162	65.46 ± 0.89		32.33 ± 1.19		16.79 ± 0.78		
	N169	1.7 ± 0.01		1.18 ± 0.01		0.33 ± 0.02		
	N38-N162	35.9 ± 2.4		20.3 ± 0.79		6.78 ± 0.26		
	N45-N162	72.41 ± 0.15		75.01 ± 0.7		65.67 ± 0.46		
	N74-N162	37.65 ± 0.74		26.93 ± 0.65		7.15 ± 0.23		
	N162-N169	90.51 ± 0.54		96.73 ± 0.87		81.08 ± 1.28		
FcγRIIa	N97Q	99.79 ± 0.07		88.79 ± 3.02		99.35 ± 0.3		60 s to 120 s
	N178Q	99.98 ± 0.02		93.19 ± 0.37		98.96 ± 0.15		
FcγRIIb	N106Q	98.61 ± 0.65		99.85 ± 0.26		98.72 ± 0.41		60 s to 120 s
	N180Q	98.96 ± 0.18		100 ± 0		99.15 ± 0.17		
	N187Q	98.42 ± 0.74		99.39 ± 1.01		98.45 ± 0.4		
FcγRI	N59Q	12.88 ± 2.42		3.95 ± 0.42		3.94 ± 0.23		120 s to 600 s
	N78Q	100 ± 0		99.96 ± 0.06		99.99 ± 0.01		
	N152Q	100 ± 0		99.54 ± 0.61		99.5 ± 0.65		
	N159Q	100 ± 0.01		99.96 ± 0.05		99.95 ± 0.09		
	N163Q	100 ± 0		99.94 ± 0.06		99.7 ± 0.42		
	N195Q	100 ± 0		99.91 ± 0.12		99.83 ± 0.23		
	N240Q	100 ± 0		99.7 ± 0.41		99.93 ± 0.01		
	N59	96.14 ± 1.84		96.47 ± 2.92		99.98 ± 0.04		

A sensorgram comparison window of ± 10 SD was used to calculate similarity scores.

Only similarity scores from dissociation phases are displayed.

The color scale was used to describe similarity scores: Red: < 25 %; Green: 25 % to 50 %; Black > 50 %.

Table annexe C - 6: Apparent K_D values measured by surface plasmon resonance for the interactions between wild-type FcγRs glycoforms and trastuzumab glycoforms.

Receptor	Glycoform	TzM		TzM-gal		TzM-afuc	
		K_D (nM)	SD	K_D (nM)	SD	K_D (nM)	SD
FcγRIIIa _{F158}	Unmodified	1838 ± 263		929 ± 111		146 ± 16	
	High-mannose	1109 ± 248		557 ± 119		94 ± 10	
	Hybrid	1776 ± 263		901 ± 109		136 ± 18	
	Afucosylated	1833 ± 252		932 ± 106		142 ± 19	
	Agalactosylated	1799 ± 355		1008 ± 182		185 ± 21	
	Desialylated	1403 ± 281		718 ± 145		107 ± 24	
	α2,6-sialylated	1177 ± 169		547 ± 63		97 ± 15	
FcγRIIIa _{V158}	Unmodified	471 ± 98		234 ± 33		38 ± 8	
	High-mannose	358 ± 98		173 ± 43		28 ± 8	
	Hybrid	484 ± 105		241 ± 39		38 ± 8	
	Afucosylated	483 ± 103		236 ± 39		38 ± 8	
	Agalactosylated	487 ± 121		276 ± 63		59 ± 13	
	Desialylated	446 ± 122		227 ± 53		34 ± 9	
	α2,6-sialylated	346 ± 79		155 ± 27		30 ± 7	
FcγRIIa	Unmodified	1231 ± 273		1178 ± 348		1355 ± 136	
	High-mannose	1214 ± 274		1153 ± 353		1281 ± 215	
	Hybrid	1244 ± 256		1171 ± 335		1331 ± 158	
	Afucosylated	1276 ± 248		1205 ± 335		1380 ± 148	
	Agalactosylated	1240 ± 289		1185 ± 390		1368 ± 216	
	Desialylated	1241 ± 289		1183 ± 348		1358 ± 185	
	α2,6-sialylated	1225 ± 255		1164 ± 321		1348 ± 151	
FcγRIIb	Unmodified	3695 ± 742		3617 ± 878		2666 ± 752	
	High-mannose	3588 ± 489		3539 ± 544		2536 ± 498	
	Hybrid	3358 ± 424		3299 ± 547		2387 ± 479	
	Afucosylated	3478 ± 406		3433 ± 522		2461 ± 432	
	Agalactosylated	3869 ± 492		3865 ± 769		2815 ± 619	
	Desialylated	3692 ± 544		3595 ± 738		2668 ± 582	
	α2,6-sialylated	3402 ± 492		3330 ± 576		2391 ± 513	
FcγRI K _D 1	Unmodified	194 ± 136		170 ± 121		188 ± 111	
	High-mannose	222 ± 73		306 ± 243		327 ± 258	
	Hybrid	266 ± 237		206 ± 172		221 ± 181	
	Afucosylated	200 ± 145		227 ± 205		170 ± 108	
	Agalactosylated	245 ± 139		260 ± 184		216 ± 123	
	Desialylated	281 ± 208		247 ± 163		276 ± 186	
	α2,6-sialylated	n.d		n.d		n.d	
FcγRI K _D 2	Unmodified	1773 ± 1230		1556 ± 947		1639 ± 858	
	High-mannose	2385 ± 1762		2176 ± 1445		2123 ± 1363	
	Hybrid	1849 ± 1541		1686 ± 1287		1693 ± 1313	
	Afucosylated	2252 ± 2095		1880 ± 1580		1852 ± 1714	
	Agalactosylated	2293 ± 1547		2204 ± 1506		1857 ± 1222	
	Desialylated	2219 ± 1650		1986 ± 1356		1840 ± 1275	
	α2,6-sialylated	n.d		n.d		n.d	

n.d.: not determined

SD - Standard deviation

Table annexe C - 7: Apparent K_D values measured by surface plasmon resonance for the interactions between mutated FcγRIIIa_{V158} glycoforms and trastuzumab glycoforms.

Receptor	Glycoform	TZM		TZM-afuc	
		K_D (nM)	SD	K_D (nM)	SD
FcγRIIIa_{V158} N38	Unmodified	719 ± 10		393 ± 13	
	High-mannose	733 ± 26		397 ± 10	
	Hybrid	703 ± 5		390 ± 15	
	Afucosylated	699 ± 13		389 ± 11	
	Agalactosylated	735 ± 9		408 ± 9	
FcγRIIIa_{V158} N45	Unmodified	840 ± 13		430 ± 26	
	High-mannose	799 ± 36		404 ± 34	
	Hybrid	809 ± 24		410 ± 31	
	Afucosylated	737 ± 12		387 ± 17	
	Agalactosylated	716 ± 11		355 ± 26	
FcγRIIIa_{V158} N74	Unmodified	683 ± 61		333 ± 11	
	High-mannose	732 ± 73		345 ± 4	
	Hybrid	698 ± 72		343 ± 8	
	Afucosylated	696 ± 59		346 ± 2	
	Agalactosylated	714 ± 85		351 ± 8	
FcγRIIIa_{V158} N162	Unmodified	412 ± 4		33 ± 3	
	High-mannose	375 ± 31		30 ± 0	
	Hybrid	395 ± 38		33 ± 0	
	Afucosylated	397 ± 75		35 ± 1	
	Agalactosylated	470 ± 3		43 ± 5	
FcγRIIIa_{V158} N169	Unmodified	627 ± 18		298 ± 14	
	High-mannose	673 ± 1		320 ± 17	
	Hybrid	631 ± 14		307 ± 21	
	Afucosylated	605 ± 19		292 ± 10	
	Agalactosylated	692 ± 32		330 ± 17	
FcγRIIIa_{V158} N45-N162	Unmodified	452 ± 49		36 ± 4	
	High-mannose	407 ± 18		34 ± 4	
	Hybrid	465 ± 6		38 ± 4	
	Afucosylated	458 ± 3		38 ± 4	
	Agalactosylated	520 ± 2		48 ± 4	

SD - Standard deviation

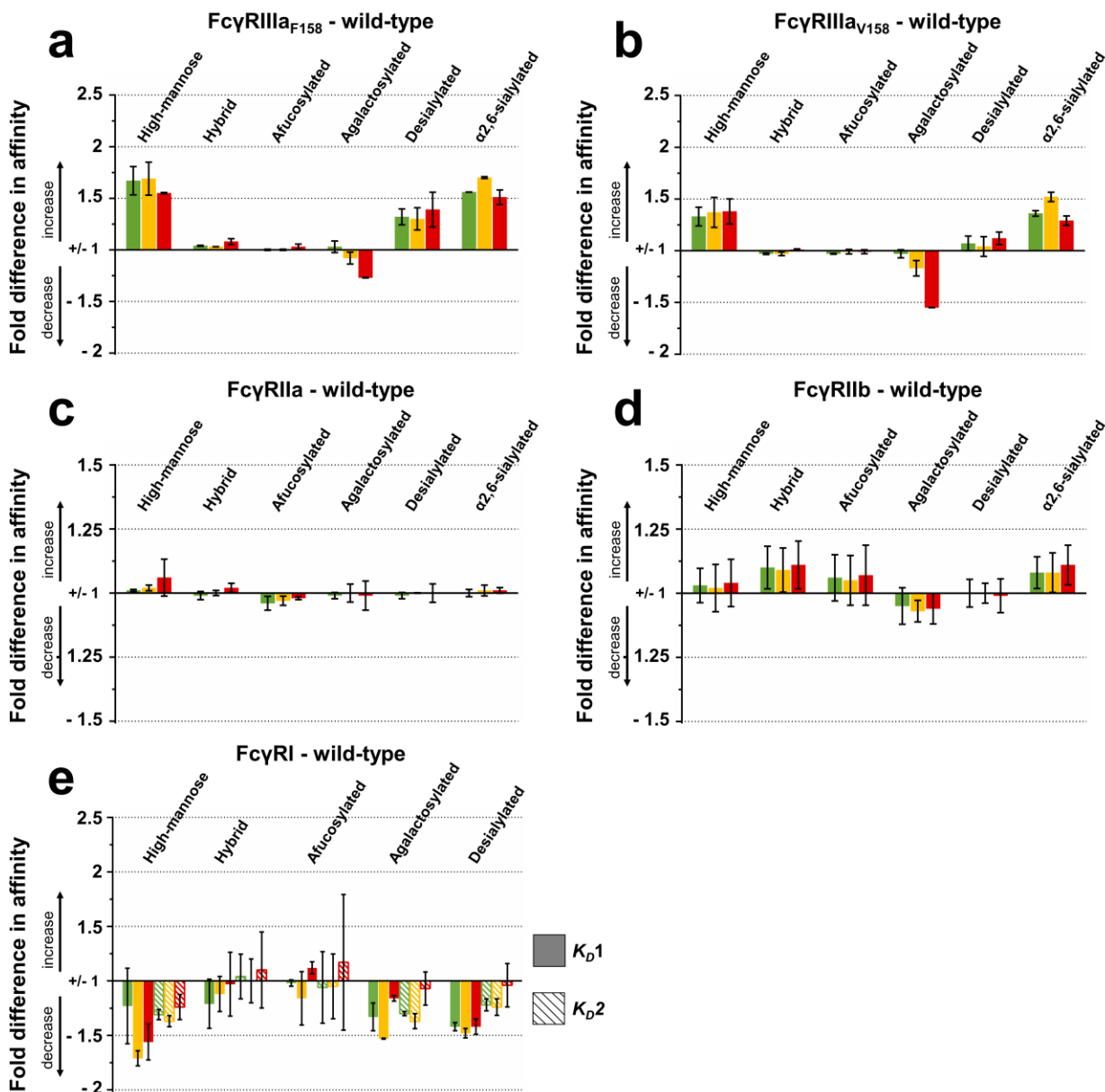


Figure annexe C - 6: Influence of the N-glycan profile of wild-type FcγRs upon various trastuzumab glycoforms binding. The impact of the N-glycan profile of glycoforms of coil-tagged wild-type FcγRIIIa_{F158} (a), wild-type FcγRIIIa_{V158} (b), wild-type FcγRIIa (c), wild-type FcγRIIb (d) and wild-type FcγRI (e) on agalactosylated TZM (green, TZM), galactosylated TZM (yellow, TZM-gal) and afucosylated TZM (red, TZM-afuc) binding affinity. The impact is shown as relative difference in affinity compared to unmodified FcγRs. At least 2 independent experiments for each condition were performed and the standard deviations (SD) are shown.

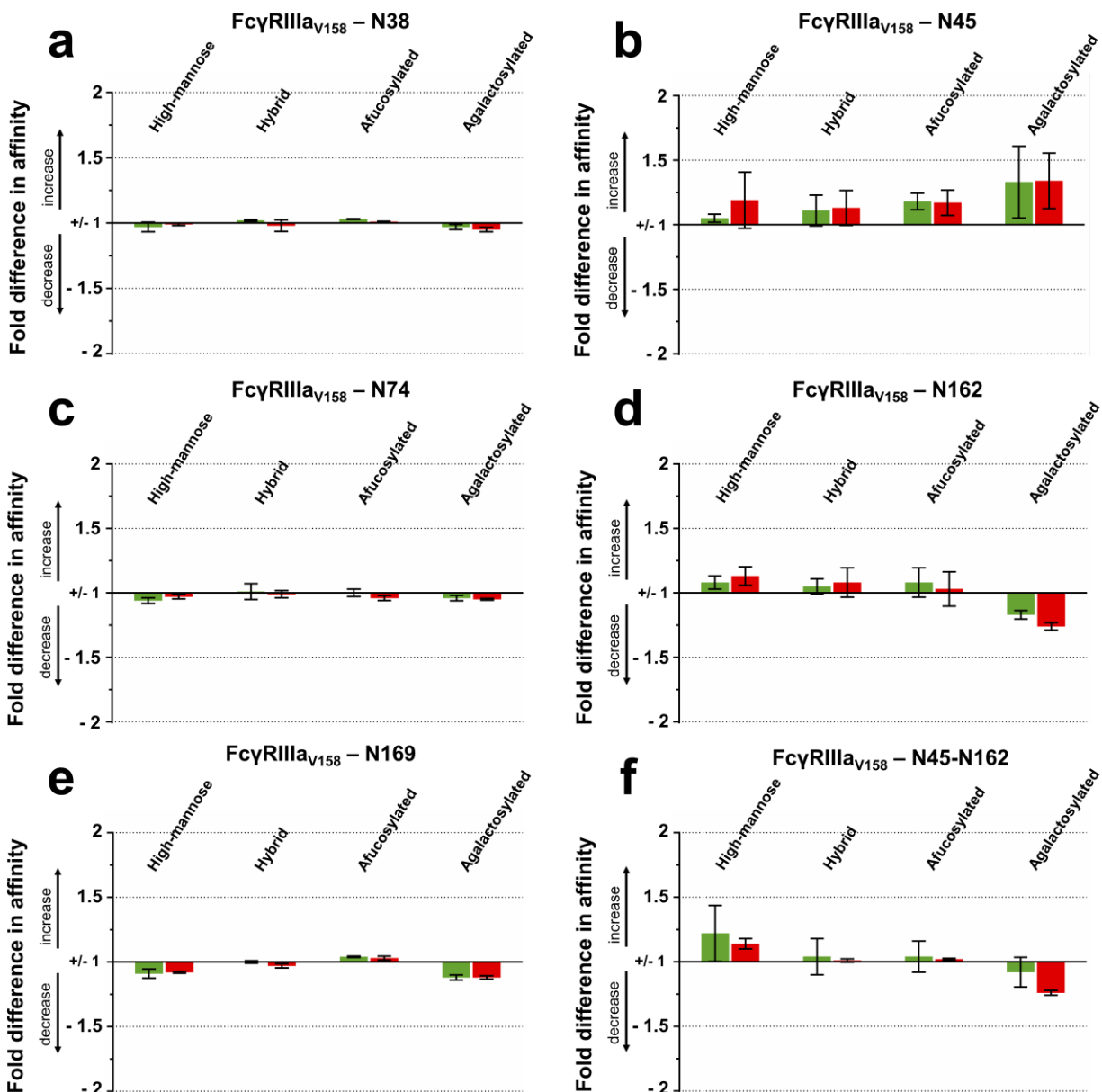


Figure annexe C - 7: Influence of the N-glycan profile of mutated $Fc\gamma RIIIa_{V158}$ upon various trastuzumab glycoforms binding. The impact of the N-glycan profile of coil-tagged $Fc\gamma RIIIa_{V158}$ mutants glycoforms ($Fc\gamma RIIIa_{V158}$ -N38 (a), $Fc\gamma RIIIa_{V158}$ -N45 (b), $Fc\gamma RIIIa_{V158}$ -N74 (c), $Fc\gamma RIIIa_{V158}$ -N162 (d), $Fc\gamma RIIIa_{V158}$ -N169 (e) and $Fc\gamma RIIIa_{V158}$ -N45-N162 (f)) on agalactosylated TzM (green, TzM) and afucosylated TzM (red, TzM-afuc) binding affinity. The impact is shown as relative difference in affinity compared to unmodified $Fc\gamma RIIIa_{V158}$ mutants. At least 2 independent experiments for each condition were performed and the standard deviations (SD) are shown.

Table annexe C - 8: Similarity scores of FcγRs glycoforms compared to unmodified FcγRs.

Receptor	Mutant	Antibody glycoform	Receptor glycoform											
			High-mannose		Hybride		Afucosylated		Agalactosylated		Desialylated		α2,6-sialylated	
			Mean (%)	SD	Mean (%)	SD	Mean (%)	SD	Mean (%)	SD	Mean (%)	SD	Mean (%)	SD
FcγRIIIa F158	Wild-type	TZM	8.95 ± 0.49		97.4 ± 0.36		86.08 ± 1.47		45.15 ± 1.24		37.8 ± 1.86		43.77 ± 2.21	
		TZM-gal	6.86 ± 0.34		91.07 ± 1.08		99.08 ± 0.24		73.6 ± 0.15		24 ± 0.39		40.49 ± 0.35	
		TZM-afuc	2.73 ± 0.2		87.07 ± 1.36		86.18 ± 1.55		59.45 ± 0.02		14.28 ± 1.06		29.71 ± 1.15	
FcγRIIIa V158	Wild-type	TZM	2.27 ± 0.03		98.05 ± 0.63		93.64 ± 0.61		14.35 ± 1.33		12.14 ± 0.81		8.97 ± 0.21	
		TZM-gal	6.88 ± 0.17		99.44 ± 0.11		99.74 ± 0.06		37.32 ± 3.85		39.22 ± 2.02		23.85 ± 1.1	
		TZM-afuc	2.46 ± 0.02		97.1 ± 0.49		92.64 ± 1.58		8.8 ± 0.31		7.93 ± 0.21		11.96 ± 0.57	
FcγRIIa	Wild-type	TZM	97.81 ± 0.96		98.28 ± 0.7		99.26 ± 0.03		98.38 ± 0.34		99.19 ± 0.2		98.61 ± 0.45	
		TZM-gal	98.51 ± 0.28		97.64 ± 1.25		98.23 ± 1.4		99.19 ± 0.28		98.12 ± 0.49		99.46 ± 0.24	
		TZM-afuc	93.94 ± 0.46		92.4 ± 1.21		88.64 ± 8.37		92.98 ± 0.17		92.78 ± 0.75		93.98 ± 0.51	
FcγRIIb	Wild-type	TZM	99.22 ± 0.01		98.98 ± 0.14		99.02 ± 0.27		98.86 ± 0.43		99.26 ± 0.34		99.29 ± 0.24	
		TZM-gal	98.79 ± 0.31		97.73 ± 0.34		98.75 ± 0.18		97.45 ± 1.21		98.1 ± 1.35		99.22 ± 0.39	
		TZM-afuc	99.44 ± 0.35		99.34 ± 0.22		99.42 ± 0.07		99.31 ± 0.36		99.15 ± 0.6		99.14 ± 0.19	
FcγRI	Wild-type	TZM	100 ± 0		100 ± 0		100 ± 0		100 ± 0		100 ± 0		100 ± 0	
		TZM-gal	98.29 ± 2.36		96.68 ± 3.41		92.57 ± 10.24		94.18 ± 3.75		96.4 ± 3.27		70.99 ± 5.3	
		TZM-afuc	93.67 ± 5.84		90.36 ± 1.83		67.53 ± 4.14		91.84 ± 11.32		89.05 ± 7.05		98.19 ± 1.17	
FcγRIIIa V158	N38	TZM	100 ± 0		99.99 ± 0.01		100 ± 0		100 ± 0		n.d.		n.d.	
		TZM-afuc	98.63 ± 0.44		98.86 ± 0.29		98.32 ± 0.36		97.72 ± 0.73		n.d.		n.d.	
	N45	TZM	57.51 ± 0.94		79.41 ± 1.56		75.03 ± 1.7		57.95 ± 1.17		n.d.		n.d.	
		TZM-afuc	39.25 ± 1.53		56.16 ± 2.88		66.57 ± 5.48		40.57 ± 0.66		n.d.		n.d.	
	N74	TZM	99.87 ± 0.11		98.34 ± 0.61		99.09 ± 0.37		99.88 ± 0.02		n.d.		n.d.	
		TZM-afuc	99.1 ± 0.34		98.81 ± 0.96		96.33 ± 1.55		97.69 ± 0.76		n.d.		n.d.	
	N162	TZM	2.2 ± 0.06		92.29 ± 2.45		71.75 ± 1.13		7.24 ± 0.58		n.d.		n.d.	
		TZM-afuc	9.98 ± 0.17		70.9 ± 1.82		86.27 ± 1.57		12.07 ± 0.54		n.d.		n.d.	
	N169	TZM	96.26 ± 0.37		92.66 ± 1.88		88.74 ± 0.56		94.72 ± 1.82		n.d.		n.d.	
		TZM-afuc	98.04 ± 0.75		99.19 ± 0.25		92.01 ± 2.93		84.64 ± 0.28		n.d.		n.d.	
	N45 - N162	TZM	1.52 ± 0.03		54.3 ± 2.12		66.15 ± 4.28		69.55 ± 3.82		7.18 ± 0.13		n.d.	
		TZM-afuc	7.21 ± 0.28		79.18 ± 2.86		86.97 ± 1.18		83.39 ± 4.49		26.38 ± 0.53		n.d.	

A sensorgram comparison window of ± 10 SD was used to calculate similarity scores.

Only similarity scores from dissociation phases are displayed.

The color scale was used to describe similarity scores: Red: < 25 %; Green: 25 % to 50 %; Black > 50 %.

The time interval used to calculate similarity scores are the same as those presented in Table S5.

n.d.: not determined