

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN LIT EXPANSÉ
DE PROTÉINES RECOMBINANTES PRODUITES PAR CELLULES DE TABAC

ALINE HESLOUIS
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)
AOÛT 2009

© Aline Heslouis, 2009.



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-53908-8
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-53908-8

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN LIT EXPANSÉ
DE PROTÉINES RECOMBINANTES
PRODUITES PAR CELLULES DE TABAC

présenté par: HESLOUIS Aline

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

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

M. FRADETTE Louis, Ph.D., président

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph.D., membre et directeur de recherche

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

M. LEGROS Robert, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. HENRY Olivier, Ph.D., membre

IV

À Christophe

REMERCIEMENTS

Un grand et sincère merci à ceux qui ont contribué à la réalisation de ce projet de recherche, que ce soit grâce à leur soutien scientifique et technique, ou grâce à leur écoute et leur amitié.

J'aimerais ainsi remercier mon directeur de recherche, le professeur Gregory De Crescenzo, ainsi que mes codirecteurs, les professeurs Mario Jolicoeur et Robert Legros qui m'ont donné l'opportunité de réaliser ce projet de recherche dans le domaine passionnant des bioprocédés pharmaceutiques. Merci d'avoir imaginé ce projet et guidé mon travail par des idées inspirantes et de précieux conseils.

De plus, je tiens à remercier particulièrement Eric Boivin, pour son aide constante dans le laboratoire et pour m'avoir formé à la culture des cellules de plantes. Merci à Cyril Boucher et Antoine Demolliens qui, en plus d'avoir grandement animé mes journées, m'ont apporté une aide technique et scientifique précieuse. Un autre merci à Anne Gigout, Ines Hammami et Benoît Liberelle pour leurs conseils tout au long de la réalisation de ce projet. Je tiens aussi à remercier tous les étudiants, techniciens et stagiaires de l'unité de recherche pour leur amitié et pour le support moral et technique qu'ils m'ont apporté.

Enfin, j'aimerais remercier mes parents et toute ma famille qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans mes choix et notamment celui de venir étudier à Montréal.

RÉSUMÉ

La culture de cellules de plante en suspension commence à s'imposer comme une plateforme de production viable pour la production de protéines recombinantes. En effet, les cellules de plante sont capables de produire des protéines multimériques correctement repliées, assemblées et sécrétées au sein d'un milieu de culture à faible coût. Les travaux de recherche en biopurification, dans le domaine des cellules de plante, s'orientent désormais vers la conception de procédés permettant une minimisation du nombre d'opérations unitaires à effectuer et ceci afin de limiter les pertes de protéine d'intérêt dues à la dégradation enzymatique, à la dénaturation et au phénomène d'agrégation. Dans cette optique, la chromatographie en lit expansé (EBA) est une technique récente de purification des protéines qui permet de combiner clarification, concentration et purification et d'être mise en œuvre en même temps que la production.

L'objectif principal de cette étude consiste à développer une méthode chromatographique de purification d'IgG1 (C5-1) produit en cellules de *Nicotiana tabacum* (lignée R514) par EBA/protéine A. Pour cela, il faut tout d'abord, par des tests batch et en lit fixe, optimiser la purification, et cela en évaluant l'influence du pH et de la salinité sur la qualité de la chromatographie. Les paramètres chimiques optimaux obtenus sont un pH de 8.0 et un ajout de sel de 20 mM NaCl pour la solution d'équilibration et pour l'échantillon à purifier, ainsi qu'une élution à pH 5.0. Une purification par EBA a ainsi été réalisée en utilisant les paramètres optimisés et a permis

d'obtenir un rendement de 83% et un facteur de concentration de 46.6. L'adsorption de C5-1 sur la résine EBA/protéine A, dans les conditions optimales, a aussi été caractérisée par une cinétique d'ordre 1 et une constante k de 0.0202 min^{-1} . Enfin, la possibilité de réaliser cette purification en continu a été évaluée. Pour cela, l'influence de la salinité du milieu de culture sur la croissance de R514 a été étudiée ; les résultats précédents ayant montré la nécessité d'augmenter la salinité du milieu à purifier. Cette étude a mis en évidence qu'à 20 mM de NaCl ajouté dans le milieu de culture, la croissance et la productivité de R514 ne sont pas affectées. La réalisation de cette purification en mode intégrée est donc réalisable.

MOTS-CLES : Purification - Chromatographie – Affinité - Lit expansé – Cellules de plante – Anticorps.

ABSTRACT

Plant cell suspensions are now considered as a viable and competitive expression system for recombinant protein production. Indeed, they can produce multimeric proteins correctly folded and assembled within a low cost culture medium. Biopurification research, in the field of plant cells, is now moving towards process designs aiming at minimizing the number of unit operations to be performed in order to limit the loss of protein of interest due to enzymatic degradation, denaturation and aggregation phenomena. In this context, expanded bed chromatography (EBA) is a recent technique for protein purification that combines clarification, concentration and purification steps and that can even be performed during protein production.

The main objective of this research project is to develop a chromatographic method by affinity EBA to purify IgG1 (C5-1) produced by the *Nicotiana tabacum* R514 cell line. This first requires to assess the effects of pH and salinity on the quality of the chromatography, in order to optimize the purification, by testing various operating conditions in a batch and fixed bed modes. The optimal chemical parameters were found to correspond to pH 8.0, as well as a 20 mM NaCl addition during the equilibration and binding steps while eluting at pH 5.0. An EBA purification was performed using the optimized parameters and resulted in a yield of 83%, as well as a concentration factor of 46.6. The adsorption of C5-1 on protein A resin, under optimal conditions, was also characterized by a 1st-order kinetic and a constant k of 0.0202 min^{-1} . Finally, the feasibility of implementing EBA purification on-line was evaluated. To do so, the

influence of the salinity of culture medium on the growth of R514 has been studied; previous results have highlighted the need to increase the salinity of the culture medium. Our latter results demonstrated that a 20 mM NaCl addition to the culture medium did not affect R514 growth and productivity, hence demonstrating that both IgG1 production and purification can be performed simultaneously within the same step.

KEYWORDS: Purification - Chromatography - Affinity - Expanded bed - Plant cell - Antibodies.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	IV
REMERCIEMENTS	V
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT	VIII
TABLE DES MATIÈRES	X
LISTE DES TABLEAUX	XIV
LISTE DES FIGURES.....	XV
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	XVI
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1. Problématique	2
1.2. Objectifs	3
CHAPITRE 2 : REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
2.1. La production de protéines recombinantes	4
2.1.1. Les différentes plateformes technologiques.....	4
2.1.2. Les anticorps – structure et fonction	5
2.1.3. La production de protéines recombinantes par cellules de plante.....	6
2.1.3.1. Les techniques de transformation.....	6
2.1.3.2. Spécificités de cette plateforme	7
2.2. Evolution des procédés de biopurification.....	10
2.2.1. Réduction du nombre d'étape de purification.....	11

2.2.2. Augmentation de l'espace entre les billes adsorbantes	12
2.2.2.1. L'adsorption en batch.....	12
2.2.2.2. La chromatographie en lit expansé	12
2.3. La chromatographie en lit expansé	14
2.3.1. Appareillage spécifique.....	14
2.3.1.1. Les colonnes EBA.....	14
2.3.1.2. Les adsorbants EBA.....	16
2.3.2. La chromatographie d'affinité.....	18
2.3.2.1. Principe	18
2.3.2.2. Purification par protéine A.....	19
2.3.3. Procédure expérimentale.....	20
2.3.3.1. Equilibration.....	20
2.3.3.2. Application de l'échantillon.....	20
2.3.3.3. Lavage	21
2.3.3.4. Elution.....	21
2.3.3.5. Nettoyage en place	23
2.3.4. Les paramètres critiques de la chromatographie en lit expansé.....	24
CHAPITRE 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODE	27
3.1. Culture cellulaire.....	27
3.1.1. Lignée cellulaire et milieu de culture.....	27
3.1.2. Culture en flacon.....	27
3.1.3. Suivi de la croissance de R514.....	28

3.2. Méthodes analytiques.....	29
3.2.1. Mesure de la concentration en IgG1 par ELISA.....	29
3.2.2. Électrophorèse sur gel SDS-PAGE.....	30
3.3. Les adsorbants.....	31
3.4. Etude en batch.....	31
3.4.1. Préparation de la résine.....	31
3.4.2. Etude du pH d'adsorption en batch.....	32
3.4.2.1. Préparation des solutions.....	32
3.4.2.2. Expérience en batch.....	32
3.4.3. Cinétique d'adsorption.....	32
3.4.3.1. Préparation des solutions.....	33
3.4.3.2. Expérience en batch.....	33
3.5. Purification en lit fixe.....	33
3.5.1. Préparation des solutions tampons.....	33
3.5.2. Préparation de l'échantillon à purifier.....	34
3.5.3. Purification automatisée en lit fixe.....	34
3.5.4. Conditions Expérimentales.....	35
3.6. Purification par EBA.....	36
3.6.1. Préparation des solutions tampons.....	36
3.6.2. Préparation de l'échantillon.....	36
3.6.3. Colonne.....	37
3.6.4. Purification en lit expansé.....	37

CHAPITRE 4 : RÉSULTATS	39
4.1. Optimisation des paramètres chimiques.....	39
4.2. Cinétique d'adsorption.....	42
4.3. Purification par EBA.....	44
4.4. Influence de la salinité du milieu de culture sur la croissance de R514	48
DISCUSSION GÉNÉRALE	51
CONCLUSION	55
RÉFÉRENCES	57
ANNEXE : VALIDATION DE L'ELISA	65

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 : Comparaison des différents systèmes d'expression pour la production de protéines recombinantes (adapté de Ma et al., 2003 ; Ko et Koprowski, 2005).	4
Tableau 3-1 : Conditions expérimentales utilisées en fonction des paramètres à optimiser.....	36
Tableau 4-1 : Performance des purifications de l'IgG1 en EBA et en lit fixe. Comparaison des quantités et pourcentages d'IgG1 à chaque étape de la purification entre la purification en EBA (milieu purifié : 2 L à $0.540 \pm 0.046 \mu\text{g IgG1/mL}$) et en lit fixe (milieu purifié : 9.5 mL à $1,179 \pm 0,073 \mu\text{g IgG1/mL}$).	45
Tableau A-1 : Résultats d'ELISA pour 3 échantillons de milieu de fin de culture en flacon.....	66
Tableau A-2 : Comparaison des concentrations en IgG1 obtenues par ELISA et par SPR pour 3 échantillons de milieu de fin de culture en flacon.	67
Tableau A-3 : Comparaison des concentrations en IgG1 obtenues lors de 2 analyses par ELISA différentes	68

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1 : Schéma classique de purification d'une biomolécule	10
Figure 2-2 : Schémas des colonnes EBA commercialisées par UpFront Chromatography (A) et GE Healthcare (B) (Vergnault, 2004).....	15
Figure 4-1 : Effets des paramètres chimiques de la chromatographie par protéine A ..	40
Figure 4-2 : Etude de la cinétique d'adsorption de l'IgG1.....	43
Figure 4-3 : Chromatogramme de la purification par protéine A en EBA.....	45
Figure 4-4 : SDS-PAGE (condition non dénaturante, révélation au nitrate d'argent) de différentes étapes de la purification par protéine A en EBA.....	47
Figure 4-5 : Suivi de croissance de R514 dans des milieux à différentes concentrations initiales en sel.....	49
Figure A-1: Courbe d'étalonnage d'ELISA entre 0 et 10 ng IgG1/mL	65

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
C5-1	Type d'anticorps IgG ₁
C _{H1} , C _{H2} , C _{H3} , C _{H4}	Domaines constants de la chaîne lourde de l'anticorps
CIP	Nettoyage en place (cleaning-in-place)
C _L	Domaine constant de la chaîne légère de l'anticorps
EBA	Chromatographie en lit expansé (expanded bed adsorption)
EDTA	Acide éthylène diamine tetra acétique
ELISA	Dosage immunoenzymatique (enzymelinked immunosorbent assay)
Fc	Fragment cristallisable de l'immunoglobuline
H	Chaîne lourde de l'anticorps
H ₀	Hauteur du lit sédimenté
HCl	Acide chlorhydrique
Ig	Immunoglobuline
IgA, IgD, IgE, IgG, IgM	Immunoglobuline A, D, E, G, M
IgG ₁ , IgG ₂ , IgG ₃ , IgG ₄	Sous-classes d'immunoglobuline G
k	Constante de vitesse
KCl	Chlorure de potassium
L	Chaîne légère de l'anticorps
NaCl	Chlorure de sodium

NaOH	Hydroxyde de sodium
PBS	Tampon phosphate salin (phosphate buffered saline)
R514	Lignée cellulaire de tabac
rpm	Tours par minute
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
TEMED	Tétra-méthyl-éthylènediamine
TMB	3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
UV	Ultraviolet
VC	Volume colonne (volume correspondant à 1x le volume d'adsorbant sédimenté)
V _H	Domaine variable de la chaîne lourde de l'anticorps
V _L	Domaine variable de la chaîne légère de l'anticorps
$\alpha, \delta, \epsilon, \gamma, \mu$	Type de chaîne lourde de l'immunoglobuline
$\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$	Type de chaîne lourde de l'immunoglobuline G

Chapitre 1 : Introduction

De nombreuses protéines sont maintenant produites et purifiées dans différents secteurs de l'industrie pour des applications chimiques, cosmétiques, agroalimentaires, ou pharmaceutiques. Pour cela, une part importante des procédés utilisés a recours au génie génétique afin de réaliser la production de molécules recombinantes à partir de divers plateformes de production telles que les levures, les bactéries, les cellules animales et les cellules de plante. L'utilisation de ces techniques de génie génétique s'est traduite par une amélioration considérable à la fois de la productivité des procédés et de la qualité des produits obtenus. Parallèlement à ces efforts portés sur la production, il s'avère aujourd'hui essentiel de mettre à la disposition de l'industrie des techniques de biopurification également performantes et applicables à grande échelle, notamment pour les plateformes de production où la productivité obtenue est moindre, telles que les cellules de plante.

Les performances séparatives requises sont très dépendantes du secteur industriel. Les exigences, en termes de pureté et de sécurité, sont évidemment plus fortes lorsque la préparation finale est destinée à être utilisée comme agent thérapeutique. Quoiqu'il en soit, dans tous les secteurs, une recherche de la productivité maximale est indispensable ; les procédés doivent permettre d'atteindre des rendements élevés en biomolécules d'intérêt en un temps restreint et parfois dans des conditions de stérilité strictes. En biotechnologie, les facteurs de rapidité et de rendement sont souvent liés du fait de la fragilité et de la complexité des molécules. En effet, un temps important de purification

augmente les pertes en protéine d'intérêt dues à la dégradation enzymatique, à la dénaturation et aux phénomènes d'agrégation. Les travaux de recherche en biopurification s'orientent donc désormais vers la conception, le développement et la mise au point de techniques à la fois rapides et efficaces et s'intéressent donc à une intégration de la purification à l'étape de production.

Dans cette optique, la chromatographie en lit expansé est une technique récente de purification des protéines qui peut être utilisée en cours ou en fin de culture. Elle permet de combiner trois étapes indispensables du procédé classique de biopurification, que sont la clarification, la concentration et la capture. La réduction du nombre d'opérations unitaires minimise ainsi les coûts de production et favorise un bon rendement global tout en limitant la durée du procédé.

1.1. Problématique

L'unité de recherche d'accueil a récemment mis au point et breveté un bioréacteur adapté à la culture de cellules de plantes et opérable en mode perfusion (De Dobbeleer et al., 2006). Plus précisément, ce bioréacteur se caractérise par la présence d'un jeu de colonnes de décantation permettant de maintenir la biomasse dans le bioréacteur lors du soutirage du milieu de culture. Dans ce contexte, et, plus généralement, dans la perspective du développement d'un bioprocédé à l'échelle industrielle, il est important de savoir si le bioprocédé de production ainsi développé ne pourrait pas être bonifié par l'ajout d'un module de purification par chromatographie d'affinité en lit expansé (EBA). Cet ajout permettrait ainsi de coupler les étapes de production et de purification et donc

de conférer un avantage supplémentaire au procédé déjà existant, surtout lorsque la protéine d'intérêt se caractérise par un faible temps de demi-vie.

1.2. Objectifs

L'objectif principal du projet de recherche consiste donc à développer une méthode chromatographique de purification par EBA d'une protéine modèle (l'IgG1 C5-1) produite par la lignée cellulaire de tabac R514. Ainsi, à l'échelle industrielle, la récupération du produit d'intérêt serait simple et pourrait même se faire en continu. Pour pouvoir rencontrer cet objectif, deux sous-objectifs doivent être atteints :

1. Le premier sous-objectif consiste à évaluer l'influence de deux paramètres clefs, que sont le pH et la salinité, sur la qualité de la chromatographie. Plus spécifiquement, les travaux portent sur :
 - L'effet du pH et de la salinité du milieu à purifier sur la quantité d'IgG1 récupérée lors des différentes phases de la chromatographie,
 - L'impact du pH de la solution d'élution sur la quantité d'IgG1 éluee.
2. Le deuxième sous-objectif consiste à évaluer la possibilité de réalisation de cette purification en continu. Pour cela, l'influence de la salinité du milieu de culture sur la croissance de R514 et sur la production d'anticorps a été étudiée.

Chapitre 2 : Revue de littérature

2.1. La production de protéines recombinantes

2.1.1. Les différentes plateformes technologiques

Les protéines recombinantes peuvent être synthétisées notamment grâce à plusieurs systèmes d'expression, incluant les plateformes bactériennes, de levure, de cellules animale, de cellules de plante ou encore d'animaux et de plantes transgénique (Ma et al., 2003). Choisir la méthode la plus appropriée en vue d'une production industrielle requiert une analyse au cas par cas (Doran, 2000). En effet, une grande variété de facteurs est à considérer, incluant notamment le coût de production, la qualité des protéines obtenues et la nécessité d'obtenir une protéine ayant un patron de glycosylation bien établi (tableau 2-1).

Tableau 2-1 : Comparaison des différents systèmes d'expression pour la production de protéines recombinantes (adapté de Ma et al., 2003 ; Ko et Koprowski, 2005).

Paramètre	Bactéries	Levures	Cellules de plante	Plantes transgéniques	Cellules mammifères
Coût de production global	Faible	Moyen	Moyen	Faible	Elevé
Temps de production	Court	Moyen	Moyen	Court	Long
Qualité du produit	Faible	Moyenne	Haute	Haute	Haute
Glycosylation	Incorrecte	Incorrecte	Différences notables	Différences notables	Différences mineures
Modification de la glycosylation	Très difficile	Moyenne	Facile	Facile	Difficile

Les anticorps et leurs dérivés représentent le plus grand marché et le plus important groupe de produits dérivés de la biotechnologie actuellement en essais cliniques (Larrick et al., 2001).

2.1.2. Les anticorps – structure et fonction

Les anticorps (également appelés immunoglobulines, Ig) sont des glycoprotéines qui circulent dans le sang et agissent comme des effecteurs de l'immunité humorale en cherchant puis en neutralisant ou en marquant les antigènes (Goldsby et al., 2001).

Tous les anticorps partagent certaines caractéristiques structurales. En effet, les molécules d'anticorps sont constituées de quatre chaînes peptidiques (Goldsby et al., 2001). Cette structure consiste en 2 chaînes légères (L) identiques, des polypeptides d'un poids moléculaire d'environ 25 kDa, et 2 chaînes lourdes (H) identiques, des polypeptides de 50 kDa et plus (Goldsby et al., 2001). Les chaînes légères contiennent un domaine variable (V_L) et un domaine constant (C_L) ; les chaînes lourdes contiennent elles aussi un domaine variable (V_H) et entre 3 et 4 domaines constants (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , C_{H4}) dépendamment de la classe de l'anticorps (Goldsby et al., 2001).

En effet, 5 classes différentes d'anticorps sont recensées et diffèrent toutes en structure et en fonction (Hames et Hooper, 2005). Elles sont appelées immunoglobuline A (IgA), IgD, IgE, IgG et IgM et chacune a son propre type de chaîne lourde : α , δ , ϵ , γ et μ , respectivement (Hames et Hooper, 2005). La classe IgG est encore divisée en 4 sous-classes : IgG₁, IgG₂, IgG₃ et IgG₄, ayant γ_1 , γ_2 , γ_3 et γ_4 comme chaîne lourde respectivement (Hames et Hooper, 2005).

Dans le domaine de la biotechnologie, les anticorps sont des outils essentiels pour le diagnostic et le traitement des maladies contagieuses et des cancers (Fisher et al., 2000 ; Perrin et al., 2000 ; Stoger et al., 2000). La demande en anticorps thérapeutiques et de diagnostics a tellement augmenté ces dernières années que l'utilisation des systèmes coûteux de production traditionnels, tels que ceux basés sur la culture de cellules de mammifères (tableau 2-1), est remise en question (Ko et Koprowski, 2005). En opposition à ces systèmes, la plateforme de production en cellules de plante présente de nombreux avantages, dont des coûts de production et de purification faibles et la possibilité de réaliser des modifications post-traductionnelles efficaces de la glycosylation des anticorps (Ko et Koprowski, 2005).

2.1.3. La production de protéines recombinantes par cellules de plante

Ainsi, les cellules de plantes commencent à être considérées comme une plateforme de production viable et compétitive à grande échelle (Doran, 2000).

2.1.3.1. Les techniques de transformation

En plantes, il est possible de transformer le matériel génétique contenu dans les noyaux ou les plastides (Schillberg et al., 2005). Deux méthodes de transformation sont principalement utilisées. La première méthode est réalisée, principalement pour les plantes dicotylédones, en utilisant une bactérie, *Agrobacterium tumefaciens*, comme vecteur (Schillberg et al., 2005). La seconde méthode, utilisée principalement pour les plantes monocotylédones, est la biolistique, qui peut être appliquée autant sur des cals que sur des tissus (Schillberg et al., 2005). Cette technique utilise des microbilles de

métal enrobées d'ADN qui sont bombardées à très grande vitesse sur des tissus végétaux afin de traverser leurs parois, dans le but que quelques cellules intègrent spontanément les gènes dans leur génome (Balasubramanian et al., 2004). La facilité à transformer les cellules ou les plantes est un des critères majeurs de sélection d'une espèce pour la production (Schillberg et al., 2005).

En comparaison avec la transformation stable des cellules de plante, l'expression transitoire permet d'obtenir rapidement la protéine d'intérêt. Toutefois, cette méthode peut difficilement être utilisée à l'échelle industrielle (Joh et al., 2005). Pour ces raisons, l'expression transitoire sera souvent utilisée comme méthode de vérification de la validité d'une construction génétique (Schillberg et al., 2005). La méthode la plus couramment utilisée est l'agroinfiltration qui consiste à infiltrer sous vide une suspension d'*Agrobacterium* dans des feuilles de plantes (Horn et al., 2004). Les transgènes, présents en plusieurs copies dans les cellules infectées, s'expriment et produisent ainsi la protéine d'intérêt.

2.1.3.2. Spécificités de cette plateforme

Les plantes et cellules de plante en suspension ont tout d'abord été utilisées comme une plateforme de production de métabolites secondaires, dont le paclitaxel, un agent anticancéreux (Choi et al., 2001). Puis, ces plateformes de production ont également été considérées comme l'un des systèmes hôtes possibles pour la production de protéines recombinantes (Schillberg et al., 2003 ; Ko et Koprowski, 2005 ; Ma et al., 2005 ; Schillberg et al., 2005) puisque les cellules de plantes, en tant que cellules eucaryotes, ont la capacité de replier et d'assembler correctement les protéines multimériques

(Miele, 1997). La production d'un anticorps IgG dans les plantes transgéniques a notamment été décrite dès 1989 et il a été démontré que la co-expression de deux transgènes permet d'obtenir un anticorps correctement replié et assemblé (Hiatt et al., 1989). Il a ainsi été établi qu'une grande variété de protéines pouvait être produite dans les plantes (De Wilde et al., 2000). On rapporte entre autres la production d'anticorps, de protéines virales à des fins de vaccination, d'hormones et de facteurs de croissance (Giddings, 2001 ; Twyman et al., 2003). Ainsi, plus de 100 protéines recombinantes ont été produites à ce jour (Twyman et al., 2003).

Actuellement, une transition du champ vers les bioréacteurs s'impose lentement du fait des nombreux avantages de la production en suspension cellulaire (Fischer et al., 2004). Le principal intérêt de la culture de cellules de plante *in vitro*, et non de la culture de plante entière en champ ou en serre, est la possibilité de manipuler et de contrôler les conditions de culture afin d'obtenir de meilleurs niveaux de protéines d'intérêts correctement repliées et glycosylées (Doran, 2000 ; Hellwig et al., 2004).

De plus, cette méthode de production, comparée aux plantes entières, permet l'utilisation de procédés de purification plus simples et plus économiques. En effet, la récupération et la purification des protéines à partir des plantes entières sont coûteuses et techniquement difficiles à réaliser, car celles-ci nécessitent de multiples étapes de purification : précipitation, adsorption, chromatographie et diafiltration (Doran, 2000). Une étude économique d'Evangelista et al. (1998) a notamment montré que la production d'une enzyme, la β -glucuronidase, à partir de graines de maïs transgénique, requiert des opérations de broyage, d'extraction et de purification de la protéine conduisant à environ

94% du coût de production total. Au contraire, puisque les milieux de culture pour cellules de plante sont relativement simples et ne contiennent pas de protéine, si une protéine recombinante est produite au sein de la suspension cellulaire et sécrétée dans le milieu plutôt que stockée dans les cellules, la récupération et purification du produit d'intérêt peuvent être effectuées en l'absence de grandes quantités de protéines contaminantes et ainsi être grandement simplifiées (Doran, 2000).

Les cellules de plantes les plus utilisées à ce jour pour les cultures en suspension sont les cellules de *Nicotiana tabacum*, des cellules de tabac, mais d'autres cellules ont aussi été testées telles que les cellules de *Oryza sativa L. Japonica*, des cellules de riz (Doran, 2000).

En général, le rendement en protéines biologiquement actives est essentiellement déterminé par le choix du promoteur et le niveau d'expression. Un autre facteur important, lorsque la protéine d'intérêt est sécrétée, est la stabilité de la protéine de la sécrétion dans le milieu jusqu'à la purification (Doran, 2000). Ainsi, le rendement en protéine sécrétée peut être entravé par l'efficacité de la sécrétion des cellules elles-mêmes (Okushima et al., 1999), mais aussi par l'action de protéases sécrétées (Bateman et al., 1997 ; Schiermeyer et al., 2005), par la nature du milieu de culture (Tsoi et Doran, 2002), ainsi que par l'adsorption sur les parois du bioréacteur (Sharp et Doran, 2001 ; Doran, 2006). La dégradation d'anticorps recombinants sécrétés a notamment été observée pour des cultures en suspension de cellules végétales (LaCount et al., 1997 ; Wongsamuth et Doran, 1997 ; Sharp et Doran, 1999).

Il est donc nécessaire d'adapter les procédés de purification classiques afin qu'ils répondent aux spécificités de ce type de production et notamment celle d'un temps de traitement le plus court possible entre la production et la purification de la biomolécule.

2.2. Evolution des procédés de biopurification

Un procédé classique de biopurification comporte au minimum 5 à 6 étapes dont la récupération, la clarification, la concentration, les purifications primaire et secondaire et le polissage (figure 2-1). La mise en œuvre de toutes ces étapes représente maintenant de 50 à 80% du coût total d'obtention d'une protéine recombinante destinée à un usage thérapeutique (Roque et al., 2004).

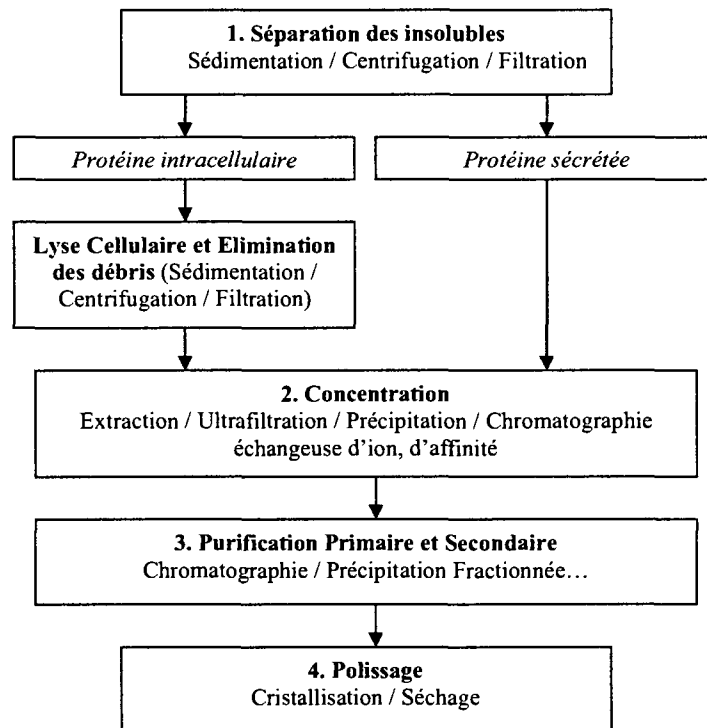


Figure 2-1 : Schéma classique de purification d'une biomolécule

Afin de réduire le nombre d'étapes et ainsi le coût et le temps de réalisation du procédé de bioséparation, des techniques qui permettent de combiner les étapes de clarification, de concentration et de capture ont été développées. Trois approches différentes peuvent être utilisées.

2.2.1. Réduction du nombre d'étape de purification

La première technique, l'extraction de la protéine par un système aqueux biphasique, a été largement développée dans les années 1970. Cette technique est basée sur un système de deux phases aqueuses et permet de purifier un milieu à forte concentration cellulaire (Kula, 1990). Cependant, ce procédé ne permet pas de s'affranchir d'une étape de centrifugation pour séparer les deux phases.

La seconde technique permet de combiner la filtration et l'adsorption de la protéine en greffant des ligands spécifiques sur des membranes de microfiltration tangentielle (Thömmes et Kula, 1995). Mais l'utilisation de ce procédé induit des problèmes de colmatage des membranes, qui présentent par ailleurs un coût prohibitif.

Enfin, la troisième technique, de loin la plus prometteuse, vise à réaliser la capture de la protéine d'intérêt sur des particules adsorbantes sans clarification préalable du milieu de culture, c'est-à-dire en présence de cellules ou de débris cellulaire. Dans les procédés classiques de bioséparation basés sur l'adsorption du produit sur des particules, ces dernières sont compactées et forment un lit fixe ; ce type de procédé étant désigné comme la chromatographie d'adsorption. Dans cette approche expérimentale classique, l'étape de clarification (par filtration ou centrifugation) ne peut être évitée à cause des

risques de colmatage du lit par les débris cellulaires ou par les cellules entières. Afin de lever cette limitation, il est nécessaire d'augmenter l'espace entre les billes adsorbantes.

2.2.2. Augmentation de l'espace entre les billes adsorbantes

L'augmentation de l'espace inter-particulaire peut être réalisée selon deux méthodes.

2.2.2.1. L'adsorption en batch

L'adsorption en batch consiste à mettre en contact, dans un réacteur bien mélangé, le support adsorbant directement avec la suspension cellulaire contenant la protéine d'intérêt (Choi et al., 2001). Après un temps suffisant pour la capture de la protéine, le support adsorbant doit être séparé du milieu de culture afin d'éluer puis de récupérer la biomolécule cible. Cependant, le fait que l'adsorbant ne soit pas contenu dans une colonne complique la récupération du produit, surtout à grande échelle.

2.2.2.2. La chromatographie en lit expansé

En 1990, Chase et Draeger introduisent un nouveau procédé efficace de chromatographie sur colonne utilisé pour la purification de protéines issues de cultures cellulaires : la chromatographie en lit expansé (ou expanded bed adsorption, EBA). Cette technique permet d'augmenter l'espace inter-particulaire du lit, en appliquant un flux ascendant dans la colonne de chromatographie, ce qui, au-delà d'une certaine vitesse d'écoulement, va favoriser la mise en suspension des billes de support. Ainsi, la protéine d'intérêt, contenue dans le flux continu de milieu, se fixe sur le support adsorbant tandis que les cellules, débris cellulaires et autres protéines solubles qui n'ont

pas ou peu d'affinité pour la phase solide traversent librement le lit. Puisque l'adsorbant est contenu dans une colonne, la récupération du produit, après la phase de chargement, est facilitée.

La stabilisation du lit s'effectue grâce à une distribution de taille des particules de support (Chase et Draeger, 1992) qui entraîne ainsi une classification au sein du lit. Les plus grosses billes sont localisées dans la partie inférieure de la colonne et les plus petites, dans la partie supérieure. Cela permet de réduire localement la mobilité des billes adsorbantes ainsi que la dispersion axiale du solide, augmentant ainsi les performances d'adsorption. Le lit expansé est ainsi un cas particulier de lit fluidisé classifié (Vergnault, 2004).

La chromatographie en lit expansé a été appliquée avec succès sur des milieux de culture de bactéries (Barnfield-Frej et al., 1997), de levures (Chang et al., 1995 ; Chang et Chase, 1996), de cellules mammifères (Thömmes et al., 1995 ; Born et al., 1996), de lait transgénique (Ozyurt et al., 2002) ou encore de plantes transgéniques (Bai et Glatz, 2003).

Certains travaux se sont aussi penchés sur la purification intégrée de culture de cellules bactériennes (Song et al., 2006), mais aussi de culture de cellule de plantes (Williams et al., 1992 ; Lee-Parsons et Shuler, 2002 ; Klvana et al., 2005 ; De Dobbeleer et al., 2006) ; stratégie qui consiste à adsorber, en cours de culture, les biomolécules d'intérêts qui sont sécrétées. Pour les cultures de cellule de plante en bioréacteur, De Dobbeleer et al. (2006) propose des colonnes de sédimentation présentes au sein du bioréacteur qui permettent de prélever, tout au long de la culture, du milieu sans cellule contenant la

protéine d'intérêt. L'intérêt de la purification intégrée est de permettre la limitation des dégradations protéolytiques et, dans l'ensemble, le constat de ces travaux est une productivité accrue par l'adsorption intégrée des molécules produites (Clemmitt et Chase, 2000).

2.3. La chromatographie en lit expansé

2.3.1. Appareillage spécifique

La chromatographie en lit expansé nécessite un appareillage spécifique. Les colonnes et les adsorbants doivent être conçus de manière à répondre à un certain nombre de besoins et de critères.

2.3.1.1. Les colonnes EBA

Les colonnes EBA ont pour fonction première de permettre le passage des cellules et de retenir la phase liquide lorsque l'écoulement est arrêté. Mais elles doivent aussi permettre de créer un écoulement le plus proche possible de l'écoulement piston idéal puisqu'une mauvaise stabilité du lit peut provoquer des chemins préférentiels et ainsi influencer la productivité du procédé. De plus, les colonnes possèdent un adaptateur de sortie mobile qui peut être positionné au dessus du lit sédimenté afin de réduire le volume mort, plus particulièrement lors de la phase d'élution (figure 2-2).

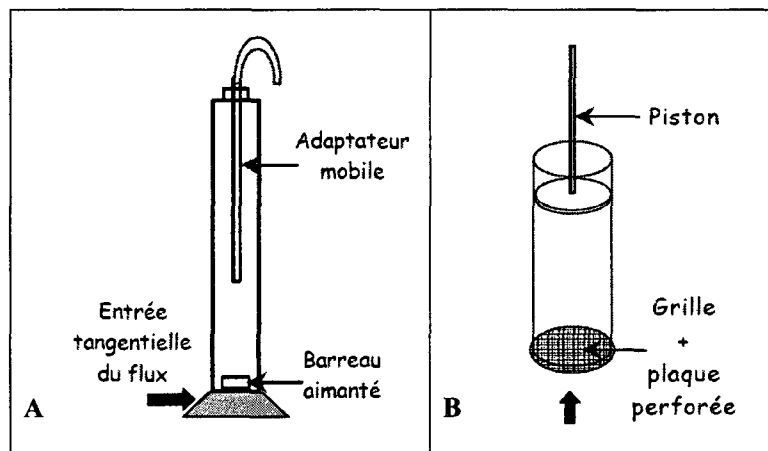


Figure 2-2 : Schémas des colonnes EBA commercialisées par UpFront Chromatography (A) et GE Healthcare (B) (Vergnault, 2004).

Les colonnes EBA peuvent être catégorisées selon leur système de distribution. Quatre types de colonnes sont utilisés en EBA : à distributeur conique, à distributeur rotatif, basé sur la création d'une contre-pression et basé sur une agitation locale (Hubbuch et al, 2005). Lors des premiers travaux sur l'EBA, ce sont les colonnes basées sur la création d'une contre-pression qui ont principalement été utilisées. On retrouve dans cette catégorie les systèmes de distribution à plaque perforée, à treillis métallique, à verre fritté et à billes de verre (Hubbuch et al., 2005). Les colonnes de ce type présentent cependant des problèmes de colmatage (Anspach et al., 1999 ; Brobjer, 1999) et tendent à être remplacées par des systèmes munis d'un distributeur rotatif.

Les colonnes EBA disponibles sur le marché sont fabriquées par GE Healthcare (Suède) et UpFront Chromatography (Danemark) (figure 2-2). UpFront Chromatography propose des colonnes FastLine, basées sur une agitation locale, de 10, 20 et 50 mm de diamètre où une agitation de l'adsorbant est effectuée en bas de la colonne, tandis que la

partie supérieure du lit est stable. Cette compagnie propose aussi des colonnes FastLine de 100 et 300 mm de diamètre qui utilisent un distributeur composé de 12 tubes radiaux rotatifs convergeant au niveau d'une chambre centrale afin de créer une zone de turbulence la plus restreinte possible (Hubbuch et al., 2002). GE Healthcare commercialise des colonnes Streamline Direct de 24, 95, 280 et 600 mm de diamètre qui utilisent un système de distribution similaire constitué de 4 tubes rotatifs.

Le diamètre de la colonne est choisi en fonction du débit requis ou de la vitesse superficielle requise pour obtenir un degré d'expansion de l'adsorbant de 2 à 3 fois la hauteur du lit sédimenté (H_0). Le profil d'expansion est principalement dû aux propriétés spécifiques de l'adsorbant que sont la densité et la taille des billes.

2.3.1.2. Les adsorbants EBA

La conception d'un adsorbant EBA est le résultat d'un compromis entre une optimisation de ses propriétés physico-chimiques (taille, masse volumique, taille des pores, résistance à de larges plages de pH et aux forces de cisaillement) et des caractéristiques du transfert de masse (cinétique d'adsorption et limitation au transfert de masse) (Anspach et al., 1999 ; Lin et al., 2001).

Les premières études sur la chromatographie en lit expansé ont été effectuées avec des adsorbants développés pour la purification en lit fixe, mais ceux-ci ne permettaient, pour les expansions désirées, que d'obtenir des vitesses superficielles de 10 à 30 cm/h, trop faibles pour la mise en œuvre du procédé (Noronha et al., 1999). Il a donc été nécessaire d'adapter les adsorbants utilisés en lit fixe pour l'EBA et notamment au niveau de la

distribution du diamètre et de la densité des billes adsorbantes. Il a ainsi été montré que l'augmentation de la densité des particules permet d'utiliser des vitesses superficielles plus élevées (200–300 cm/h) sans avoir à augmenter la taille des particules (Noronha et al., 1999).

Afin d'augmenter la densité des particules et de permettre ainsi une bonne vitesse d'écoulement, deux techniques différentes sont utilisées. La première technique consiste à utiliser un matériau poreux de haute masse volumique comme la silice (Finette et al., 1996), l'oxyde de zirconium (Griffith et al., 1997 ; Mullick et al., 1998) ou la cellulose (Pai et al., 2000). La seconde technique consiste à incorporer un matériau de haute masse volumique (Vergnault, 2004) sous forme de noyau central, de petits fragments dispersés ou de conglomérat dans une matrice déjà commercialisée.

Les adsorbants EBA actuellement disponibles sur le marché sont fabriqués par GE Healthcare (Suède), UpFront Chromatography (Danemark) et Pall (NY). GE Healthcare propose des adsorbants Streamline couplés à des ligands échangeurs d'ions et d'affinité (protéine A recombinante, héparine et ion métallique). Ces supports sont constitués d'agarose réticulé, dont la densité est augmentée par incorporation de cristaux de quartz. Ceci permet d'obtenir la densité requise (1.2 g/cm^3) pour une expansion stable à haut débit. UpFront Chromatography propose un adsorbant FastLine couplé à un ligand multi-mode (échangeur d'ion et hydrophobe) et constitué de billes plus petites mais surtout plus denses ($2.5\text{-}3.5 \text{ g/cm}^3$) grâce à leurs noyaux de tungstène. La compagnie Pall, quant à elle, propose des adsorbants HyperZ fabriqués à partir d'une matrice d'oxyde de

zirconium poreux et dont les pores sont remplis d'un hydrogel à base d'acrylate, qui est proposé uniquement couplé à des ligands échangeurs d'ions.

2.3.2. La chromatographie d'affinité

2.3.2.1. Principe

La chromatographie d'affinité, dont le principe a été introduit par Cuatrecasas et ses collègues en 1968 (Hage, 2005), a toujours été la méthode de choix pour la purification d'anticorps (Roque et al., 2007). En effet, ce procédé de purification permet en général d'atteindre une pureté supérieure à 95% en une seule étape.

La chromatographie d'affinité repose sur la reconnaissance spécifique entre la protéine (ou le groupe de protéine) d'intérêt et un ligand. Ainsi, les ligands d'affinité sont considérés comme étant les plus spécifiques de tous les ligands employés dans les procédés de purification puisque leurs interactions sont basées sur une reconnaissance biologique et non sur des propriétés physico-chimiques (Narayanan, 1994 ; Newcombe et al., 2004).

Les interactions biologiques entre le ligand et la molécule d'intérêt peuvent être le résultat d'interactions électrostatiques et/ou hydrophobes, de force de Van der Waals et/ou de liaisons hydrogène. Ainsi, pour éluer la molécule d'intérêt, l'affinité de l'interaction peut être réduite, soit de façon spécifique en utilisant un ligand compétitif, soit de façon non-spécifique en modifiant les conditions d'interaction (pH, force ionique ou salinité).

Les ligands utilisés couramment comprennent les antigènes, les anti-anticorps, les protéines d'origine bactérienne (protéine A, G et L), ou encore les lectines et les ions métalliques (Hage, 2005). Parmi ceux-ci, la protéine A (Thömmes et al., 1996), l'héparine (Bjorklund et Hearn, 1996) et les ions métalliques (Jiang et Hearn, 1996) ont notamment déjà été utilisés en EBA.

2.3.2.2. Purification par protéine A

La production à grande échelle d'anticorps monoclonaux est devenue nécessaire pour fournir le marché des thérapeutiques et, dans ce but, la chromatographie d'affinité par protéine A est fréquemment utilisée dans les procédés de purification. En effet, cette protéine, qui provient de la paroi cellulaire de *Staphylococcus aureus*, est connue pour se lier de façon très spécifique à la région Fc de l'immunoglobuline G (IgG) (Odabasi et Denizli, 2001 ; Roque et al., 2007).

La grande spécificité de ce genre de bio-ligand permet d'offrir une excellente sélectivité, un paramètre critique pour la purification par chromatographie (Alnta et al., 2007). Ce type de chromatographie a été amélioré en réalisant un couplage orienté de la protéine A, améliorant ainsi l'interaction entre la protéine A et la région Fc de l'anticorps (GE Healthcare, 2006). De plus, bien que ce ligand soit de type protéique, il est remarquablement robuste et supporte une grande variété de procédures de nettoyage (Chase, 1998). À l'échelle industrielle, la protéine A a été adoptée comme le ligand de choix pour la capture d'anticorps, en dépit des craintes initiales quant à son coût, sa réutilisation et la possibilité de retrouver de la protéine A dans le produit final (Roque et al., 2007).

La purification par protéine A a aussi été utilisée en EBA et notamment par Gonzalez et al. (2003) pour la purification d'IgG_{2b} avec un rendement de 92 % et une pureté de 98 %.

2.3.3. Procédure expérimentale

Le protocole expérimental de l'EBA diffère peu de celui de la chromatographie en lit fixe ; la principale différence étant la direction du flux de liquide. La séquence d'une chromatographie comporte cinq étapes successives : l'équilibration, le chargement de l'échantillon, le lavage, l'élution et le nettoyage.

2.3.3.1. Equilibration

Au cours de l'équilibration, le tampon adéquat passe dans la colonne selon un flux ascendant, afin d'amener la phase stationnaire aux conditions initiales désirées pour le chargement. Le lit est habituellement expansé d'un facteur 2 à 3, augmentant ainsi l'espace inter-particulaire.

La stabilité du lit résultant peut être vérifiée visuellement ou encore en réalisant un test de la répartition du temps de séjour par injection d'un échelon de traceur, par exemple de l'acétone. Pour atteindre une stabilité satisfaisante, il est nécessaire de vérifier la parfaite verticalité de la colonne de chromatographie (Ghose et Chase, 2000).

2.3.3.2. Application de l'échantillon

Après équilibration, le milieu non clarifié est injecté dans le lit stabilisé au même débit que lors de la phase précédente. La protéine d'intérêt se lie aux particules adsorbantes,

tandis que la plupart des débris cellulaires, cellules et autres contaminants passent à travers la colonne sans être retenus. Le milieu de culture étant généralement d'une viscosité supérieure à celui du tampon d'équilibration, l'expansion du lit augmente généralement pendant cette phase.

2.3.3.3. Lavage

Le lavage, généralement effectué avec la solution d'équilibration, permet d'éliminer les espèces résiduelles faiblement liées telles que les cellules et débris cellulaires. L'efficacité de la clarification, et notamment le facteur de purification, dépend directement de cette étape de lavage.

L'élimination de toutes les cellules peut nécessiter de grands volumes, augmentant ainsi la durée et le coût du procédé. Il a notamment été démontré par Hjorth et al. (1995) que, dans le cas de billes Streamline, 20 volumes de lit sédimenté (VC) de solution de lavage sont nécessaires pour réduire le nombre de cellules d'un facteur 10^5 pour la purification d'un homogénat de bactéries *Escherichia coli*.

2.3.3.4. Elution

Deux procédures différentes d'éluion sont utilisées et dépendent du type de colonne choisi.

Dans le cas des colonnes Streamline, le lit peut être sédimenté dans la colonne EBA et l'éluion peut alors être effectuée en mode compressé de la même manière que pour les lits fixes. L'éluion en mode compressé réduit la quantité d'éluant nécessaire et permet de récupérer un produit à plus haute concentration.

Le débit d'élution peut être dirigé soit dans la même direction que l'échantillon au cours du chargement, c'est-à-dire vers le haut, soit dans le sens inverse, c'est-à-dire vers le bas. Si seulement une petite fraction de la capacité de l'adsorbant a été utilisée, le produit d'intérêt est adsorbé surtout à l'entrée du lit. Dans ce cas, inverser la direction du flux peut permettre une plus grande concentration du produit d'intérêt. On retrouve ainsi les conditions d'élution d'une chromatographie en lit fixe ; des gradients de solution d'élution peuvent être utilisés sans difficulté. Toutefois, l'élution par pallier est souvent préférée à des gradients continus car cela permet de récupérer la protéine d'intérêt sous une forme plus concentrée et aussi d'être facilement applicable à l'échelle industrielle (Ishihara et al., 2006).

La vitesse d'écoulement au cours de l'élution affecte également la concentration finale du produit d'intérêt. Une vitesse d'écoulement plus faible engendrera un faible volume d'élution. La vitesse d'écoulement optimale lors de l'élution des protéines pour un adsorbant Streamline est de l'ordre de 50 à 150 cm/h.

Avec les colonnes de type UpFront, l'élution ne peut pas être réalisée en mode sédimenté ; l'inversion du flux étant impossible. Cette étape est donc effectuée en mode expansé, ce qui peut diminuer considérablement la concentration finale de la protéine d'intérêt. Cependant, l'utilisation de ce type de colonne permet de simplifier la procédure expérimentale et d'éviter, par rapport au lit sédimenté, l'agglomération des particules de support du fait d'un tassement ainsi que des problèmes de pression (Lihme et al., 2000).

2.3.3.5. Nettoyage en place

Après l'élution, le lit est rééquilibré par un premier lavage, en utilisant une solution spécifique telle que la solution préalablement utilisée pour l'équilibration.

Une procédure de nettoyage chimique, le nettoyage en place (ou cleaning-in-place, CIP), peut ensuite être appliquée, afin d'éliminer les substances liées de façon non spécifique à la résine et de rétablir ainsi les performances initiales de séparation. En effet, l'application d'un bouillon de culture sur l'adsorbant expose la matrice à des lipides, des acides nucléiques, ou autres composés cellulaires habituellement éliminés lors de l'étape de clarification. Les particules adsorbantes ont ainsi des vitesses de sédimentation différentes, conduisant à la formation de chemins préférentiels, ce qui affecte la classification et donc les performances du lit lors des purifications ultérieures.

Comme pour tout support de chromatographie, cette étape peut être réalisée avec des solutions comme 1 M d'hydroxyde de sodium (NaOH) et 2 M de chlorure de sodium (NaCl) ou encore des solutions d'éthanol aqueux à une concentration pouvant aller jusqu'à 70%. Ce nettoyage est réalisé directement dans la colonne en mode expansé ou sédimenté. En ce qui concerne la purification par protéine A, de nombreux protocoles très efficaces ont été développés par les fabricants (Hahn, 2006).

GE Healthcare (2006) propose notamment pour sa colonne STREAMLINE rProtein A, quatre protocoles différents :

- 20% éthanol, 2 M NaCl, 0.1 M NaOH.

- 20 mM phosphate de sodium, pH 7.0, 20 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 5% Sodium N-lauroylsarcosinate.
- 20% éthanol, 50 mM acide acétique.
- 6 M chlorhydrate de guanidine, 6 M Urée, 1 M acide acétique.

2.3.4. Les paramètres critiques de la chromatographie en lit expansé

Les paramètres critiques pour l'EBA peuvent être classés en deux catégories : chimique et physique.

Les paramètres chimiques sont des paramètres reliés à la sélectivité et à la capacité de la résine utilisée. Parmi ceux-ci, citons le pH, la force ionique et la nature des ions présents. L'influence sur les performances de séparation de ces paramètres est en pratique la même en EBA qu'en lit fixe.

Les paramètres physiques regroupent ceux qui sont reliés ou qui vont affecter l'hydrodynamique et la stabilité du lit expansé mais aussi la densité cellulaire, la vitesse d'écoulement et la hauteur du lit. En effet, la densité cellulaire et le type cellulaire affectent la viscosité, ce qui peut modifier la vitesse maximale d'écoulement en créant une surexpansion du lit. Il est important aussi de prendre en compte que la température affecte aussi la viscosité et par conséquent la vitesse d'écoulement du système puisque les expériences d'optimisation sont généralement réalisées à température ambiante alors qu'un milieu prélevé directement du bioréacteur peut avoir une température supérieure.

L'aspect le plus critique du design d'un procédé d'EBA est donc d'accorder les conditions de réalisation de l'EBA avec les propriétés du milieu à purifier. En effet, le

procédé de purification ne doit pas engendrer la dénaturation de la biomolécule d'intérêt, c'est-à-dire la perte de son activité biologique. De manière générale, dans le cas des protéines et des acides nucléiques, ceci impose de se limiter à des temps de contact courts et à des conditions douces de pH et de température.

Le contenu du milieu à purifier dépend évidemment du type cellulaire utilisé, mais aussi de la localisation du produit d'intérêt (Menkhaus et Glatz, 2005). En effet, la performance de l'EBA varie si le produit d'intérêt est sécrété dans le milieu de culture ou si le produit est intracellulaire (la lyse cellulaire change drastiquement la composition du milieu à traiter).

Lorsque le produit est sécrété, le milieu est généralement caractérisé par une faible viscosité et une faible concentration en protéine d'intérêt, mais aussi en contaminants intracellulaires ; produisant des conditions favorables à la purification. Dans ce cas, il est très important de maintenir intactes les cellules lors de leur passage dans la colonne de chromatographie, évitant ainsi la libération des composés membranaires et des contaminants intracellulaires tels que l'ADN, les lipides et les protéines intracellulaires qui peuvent bloquer l'adsorbant ou l'entrée du système de distribution de la colonne. Le relargage de protéases intracellulaires (enzymes catalysant la dégradation des protéines) est un autre sujet de préoccupation, car il aura un impact négatif sur la récupération des produits bioactifs.

Lorsque le produit est intracellulaire, le milieu à purifier est riche en contaminants intracellulaires et en constituants de la paroi membranaire. Cependant, les contaminants

extracellulaires peuvent être enlevés avant la lyse cellulaire en effectuant plusieurs lavages des cellules.

Chapitre 3 : Matériel et Méthode

3.1. Culture cellulaire

3.1.1. Lignée cellulaire et milieu de culture

La lignée cellulaire R514 a été créée en utilisant une suspension cellulaire de *Nicotiana tabacum* transfectée par la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* AGL1 fournie par Medicago Inc. Cette souche bactérienne contient une séquence d'ADN plasmidique codant pour un IgG1 de souris, le C5-1.

La lignée cellulaire transformée est cultivée dans du milieu de culture KCMS contenant notamment 30 g/L de glucose (Sigma-Aldrich, G7021) ainsi que 0.5 g/L d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (Sigma-Aldrich, D7299), 0.25 g/L de kinétine (Sigma-Aldrich, K0753) et 1.3 mg/L de thiamine-HCl (Sigma-Aldrich, T1270). Le pH de celui-ci est ajusté à 5.7 avec de l'hydroxyde de potassium 1 M (Fisher Scientific, P250) avant autoclavage.

3.1.2. Culture en flacon

La suspension cellulaire est cultivée en flacon de 500 mL contenant 135 mL de milieu KCMS frais et inoculée avec 15 mL de suspension de R514 ayant 7 jours de culture. En effet, celle-ci atteint alors un volume de cellules sédimentées (après 5 minutes) d'environ 80% du volume total. Les cellules sont maintenues tout au long de la culture à $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dans l'obscurité au sein d'un agitateur orbital à 130 rpm.

Le bouillon des cultures en flacon est récolté au bout de 7 jours. Ce milieu, qui contient la protéine d'intérêt, est filtré à 2.7 μm (Whatman, 1823047) pour retirer les cellules et les plus gros débris et est ensuite conservé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sous forme d'aliqots de 40 mL.

3.1.3. Suivi de la croissance de R514

Un suivi de croissance a été effectué en ajoutant différentes concentrations en sel au milieu KCMS de base.

Du milieu KCMS a été réalisé et il a été ajouté à celui-ci, avant d'ajuster son pH et de l'autoclaver, différentes concentrations en sel : 0, 20, 50 et 100 mM de NaCl (Sigma-Aldrich, S5886) ou 20, 50 et 100 mM de chlorure de potassium (KCl ; Anachemia AC-7600). A partir de ces milieux à différentes concentrations en sel, 7 cultures en flacon ont été menées pendant 7 jours, comme lors d'une culture en flacon classique.

Un échantillonnage journalier, adapté de Lamboursain et Jolicoeur (2005), a été réalisé pour chacun des flacons en prélevant 10 mL de suspension cellulaire homogénéisée. Cet échantillon a ensuite été filtré sous vide sur un filtre en fibre de verre (Whatman, 1823047) et le gâteau de filtration a été immédiatement rincé trois fois avec 20 ml d'eau déionisée. Les cellules sont soigneusement retirées du filtre à l'aide d'une spatule et pesées immédiatement dans une coupelle en aluminium (Fisher Scientific, 08-732) pour obtenir le poids humide de la biomasse. L'échantillon est ensuite mis à 80°C pendant 24 heures, refroidi dans un environnement à air sec et pesé pour obtenir le poids sec de la biomasse.

De plus, le milieu de culture filtré du 7^{ème} jour a été conservé à des fins d'analyse par ELISA.

3.2. Méthodes analytiques

3.2.1. Mesure de la concentration en IgG1 par ELISA

La mesure de l'IgG1 par ELISA a été adaptée à partir de la méthode présentée par Khoudi et al. (1999).

Les puits d'une microplaque (Costar, 3369) ont tout d'abord été traités en adsorbant pendant une nuit un anticorps anti-souris, produit en chèvre, spécifique à la chaîne lourde de l'IgG1 (Sigma-Aldrich, M8770) dilué à 2.5 µg/ml dans un tampon 50 mM carbonate de sodium (Fisher Scientific, S495) à pH 9.6. Le blocage des sites non-spécifiques a ensuite été réalisé avec du PBS contenant 1.0% de caséine (Sigma-Aldrich, C0376) (PBS-caséine). Les échantillons à tester ont été dilués dans la solution de PBS-caséine et une courbe standard, entre 0 et 10 ng IgG1/mL, est également préparée, en utilisant un standard d'IgG1 de souris (Sigma-Aldrich, M9269). Tous ces échantillons sont ensuite appliqués en triplicata sur la microplaque pendant 1 heure. L'anticorps conjugué, un anticorps anti-souris IgG (H et L), produit en chèvre, conjugué à de la peroxydase (Bio-Rad Laboratories, 170-5047), est ensuite ajouté puis révélé grâce au substrat 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) (Sigma-Aldrich, T0440). Après 15-20 minutes, la réaction est stoppée en ajoutant de l'acide chlorhydrique 1N (J.T. Baker, 9530-33) et l'absorbance à 450 nm est mesurée grâce à un lecteur de microplaques Victor³ V (PerkinElmer, 1420).

Entre chacune de ces étapes, trois lavages successifs sont réalisés avec une solution de PBS contenant 0.1% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, P7949).

3.2.2. Électrophorèse sur gel SDS-PAGE

La pureté, lors de l'élution effectuée en chromatographie en lit expansé, a été évaluée en réalisant une électrophorèse par gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) en condition non dénaturante.

Pour cela, un gel de séparation à 11 % d'acrylamide puis un gel de concentration à 3%, muni de 10 puits, ont été coulés. Ceux-ci sont réalisés à partir d'une solution d'acrylamide-bisacrylamide (Biorad, 161-0149), d'une solution de Tris-HCl 3M, de SDS, de glycérol (uniquement pour le gel de séparation), de persulfate d'ammonium ainsi que de tétra-méthyl-éthylènediamine (TEMED ; Sigma-Aldrich, T9281).

7.5 μ L d'échantillons de milieu à purifier et de solution en sortie de colonne lors du chargement sont utilisés lors de cette électrophorèse contrairement à 5 μ L pour les échantillons d'élution ainsi que pour le standard d'IgG1 (Sigma-Aldrich, M9269) qui a été préalablement dilué à 0.2 mg IgG1/mL. A ceux-ci sont ajoutés un volume similaire de tampon de chargement qui contient du glycérol, du SDS, du bleu de Coomassie ainsi que du Tris-HCl 1M à pH 6.8.

Les différents échantillons ainsi que 5 μ L d'un marqueur de taille (Biorad, 161-0324) ont été chargés sur le gel et l'électrophorèse a donc été réalisée à un voltage de 140 V pendant 1h10. Les bandes de protéines furent ensuite révélées par coloration au nitrate d'argent grâce à un kit commercial (Sigma-Aldrich, PROT-SIL1).

3.3. Les adsorbants

Deux types de résine de chromatographie par protéine A ont été achetés chez GE Healthcare : des colonnes préchargées HiTrap rProtein A FF de 1 mL (17-5079-01), pour les chromatographies en lit fixe, et de l'adsorbant Streamline rProtein A (17-1281-01), pour les expériences en batch et en mode EBA. Les caractéristiques de ces deux résines sont extrêmement similaires. En effet, ces adsorbants se composent d'un agarose 4% hautement polymérisé ayant un diamètre moyen de particule de 90 μm pour le lit fixe (GE Healthcare, 2005) et une distribution de taille de particule de 80 à 165 μm pour l'EBA (GE Healthcare, 2006). Sur ceux-ci sont greffées, par un lien thioéther, des protéines A recombinantes, produites dans *Escherichia coli*, à une densité d'environ 6 mg de protéine par mL de résine (GE Healthcare, 2005 ; GE Healthcare, 2006).

3.4. Etude en batch

3.4.1. Préparation de la résine

500 μL de résine Streamline rProtein A sont prélevés dans un eppendorf 1.5 mL (Fisher Scientific, 05-408-129) et l'éthanol, dans lequel est contenue la résine, est évaporé à l'air libre pendant 1 heure. 10 mg de résine sont pesés dans des eppendorfs 1.5 mL et cette résine est équilibrée pour chaque tube par l'ajout de 1 mL de solution d'équilibration, pendant 1 heure, sur un agitateur rotatif à 24 rpm (ManSci Inc., Del-1100). Les tubes sont ensuite centrifugés 10 secondes à 5000 rpm (Fisher Scientific, 05-090-128) et 950 μL de tampon sont enlevés à chacun des eppendorfs.

3.4.2. Etude du pH d'adsorption en batch

Le pH d'équilibration et de l'échantillon à purifier est ici étudié et sera donc le seul paramètre variable. Chaque eppendorf utilisé servira donc à étudier un pH donné.

3.4.2.1. Préparation des solutions

La solution pour l'équilibration est préparée pour les pH 7.5, 8.0, 8.5 et 9.0 à 20 mM de trishydroxyméthylaminométhane (Tris) (Sigma-Aldrich, T6066) et ajustée avec de l'acide chlorhydrique 1 M (J.T. Baker, 9530-33). Pour les pH 6 et 7, la solution d'équilibration est préparée à 20 mM de phosphate de sodium monobasique (Sigma-Aldrich, S5011) et ajustée avec de l'hydroxyde de potassium 1 M.

Le milieu de culture à purifier, qui provient des cultures en flacon, est ajusté aux différents pH 6, 7, 7.5, 8, 8.5 et 9, grâce à une solution d'hydroxyde de potassium à 20 mM.

3.4.2.2. Expérience en batch

1 mL de milieu à purifier est ajouté à la résine pré-équilibrée et les tubes sont agités pendant 4 heures puis centrifugés 10 secondes à 5000 rpm. 500 μ L de surnageant sont ainsi prélevés dans chacun des tubes et congelés à -80 °C pour analyse ultérieure par ELISA.

3.4.3. Cinétique d'adsorption

La cinétique d'adsorption sans ajout de sel dans le milieu à purifier est ici comparée à la cinétique obtenue lors d'un ajout de 20 mM de NaCl.

3.4.3.1. Préparation des solutions

Les solutions d'équilibration sont préparées à 20 mM de Tris auxquels sont ajoutés 0 ou 20 mM de chlorure de sodium. Ces solutions sont ensuite ajustées avec de l'acide chlorhydrique 1 M à pH 8.0.

0 ou 20 mM de chlorure de sodium sont ajoutés au milieu de culture à purifier, qui provient des cultures en flacon. Celui-ci est ensuite ajusté à pH 8.0, grâce à une solution d'hydroxyde de potassium 20 mM.

3.4.3.2. Expérience en batch

1 mL de milieu à purifier est ajouté sur la résine pré-équilibrée, au temps $t=0$, et les tubes sont agités pendant les temps suivants : 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 180 et 240 min. Chaque eppendorf utilisé sert en effet à réaliser un temps de contact donné. Lorsque le temps de contact correspondant à l'eppendorf donné a été réalisé, celui-ci est centrifugé 10 secondes à 5000 rpm et 500 μ L de surnageant sont prélevés.

Tous les surnageants sont congelés à -80°C pour analyse ultérieure par ELISA. La quantité d'IgG1 adsorbée a ainsi été déduite par bilan massique et q , la concentration en protéine sur la résine, a été calculée en divisant la quantité d'IgG1 adsorbée par le volume de résine.

3.5. Purification en lit fixe

3.5.1. Préparation des solutions tampons

Les solutions tampons pour l'équilibration, le lavage et la rééquilibration sont préparées

à 20 mM de Tris auxquels sont ajoutés 0, 5, 10, 20, 50, 100 et 500 mM de chlorure de sodium ou 0, 5, 10, 20 et 50 mM de chlorure de potassium. Ces solutions sont ensuite ajustées avec de l'acide chlorhydrique 1 M aux différents pH suivants : 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 et 9.0. Les solutions tampons d'éluion sont préparées à 100 mM d'acide citrique (Sigma-Aldrich, C7129). Elles sont ajustées avec de l'hydroxyde de potassium 1 M au pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 et 6.0.

Toutes ces solutions sont filtrées à 0.45 µm (Millipore, SCHVU11RE) et dégazées.

Une solution contenant 1 M de Tris est préparée afin de tamponner les échantillons récupérés. Celle-ci est ajustée avec de l'acide chlorhydrique 1 M à pH 9.0.

3.5.2. Préparation de l'échantillon à purifier

Le milieu, provenant des cultures en flacons, est décongelé et filtré à 0.45 µm. 0, 5, 10, 20, 50, 100 et 500 mM de chlorure de sodium ou 0, 5, 10, 20 et 50 mM de chlorure de potassium sont ensuite ajoutés. Enfin, le pH du milieu est ajusté à 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 et 9.0 grâce à une solution d'hydroxyde de potassium 20 mM.

3.5.3. Purification automatisée en lit fixe

La purification automatisée en lit fixe est effectuée avec un système AKTA™ Explorer 100 (GE Healthcare, 18-1112-41) et une colonne HiTrap rProtein A FF de 1 mL. La méthode de purification est programmée dans le système et exécutée par ce dernier. Des sondes de pH, conductivité et un détecteur d'absorbance UV sont situées à la sortie de la colonne et permettent l'acquisition en temps réel des mesures par le système.

La colonne est équilibrée avec 5 VC de tampon d'équilibration. 9.5 VC d'échantillon de milieu sont ensuite appliqués sur la colonne. Le lavage est effectué avec 10 VC de tampon, similaire au tampon d'équilibration, et l'élution avec 10 VC de solution d'élution.

La colonne est finalement rééquilibrée avec 10 VC de tampon d'équilibration. Si l'élution n'a pas été effectuée à pH 5.0, 5 VC de solvant d'élution à pH 5.0 sont ensuite appliqués sur la colonne en mode manuel. Enfin, la colonne est nettoyée par un cycle d'eau déionisée / 20% éthanol à la fin de chaque journée de manipulation. Le débit utilisé pour chacune de ces étapes est de 1 ml/min.

Lors du chargement de l'échantillon, le liquide en sortie de colonne est récupéré dans un tube de 15 mL (Corning, 430791) tandis que, lors du lavage, de l'élution et de la rééquilibration, des échantillons de 1 VC sont récupérés automatiquement grâce au collecteur de fractions. Chaque échantillon de 1 VC récupéré est tamponné grâce à une solution de 1 M Tris-HCl, pH 9.0. Ces échantillons sont ensuite conservés à -80 °C pour être analysés en ELISA.

3.5.4. Conditions Expérimentales

Les conditions expérimentales utilisées lors des purifications en lit fixe, en fonction du paramètre à optimiser, sont présentées dans le tableau 3-1.

Tableau 3-1 : Conditions expérimentales utilisées en fonction des paramètres à optimiser

Paramètre à optimiser	Conditions d'équilibration, de chargement, de lavage et de rééquilibration	Condition d'élution
Concentration en sel lors du chargement	pH 8.0 0 à 500 mM NaCl et 0 à 50 mM KCl	pH 5.0
pH d'élution	pH 8.0 20 mM NaCl	pH 4.0 à 6.0
pH d'adsorption	pH 7.0 à 9.0 20 mM NaCl	pH 5.0

3.6. Purification par EBA

3.6.1. Préparation des solutions tampons

La solution tampon pour l'équilibration, le lavage et la rééquilibration est préparée à 20 mM de Tris et 20 mM de chlorure de sodium. Elle est ajustée avec de l'acide chlorhydrique 1 M à pH 8.0. La solution tampon d'élution est préparée à 100 mM d'acide citrique et est ajustée à pH 5.0 avec de l'hydroxyde de potassium 1 M.

Une solution contenant 1 M de Tris est préparée afin de tamponner les échantillons récupérés. Celle-ci est ajustée avec de l'acide chlorhydrique 1 M à pH 9.0.

3.6.2. Préparation de l'échantillon

Le milieu de culture utilisé pour la purification par EBA provient d'une culture en bioréacteur (2.7L) de R514 réalisée le 14 novembre 2007 dans le cadre d'autres travaux

de l'unité de recherche. Le bouillon de culture obtenu a été récupéré en fin de culture, filtré à 2.7 μm et conservé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sous forme d'aliquots de 45 ml.

Cette solution a ensuite été décongelée et 20 mM de NaCl ont été ajoutés. Enfin le pH de la solution a été ajusté à pH 8.0 grâce à de l'acide chlorhydrique 1 M.

3.6.3. Colonne

La colonne EBA (Fastline 10), achetée chez UpFront Chromatography (7010-0000) a un diamètre interne de 10 mm. La vitesse de rotation du barreau magnétique, jouant le rôle de distributeur, a été choisie afin d'empêcher la formation de chemins préférentiels au sein du lit. La position de l'adaptateur de sortie a été réglée manuellement à environ 1 cm au-dessus du lit expansé tout au long de l'expérience. Aussi, la verticalité de la colonne a été vérifiée avant la réalisation de la chromatographie.

3.6.4. Purification en lit expansé

La purification en lit expansé est effectuée grâce au BioPilot (Pharmacia, Suède), un système automatisé. Ce système possède des sondes de pH, de conductivité et d'UV (280 nm) qui ont été reliées au système d'acquisition et de contrôle (Virgo) de l'unité de recherche. Les différentes étapes de purification sont programmées dans le module de contrôle du système BioPilot.

Un volume de 7.8 mL de résine Streamline rProtein A, correspondant à une hauteur de lit sédimentée H_0 de 10 cm, est utilisé. L'équilibration est effectuée avec 80 mL (10 VC) de tampon d'équilibration afin que la résine s'expande d'environ 2.5 fois. Deux litres (257 VC) d'échantillon sont ensuite appliqués sur la colonne. Enfin, 120 ml (15 VC) de

solution sont utilisés pour chacune des étapes suivantes : le lavage (tampon d'équilibration), l'élution (tampons d'élution) ainsi que la rééquilibration (tampon d'équilibration). Le débit utilisé est de 4 ml/min pour toutes les étapes de la purification en lit expansé à l'exception de l'étape d'élution qui a été menée à un débit de 2 mL/min. Lors du chargement de l'échantillon ainsi que lors de la rééquilibration, tout le liquide en sortie de colonne est récupéré et deux échantillons de 1 mL de chaque étape sont conservés tandis que lors des étapes de lavage et d'élution, des échantillons de 10 mL sont récupérés au fur et à mesure de la purification. Chaque échantillon d'élution et de rééquilibration est tamponné grâce à une solution de 1 M Tris-HCl, pH 9.0. Tous les échantillons sont ensuite conservés à -80 °C pour analyse par ELISA.

Chapitre 4 : Résultats

Une étude préliminaire a été réalisée afin de valider le choix de notre méthode d'analyse par ELISA des concentrations en IgG1 dans nos différents échantillons. Celle-ci est présentée en annexe.

4.1. Optimisation des paramètres chimiques

Des essais de purification par protéine A ont été effectués afin de développer une procédure de chromatographie permettant de purifier une protéine recombinante IgG1 de type C5-1. Ces essais ont été réalisés en mode batch et en chromatographie en lit fixe ; la chromatographie en lit expansé nécessitant de plus grands volumes d'échantillon et étant plus délicate à réaliser.

Un essai en mode batch a tout d'abord été mené afin de connaître le pH d'adsorption optimal. Pour cela, 1 mL de milieu de fin de culture en flacon à $0.931 \pm 0.096 \mu\text{g IgG1/mL}$ à différents pH a été mis en contact pendant 4 heures avec 10 mg de résine HiTrap rProtein A FF préalablement équilibrée (figure 4-1A). La salinité optimale de l'échantillon a été testée en chromatographie en lit fixe sur un échantillon à $0.968 \pm 0.104 \mu\text{g IgG1/mL}$ à un pH de 8.0 en faisant varier la salinité (figure 4-1B). Le pH d'élution a lui aussi été optimisé par chromatographie en lit fixe sur un milieu à $1.179 \pm 0.073 \mu\text{g IgG1/mL}$ à pH 8.0 et 20 mM de NaCl (figure 4-1C). Un dernier essai a été effectué, toujours en lit fixe, sur un milieu à $1.179 \pm 0.073 \mu\text{g IgG1/mL}$ et 20 mM de NaCl en faisant varier le pH de chargement et en réalisant l'élution à pH 5.0 (figure 4-1D).

Ainsi, le pH et la salinité, lors des phases de chargement et d'éluion, ont été testés. La figure 4-1 présente les résultats obtenus.

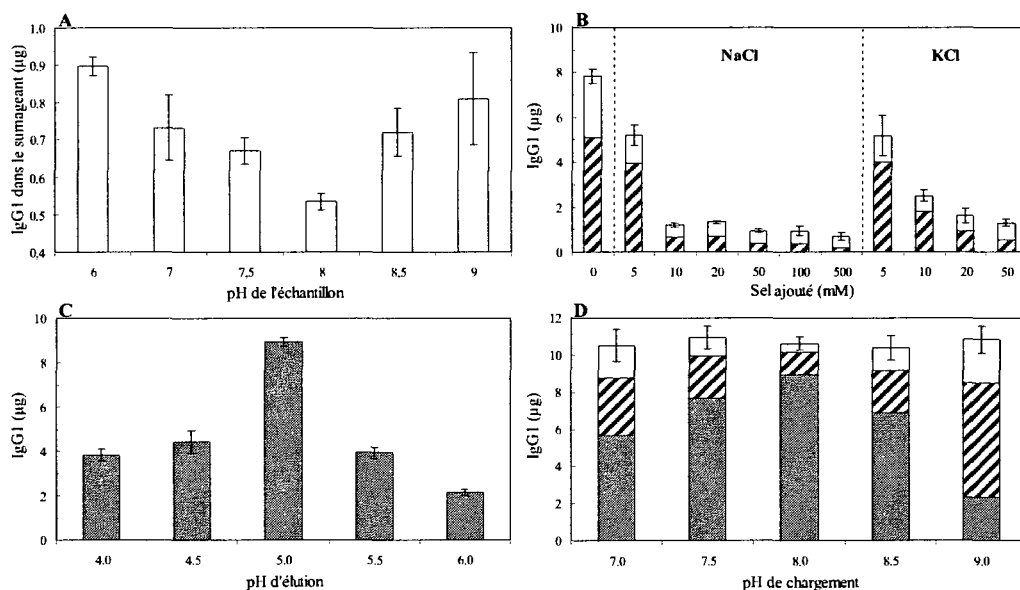


Figure 4-1 : Effets des paramètres chimiques de la chromatographie par protéine A.

A : Optimisation du pH d'adsorption ; **B** : Effet de la salinité de l'échantillon sur la quantité d'IgG1 en sortie de colonne lors du chargement et du lavage ; **C** : Effet du pH d'éluion sur la quantité d'IgG1 élué ; **D** : Effet du pH de l'échantillon sur la quantité d'IgG1 en sortie de colonne.

En blanc : IgG1 dans le surnageant à l'équilibre (A) et IgG1 en sortie de colonne lors de la phase de chargement (B) ; En rayé noir et blanc : IgG1 en sortie de colonne lors de la phase de lavage ; En gris : IgG1 élué.

Tout d'abord, une expérience d'adsorption de l'IgG1 à différents pH a été réalisée (figure 4-1A). Cela a permis de montrer que le milieu ne peut être correctement purifié à son pH normal, environ 6, puisque l'adsorption de l'IgG1 est alors quasi nulle. L'adsorption la plus grande observée se déroule à pH 8.0, ce qui est concordant avec les données rapportées par GE Healthcare (2006) qui propose de réaliser celle-ci dans la

plage de pH 8.0-9.0 pour un IgG1 de souris. Le pH 8.0 pour les phases d'équilibration, de chargement, de lavage et de rééquilibration sera donc utilisé pour les expériences suivantes.

Toutefois, à pH 8.0, seul 42% de l'IgG1 est adsorbé. La salinité de l'échantillon à purifier a donc été étudiée (figure 4-1B) puisqu'il peut être nécessaire d'ajouter jusqu'à 4 M de chlorure de sodium à certains échantillons contenant de l'IgG1 de souris pour permettre une adsorption efficace (GE Healthcare, 2006). Dans notre cas, dès 10 mM d'ajout de chlorure de sodium et 50 mM d'ajout de chlorure de potassium, l'adsorption de la protéine est grandement améliorée puisque la quantité de protéine d'intérêt retrouvée en sortie de colonne lors des phases de chargement et de lavage est 6 fois plus petite que lorsqu'aucun ajout de sel n'est effectué. En dessous de cette concentration en sel, une partie des IgG1 arrive tout de même à se fixer mais un simple lavage au même pH et à la même salinité suffit à les décrocher. Les essais suivants seront donc réalisés avec une équilibration, un chargement, un lavage et une rééquilibration à pH 8.0 et 20 mM de NaCl, ce qui permet l'accroche de 86 % de l'IgG1 passé sur la colonne.

Il est dorénavant nécessaire d'optimiser le pH de la phase d'élution (figure 4-1C). Celui-ci a été testé entre 4.0 et 6.0, plage de pH rapportée par GE Healthcare (2006) pour l'élution d'IgG1 de souris. Il a ainsi été montré que le pH 5.0 permet dans notre cas d'obtenir la meilleur élution, correspondant à une récupération de 80% de l'IgG1 contenu initialement dans l'échantillon à purifier.

Une dernière expérience (figure 4-1D) a été réalisée afin de vérifier le pH d'adsorption de l'IgG1, précédemment testé sans ajout de sel, et a permis de confirmer le pH de chargement optimal comme étant pH 8.0. De plus, l'analyse des différentes phases de la purification permet de réaliser un bilan massique cohérent pour chacune des chromatographies, ce qui montre la validité de notre méthode de chromatographie en lit fixe et d'analyse par ELISA. Il est à noter qu'aucun IgG1 n'a été détecté en ELISA lors de la phase de rééquilibration.

Les paramètres chimiques de la purification par protéine A d'IgG1 produit par R514 sont donc fixés à :

- pH de la solution d'équilibration et de l'échantillon : pH 8.0,
- Salinité de la solution d'équilibration et de l'échantillon : 20 mM NaCl,
- pH de la solution d'élution : pH 5.0.

4.2. Cinétique d'adsorption

Une cinétique d'adsorption a été réalisée afin de caractériser l'accroche de l'IgG1 sur la résine Streamline rProtein A aux conditions optimales d'adsorption préalablement déterminées. De plus, une autre cinétique d'adsorption a été menée à la salinité initiale du milieu à purifier, et cela dans le but de montrer l'importance de l'augmentation de la force ionique du milieu à purifier. Pour cela, 1 mL de milieu de fin de culture en flacon, à $1.051 \pm 0.047 \mu\text{g IgG1/mL}$, a été mis en contact avec 10 mg de résine HiTrap rProtein A FF préalablement équilibrée, durant différentes périodes de temps (figure 4-2).

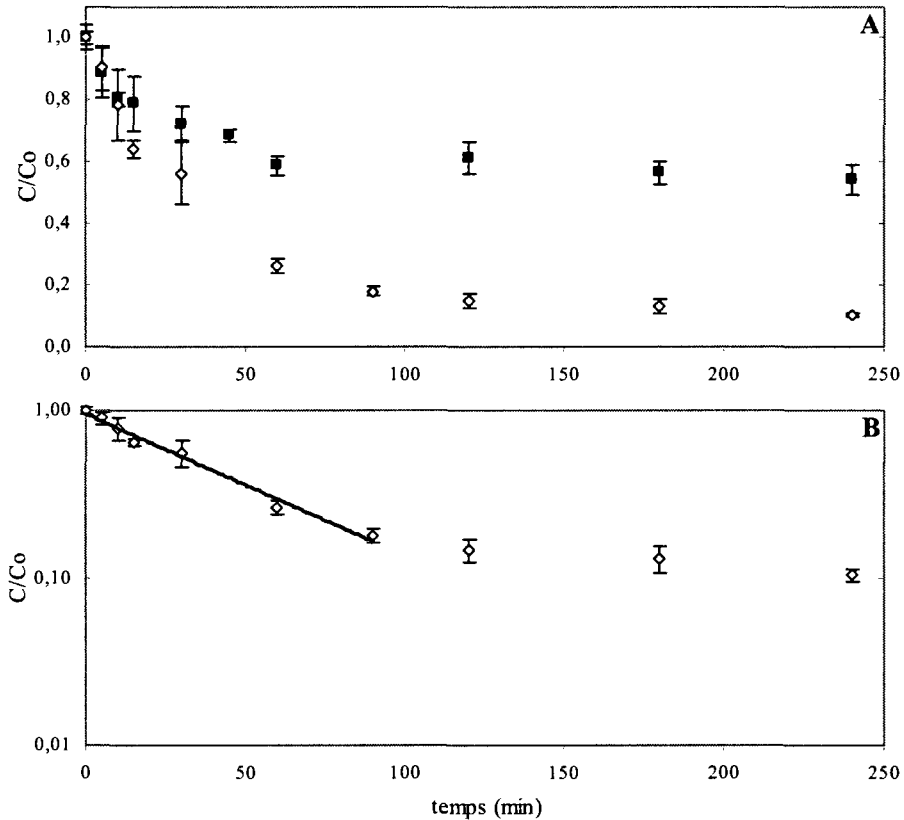


Figure 4-2 : Etude de la cinétique d'adsorption de l'IgG1.

A : Taux d'enlèvement de l'IgG1 selon la concentration en sel de la solution avec C, concentration en IgG1 dans le milieu et C_0 , concentration initiale en IgG1 ; B : Représentation logarithmique du taux d'enlèvement de l'IgG1 à 20 mM NaCl.

Losange noir : sans sel ajouté ; Losange blanc : 20 mM NaCl ; Droite noire : phase linéaire.

L'enlèvement de l'IgG1 au cours du temps (figure 4-2A) montre encore une fois l'importance d'augmenter la force ionique du milieu de culture. En effet, en quatre heures, sans ajout de sel, seulement 45.7% des IgG1 sont accrochés sur la résine contrairement à 89.6% en ajoutant 20 mM de NaCl. De plus, l'équilibre semble atteint au bout de 90 minutes environ.

Afin de caractériser l'adsorption de l'IgG1 sur la protéine A à 20 mM de NaCl, cette cinétique d'adsorption a été modélisée selon un ordre 1 :

$$\ln \frac{C(t)}{C_0} = -k t$$

Où C est la concentration en IgG1 dans le milieu, C₀ la concentration initiale en IgG1 et k la constante de vitesse apparente.

La constante de vitesse apparente obtenue à partir de la figure 4-2B est de 0.0202 min⁻¹ (avec un coefficient de détermination R² de 0.98) pour la période des 90 premières minutes.

4.3. Purification par EBA

Une purification par EBA a été réalisée afin de valider les paramètres optimisés en chromatographie en lit fixe et la qualité de la purification. Ainsi, 2 litres de milieu à 0.540 ± 0.046 µg IgG1/mL à pH 8.0 et 20 mM NaCl ont été purifiés grâce à 7.8 mL de résine Streamline rProtein A en réalisant une élution à pH 5.0. Cette expérience a été réalisée en colonne EBA de 1 cm de diamètre sur un Biopilot connecté à un système d'acquisition de donnée permettant de suivre le pH, la conductivité et l'absorbance à 280 nm.

Le chromatogramme ainsi que les résultats de purification obtenus sont présentés en figure 4-3 et tableau 4-1.

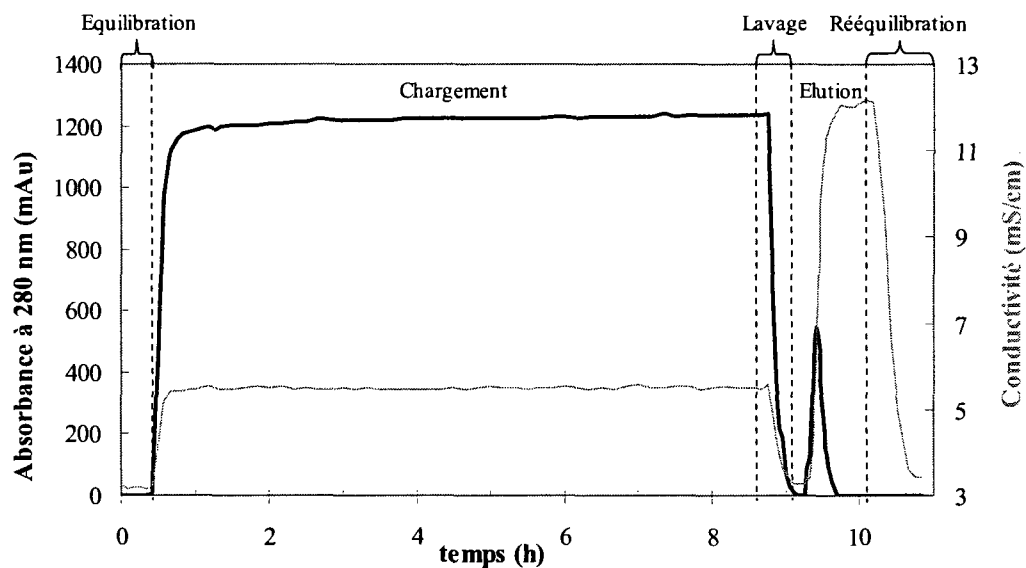


Figure 4-3 : Chromatogramme de la purification par protéine A en EBA.
Suivi de l'absorbance à 280nm (courbe noire) et de la conductivité (courbe grise) lors de la purification de l'IgG1.

Tableau 4-1 : Performance des purifications de l'IgG1 en EBA et en lit fixe.
Comparaison des quantités et pourcentages d'IgG1 à chaque étape de la purification entre la purification en EBA (milieu purifié : 2 L à $0.540 \pm 0.046 \mu\text{g IgG1/mL}$) et en lit fixe (milieu purifié : 9.5 mL à $1,179 \pm 0,073 \mu\text{g IgG1/mL}$).

Phase	EBA		Lit Fixe	
	IgG1 (μg)	%	IgG1 (μg)	%
Initial	1080 ± 91	-	11.20 ± 0.69	-
En sortie de colonne lors du chargement	145.5 ± 19.8	13.5	0.48 ± 0.08	4.3
En sortie de colonne lors du lavage	28.6 ± 3.4	2.6	1.22 ± 0.13	10.9
Elué	897.3 ± 47.3	83.0	8.93 ± 0.18	79.8

Lors des phases d'équilibration et de lavage, le débit de 4 ml/min, correspondant à une vitesse superficielle d'environ 300 cm/h, a permis une expansion de 2.7 fois la hauteur initiale du lit, H_0 . Lors de la phase de chargement, qui a été effectuée au même débit, une augmentation de la hauteur du lit a été observée passant d'une expansion de 2.7 à 3. Ce phénomène peut s'expliquer par l'augmentation de la viscosité de la solution en contact avec la colonne.

Le chromatogramme, présenté en figure 4-3, montre clairement que des protéines sont décrochées de la colonne lors de la phase d'élution. Les fractions concernées ont ainsi été analysées par ELISA. Comme présenté dans le tableau 4-1, la purification par EBA a ainsi permis d'obtenir un rendement de 83% et un facteur de concentration de 46.6 correspondant à une concentration finale de $25.2 \pm 1.4 \mu\text{g IgG1/mL}$ dans un échantillon de 35 mL. Ce rendement est comparable à celui obtenu lors de purification en lit fixe aux mêmes conditions opératoires de purification.

De plus, il est important de noter que, tout au long de la purification par EBA, le lit expansé a été considéré comme stable puisqu'aucun signe de chemin préférentiel ou irrégularité du lit n'ont été observés. Cela peut aussi être confirmé, en comparant en EBA et en lit fixe, la proportion d'IgG1 retrouvée en sortie de colonne lors du chargement ainsi que la performance de la purification (tableau 4-1) ; ceux-ci étant relativement similaires dans les deux cas.

De plus, afin de confirmer les bonnes performances de cette chromatographie en lit expansé, la pureté des fractions d'élutions collectées a été testée par électrophorèse sur gel SDS-PAGE en condition non dénaturante (figure 4-4).

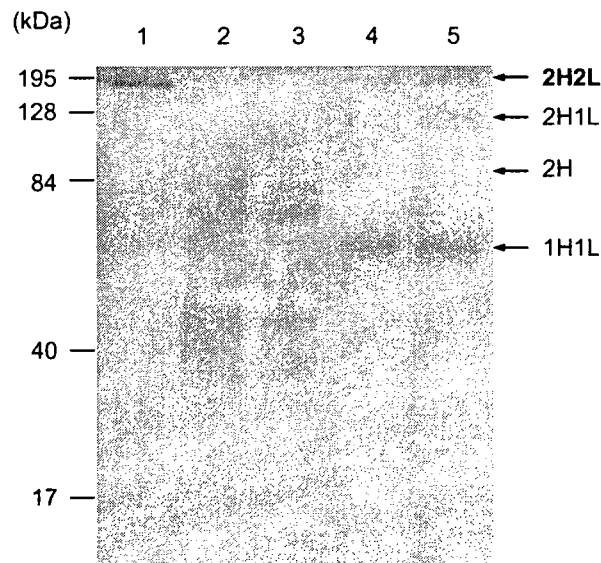


Figure 4-4 : SDS-PAGE (condition non dénaturante, révélation au nitrate d'argent) de différentes étapes de la purification par protéine A en EBA. 1: standard d'IgG1 ; 2: milieu brut avant purification ; 3: en sortie de colonne lors du chargement ; 4 et 5: fractions collectées lors du pic d'élution.

La figure 4-4 permet tout d'abord d'observer qu'un grand nombre de protéines est contenu dans le milieu brut avant purification (ligne 2) ; celles-ci ayant un poids moléculaire de 30 kDa à 120 kDa environ. En sortie de colonne lors du chargement (ligne 3), les mêmes bandes de protéines sont observés ; ces protéines n'ayant pas été adsorbées sur la résine EBA protéine A. Il est à noter qu'aucune bande d'IgG1 n'est observée pour ces 2 échantillons ; sa concentration étant trop faible pour être détectée.

Les lignes 4 et 5, présentant deux fractions collectées lors du pic d'éluion, montrent toutes les deux quatre bandes de protéines différentes. La forme complète de l'anticorps (H2L2), d'un poids moléculaire de 150 kDa (Amersham Biosciences, 2001), est observée, comme attendu, dans ces deux fractions d'éluion. De plus, des formes incomplètes de l'IgG1 de souris C5-1 ont possiblement été révélées :

- IgG1 ayant 2 chaînes lourdes et une chaîne légère (2H1L), d'un poids moléculaire de 125 kDa,
- IgG1 ayant 2 chaînes lourdes (2H), d'un poids moléculaire de 100 kDa,
- IgG1 ayant une chaîne lourde et une chaîne légère (1H1L), d'un poids moléculaire de 75 kDa.

Il est à noter que la chaîne lourde et la chaîne légère d'un IgG1 de souris ont respectivement un poids moléculaire de 50 et 25 kDa (Amersham Biosciences, 2001).

De plus, aucune des bandes de protéines présentes dans le milieu initial (ligne 2) n'est observée pour les fractions d'éluion (ligne 4 et 5). Cette purification par EBA protéine A permet donc d'éliminer la majorité des contaminants présents dans le milieu initial, à l'exception de certaines formes incomplètes de l'anticorps.

4.4. Influence de la salinité du milieu de culture sur la croissance de R514

Afin d'évaluer la possibilité de réaliser cette purification en mode intégré à la production, et ainsi l'appliquer au modèle de bioréacteur à perfusion présenté par De Dobbeleer (2006), il est nécessaire d'évaluer l'impact de la salinité du milieu de culture sur la croissance des cellules de tabac R514. En effet, en cas de purification intégrée, il

serait facile de modifier le pH du milieu à purifier avant de passer sur la colonne et de le ramener à son pH initial ensuite afin que celui-ci retourne dans le bioréacteur. Dans le cas de la salinité, cette option n'est évidemment pas réalisable. Il est donc obligatoire d'augmenter la salinité du milieu de culture dès le début de la production ou dès le début de la purification afin de rendre efficace l'adsorption de l'IgG1 sur la résine.

Ainsi, différentes cultures de cellules R514 ont été réalisées dans du milieu KCMS en faisant varier la concentration en sel afin de réaliser un suivi journalier de la masse sèche et de la masse humide.

Les résultats du suivi de croissance de R514 en flacon à différentes salinités sont présentés en figure 4-4.

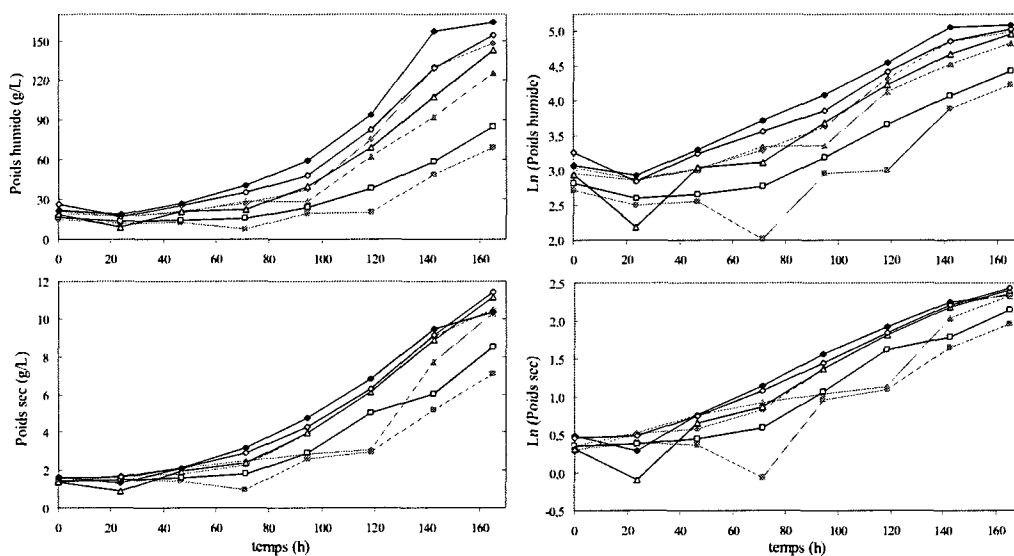


Figure 4-5 : Suivi de croissance de R514 dans des milieux à différentes concentrations initiales en sel.

Carré gris : 100 mM KCl ; triangle gris : 50 mM KCl ; losange gris : 20 mM KCl ; carré blanc : 100 mM NaCl ; triangle blanc : 50 mM NaCl ; losange blanc : 20 mM NaCl ; losange noir : sans sel ajouté.

Grâce à la représentation semi-logarithmique présentée en figure 4-4, on remarque tout d'abord que, sans ajout de sel, la phase de latence est d'une durée de 24h. L'ajout de 20 mM de sel, NaCl ou KCl, n'affecte pas la durée de la phase de latence mais des ajouts de 50 mM et 100 mM entraînent une phase de latence de 48h et 72h respectivement. Lors de la phase exponentielle de croissance, le taux de croissance spécifique, calculé grâce à l'étude du poids humide, est de $0.0172 \pm 0.0007 \text{ h}^{-1}$ quelque soit la concentration en sel. Celui-ci n'est donc pas affecté par la salinité du milieu. Enfin, la culture dans du KCMS sans ajout de sel atteint la phase stationnaire après 6 jours et les cultures à 20 mM semblent, elles aussi, s'approcher de cette phase. Les autres cultures, ayant eu une phase de latence plus longue, n'atteignent pas la phase stationnaire en 7 jours de culture. De plus, il est à noter que l'augmentation de la salinité du milieu de culture n'a pas d'effet négatif sur l'excrétion de l'IgG1 au sein du milieu de culture. En effet, à 20 mM de NaCl, une concentration 0.4 fois supérieure à celle contenue dans le milieu de culture sans ajout, a été retrouvée.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Pour pouvoir développer une procédure d'EBA par protéine A efficace, une première étude en batch et en lit fixe des paramètres chimiques a dû être menée. L'étude a donc tout d'abord portée sur le pH et la salinité lors du chargement et sur le pH lors de l'élution.

Cela a permis de montrer que le milieu ne peut être correctement purifié à son pH normal, environ 6, puisque l'adsorption de l'IgG1 est alors de 27%. Il est donc nécessaire d'augmenter le pH à 8.0 afin d'obtenir l'adsorption maximale observée. Ceci est concordant avec les données rapportées par GE Healthcare (2006) qui propose de réaliser celle-ci dans la plage de pH 8.0-9.0 pour un IgG1 de souris. En effet, l'augmentation du pH de la solution contenant les IgG1 permet de désactiver les charges des résidus histidines et ainsi de réduire les répulsions électrostatiques au niveau des sites de liaison des protéines A et des IgG (GE Healthcare, 2006) ; les pI des IgG1 de souris et des résidus histidines étant respectivement de 7.0-8.5 (Amersham Biosciences, 2001) et 7.6.

De plus, la salinité de l'échantillon à purifier a dû être étudiée afin d'augmenter la proportion d'IgG1 se liant aux protéines A. En effet, il peut être nécessaire d'ajouter jusqu'à 4 M de chlorure de sodium à certains échantillons contenant de l'IgG1 de souris pour permettre une adsorption efficace (GE Healthcare, 2006). Il a été montré que l'augmentation de la concentration en sel permet de réduire les forces de répulsion électrostatique et d'augmenter les interactions hydrophobiques (GE Healthcare, 2006)

entre l'IgG1 et la protéine A. Dans notre cas, dès 20 mM d'ajout de chlorure de sodium et 50 mM d'ajout de chlorure de potassium, l'adsorption de la protéine est grandement améliorée. En effet, ce faible ajout permet d'augmenter la force ionique déjà présente dans le milieu grâce aux protéines excrétées et aux sels contenus dans le milieu KCMS classique. Le sel étant potentiellement néfaste à la croissance cellulaire des suspensions de cellule de plante, l'ajout de sel a été fixé à 20 mM de NaCl. En réalisant une cinétique d'adsorption, l'adsorption de l'IgG1, dans ces conditions, a ensuite été caractérisée et modélisée par une cinétique d'ordre 1, ayant une constante k de 0.0202 min^{-1} . Enfin, le pH de la phase d'élution a été testé et il a ainsi été montré que le pH 5.0 permet d'obtenir la meilleur élution. Cela est cohérent avec la plage de pH, 4.0-6.0, rapporté par GE Healthcare (2006) pour l'élution d'IgG1 de souris. Ce pH d'élution est relativement avantageux puisqu'il évite l'utilisation de pH faible, qui peuvent altérer la conformation des immunoglobulines (Vijayalakshmi, 1998).

Ainsi cette optimisation a permis de fixer les paramètres de purification à pH 8.0 et 20 mM de NaCl pour le chargement et à pH 5.0 pour l'élution afin d'obtenir en chromatographie en lit fixe un rendement de 80%. Ces paramètres ont ensuite été testés pour la chromatographie en lit expansé. Ceux-ci ont permis d'obtenir un rendement relativement similaire de 83% en EBA. Les rendements présentés dans la littérature pour des EBA par Protéine A d'IgG sont plus proche de 90-95% mais ces purifications sont effectuées sur des milieux de culture d'hybridomes hautement concentrés en protéine d'intérêt, c'est à dire de 60 à 300 mg IgG/L (Thömmes et al., 1996 ; Lütkemeyer et al., 2001 ; Ohashi et al., 2002 ; Gonzalez et al., 2003).

La purification par EBA a aussi permis d'obtenir un facteur de concentration de 46.6 dans un échantillon de 35 mL. Ces résultats pourraient être grandement améliorés en passant d'une élution en mode expansé à une élution en mode compressé.

De plus, la qualité de cette chromatographie en lit expansé a été démontrée en réalisant une électrophorèse sur gel SDS-PAGE. Celle-ci a montré que cette purification permet d'éliminer la majorité des contaminants présents dans le milieu initial, à l'exception de certaines formes incomplètes de l'anticorps : 2H1L, 2H et 1H1L. En effet, ces formes incomplètes sont toujours capables de se fixer à la protéine A via leur chaîne lourde. La présence de ces formes incomplètes d'IgG1 est possiblement due à plusieurs phénomènes concomitants :

- Production de formes incomplètes par la lignée de cellule de tabac R514,
- Dégradation de l'IgG1 une fois secrété dans le milieu de culture,
- Opérations de congélations à -80°C puis décongélation du milieu à purifier ainsi que des fractions analysées lors de ce SDS-PAGE qui entraînent une dégradation de l'IgG1.

Les résultats obtenus démontrent clairement la possibilité de purifier efficacement l'IgG1 C5-1 par EBA protéine A. L'étude s'est donc ensuite penchée sur la possibilité de réaliser cette chromatographie en mode intégré et donc sur la possibilité de réaliser la culture des cellules de tabac au sein d'un milieu de culture ayant une plus grande concentration en sel. En effet, comme vu précédemment, il est nécessaire d'augmenter la salinité du milieu à purifier et cela ne peut être réalisé techniquement que dès le début de

la culture ou de la purification. Ce suivi de culture à différentes salinités a tout d'abord montré que l'augmentation de la salinité entraîne un allongement de la durée de la phase de latence, ce qui peut être imputé au stress osmotique induit par la modification de la composition du milieu de culture. Cependant, la salinité n'entraîne pas de modification du taux de croissance spécifique et retarde simplement la fin de la phase exponentielle de croissance. A 20 mM de NaCl, la culture des cellules de type R514 est ainsi possible sans engendrer un prolongement du temps de culture nécessaire, une diminution du taux de croissance spécifique ou une modification significative de l'excrétion de la protéine d'intérêt.

Cette étude a donc montrée que la réalisation d'un EBA protéine A en mode intégré est faisable en utilisant les paramètres optimisés trouvés précédemment.

CONCLUSION

Dans ce travail portant sur le développement d'une stratégie de purification par chromatographie en lit expansé, d'un anticorps produit en cellule de plante, les objectifs fixés ont été atteints. Dans l'ensemble, les résultats obtenus représentent un premier pas prometteur vers l'objectif final, celui d'effectuer la purification (EBA) en cours de culture d'une protéine sécrétée par des cellules de plante.

Tout d'abord, l'influence des paramètres chimiques, que sont le pH et la salinité, sur la qualité de la chromatographie, a été étudiée et a permis de fixer les paramètres clefs de la purification de l'IgG1 C5-1. La cinétique d'accroche de l'IgG1 a pu être modélisée par une cinétique d'ordre 1 et une constante k de 0.0202 min^{-1} , permettant ainsi de caractériser l'adsorption de C5-1 sur la protéine A dans les conditions optimales obtenues.

Puis ces paramètres ont été utilisés afin de réaliser une purification en EBA et ont permis d'obtenir un rendement de 83% et un facteur de concentration de 46.6. De plus, une électrophorèse sur gel SDS-PAGE a montré que cette purification permet d'éliminer la majorité des contaminants présents dans le milieu initial, à l'exception de certaines formes incomplètes de l'anticorps : 2H1L, 2H et 1H1L. Tous ces résultats ont montré notamment le besoin impératif d'augmenter le pH et la force ionique du milieu de culture ; paramètres à prendre en compte pour la mise en place de cette purification en mode intégré à la production. L'influence de la salinité sur la croissance de la lignée

cellulaire a donc été étudiée et a montré, qu'à 20 mM d'ajout de NaCl, la croissance et la productivité de R514 ne sont pas affectées.

Etant donné les questions qui restent à élucider, voici les recommandations pour les travaux futurs :

- Adapter les colonnes de sédimentation, proposées par De Dobbeleer (2006), afin de pouvoir réaliser la purification par EBA d'un bouillon de culture contenant des cellules et débris cellulaires.
- Confirmer le rendement de la chromatographie en lit expansé en utilisant un bouillon de culture contenant des cellules ; les débris cellulaires pouvant avoir un impact sur la qualité de la purification.
- Réaliser la purification en mode intégré afin de connaître l'impact de la purification intégrée sur la productivité de R514. En effet, de nombreuses études ont montrées que la purification en mode intégré permet d'augmenter la productivité du composé d'intérêt et d'éviter les phénomènes de dénaturation (Clemmitt et Chase, 2000).
- Augmenter, par des techniques de génie génétique, la quantité d'IgG1 produite par les cellules de tabac, notamment en favorisant l'excrétion du produit d'intérêt, afin de rendre viable ce procédé au niveau industriel.

Toutes ces possibilités futures, combinées avec les résultats positifs obtenus jusqu'à présent dans le domaine laissent entrevoir un avenir prometteur pour la méthode de purification intégrée présentée ici.

RÉFÉRENCES

- Altnta, E.B., Tüzmen, N., Uzun, L., & Denizli, A. (2007). Immobilized Metal Affinity Adsorption for Antibody Depletion from Human Serum with Monosize Beads. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 46, 7802-7810.
- Amersham Biosciences. (2001). *HiTrap rProtein A FF* (18-1121-88 AB). Uppsala: Wikströms.
- Anspach, F.B., Curbelo, D., Hartmann, R., Garke, G., & Deckwer, W.D. (1999). Expanded bed chromatography in primary protein purification. *Journal of Chromatography A*. 865, 129-144.
- Bai, Y., & Glatz, C.E. (2003). Capture of a recombinant protein from unclarified canola extract using STREAMLINE expanded bed anion exchange. *Biotechnology and Bioengineering*. 81, 855-864.
- Balasubramanian, D., Bryce, C.F.A., Dharmalingam, K., Green, J., & Jayaraman, Y. (2004). *Concepts in Biotechnology (Revised Edition)*. Hyderabad: Universities Press.
- Barnfield Frej, A.K., Johansson, H.J., Garke, G., & Deckwer, W.D. (1997). Expanded bed adsorption at production scale : Scale-up verification, process example and sanitisation of column and adsorbent. *Bioprocess Engineering*. 16(2), 57-63.
- Bateman, K.S., Congiu, M., & Tregear, G.W. (1997). Bacitracin significantly reduces degradation of peptides in plant cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 53, 226-231.
- Bjorklund, M., & Hearn, M.T.W. (1996). Characterization of silica-based heparin-affinity adsorbents through column chromatography of plasma fractions containing thrombin. *Journal of Chromatography A*. 743, 145-162.
- Born, C., Thömmes, J., Biselli, M., Wandrey, C., & Kula, M.R. (1996). An approach to integrated antibody production : coupling of fluidised bed cultivation and fluidised bed adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*. 15, 21-29.
- Brobjer, M. (1999). Development and scale-up of a capture step (expanded bed chromatography) for a fusion protein expressed intracellularly in *Eschericia coli*. *Bioseparation*. 8, 219-228.

Chang, Y.K., McCreath, G.E., & Chase, H.A. (1995). Development of an expanded bed technique for an affinity purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates. *Biotechnology and Bioengineering*. 48, 355-366.

Chang, Y.K., & Chase, H.A. (1996). Ion exchange purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates using expanded bed adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*. 49, 204-216.

Chase, H.A., & Draeger, N.M. (1992). Affinity purification of proteins using expanded beds. *Journal of chromatography*. 597, 129-145.

Chase, H.A. (1998). The use of affinity adsorbents in expanded bed adsorption. *Journal of molecular recognition*. 11, 217-221.

Choi, J.-W., Cho, G.H., Byun, S.Y., & Kim, D.-I. (2001). Integrated Bioprocessing for Plant Cell Cultures. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 72, 63-102.

Clemmitt, R.H., & Chase, H.A. (2000). Immobilised metal affinity chromatography of β -galactosidase from unclarified *Escherichia coli* homogenates using expanded bed adsorption. *Journal of Chromatography A*. 874, 27-43.

De Dobbeleer, C., Cloutier, M., Fouilland, M., Legros, R., & Jolicoeur, M. (2006). A high-rate perfusion bioreactor for plant cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 95(6), 1126-1137.

De Wilde, C., Van Houdt, H., De Buck, S., Angenon, G., De Jager, G., & Depicker, A. (2000). Plants as bioreactors for protein production: avoiding the problem of the transgene silencing. *Plant Molecular Biology*. 43, 347-359.

Doran, P.M. (2000). Foreign protein production in plant tissue cultures. *Current Opinion in Biotechnology*. 11(2), 199-204.

Doran, P.M. (2006). Loss of secreted antibody from transgenic plant tissue cultures due to surface adsorption. *Journal of Biotechnology*. 122, 39-54.

Draeger, N.M., & Chase, H.A. (1991). Liquid fluidised bed adsorption of protein in the presence of cells. *Bioseparation*. 2, 67-80.

Evangelista, R.L., Kusnadi, A.R., Howard, J.A., & Nikolov, Z.L. (1998). Process and economic evaluation of the extraction and purification of recombinant β -glucuronidase from transgenic corn. *Biotechnology Progress*. 14, 607-614.

- Finette, G.M.S., Mao, Q.M., & Hearn, M.T.W. (1996). Studies on the expansion characteristics of fluidised beds with silica-based adsorbents used in the purification of proteins. *Journal of Chromatography A*. 743, 53-73.
- Fischer, R., Hoffmann, K., Schillberg, S., & Emans, N. (2000). Antibody production by molecular farming in plants. *Journal of Biological Regulators Homeostatic Agents*. 14, 83-92.
- Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., & Twyman, R.M. (2004). Plant-Based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology*. 7, 152-158.
- GE Healthcare. (2005). *HiTrap rProtein A FF 1 ml and 5 ml* (71-5002-73 AG). Tofters: Elanders.
- GE Healthcare. (2006). *STREAMLINE rProtein A* (71-5000-24 AC). Östervåla: Elanders.
- Ghose, S., & Chase, H.A. (2000). Expanded Bed Chromatography of Proteins in small columns. I. Scale down and Validation. *Bioseparation*. 9, 21-28.
- Giddings, G. (2001). Transgenic plants as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology*. 12, 450-454.
- Goldsby, R.A., Kindt, T.J., & Osborne, B.A. (2001). *Kuby Immunology 4e*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Gonzalez, Y., Ibarra, N., Gomez, H., Gonzalez, M., Dorta, L., Padilla, S., & Valdes, R.J. (2003). Expanded bed adsorption processing of mammalian cell culture fluid: comparison with packed bed affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*. 784, 183-187.
- Griffith, C.M., Morris, J., Robichaud, M., Annen, M.J., Mc Cormick, A.V., & Klickinger, M.C. (1997). Fluidization Characteristics of and Protein Adsorption by Porous Zirconium Oxide Particles in a Fluidized-Bed. *Journal of Chromatography*. 776, 179-195.
- Hage, D.S. (2005). *Handbook of Affinity Chromatography*. Boca Raton: CRC Press.
- Hahn, R., Shimahara, Z., Steindl, F., & Jungbauer, A. (2006). Comparison of protein A affinity sorbents III. Life time study. *Journal of Chromatography A*. 1102, 224-231.
- Hames, B.D., & Hooper, N.M. (2005). *Biochemistry* (Third Edition). Leeds: Taylor & Francis.

- Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R.M., & Fischer, R. (2004). Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnology*. 22(11), 1415-1422.
- Hiatt, A., Cafferkey, R., & Bowdish, K. (1989). Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*. 342, 76-78.
- Hjorth, R., Kampe, S., & Carlsson, M. (1995). Analysis of Some Operating Parameters of Novel Adsorbents for Recovery of Proteins in Expanded Beds. *Bioseparations*. 5, 217-223.
- Horn, M.E., Woodard, S.L., & Howard, J.A. (2004). Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Reports*. 22, 711-720.
- Hubbuck, J.J., Heeboll-Nielsen, A., Hobley, T.J., & Thomas, O.R.T. (2002). A new fluid distribution system for scale-flexible expanded bed adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*. 78, 35-43.
- Hubbuck, J., Thommes, J., & Kula, M.R. (2005). Biochemical engineering aspects of expanded bed adsorption. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 92, 101-23.
- Ishihara, T., Kadoya, T., Endo, N., & Yamamoto, S. (2006). Optimization of elution salt concentration in stepwise elution of protein chromatography using linear gradient elution data Reducing residual protein A by cation-exchange chromatography in monoclonal antibody purification. *Journal of Chromatography A*. 1114, 97-101.
- Jiang, W., & Hearn, M.T.W. (1996). Protein-interaction with immobilized metal-ion affinity ligands under high ionic strength conditions. *Analytical Biochemistry*. 242, 45-54.
- Joh, L.D., Wroblewski, T., Ewing, N.N., & VanderGheynst, J.S. (2005). High-level transient expression of recombinant protein lettuce. *Biotechnology and Bioengineering*. 91(7), 861-871.
- Klvana, M., Legros, R., & Jolicoeur, M. (2005). In situ extraction strategy affects benzophenanthridine alkaloid production fluxes in suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. *Biotechnology and Bioengineering*. 89(3), 280-289.
- Ko, K., & Koprowski, H. (2005). Plant biopharming of monoclonal antibodies. *Virus Research*. 111, 93-100.
- Kula, M.R. (1990). Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction. *Bioseparation*. 1, 181-189.

- Khoudi, H., Laberge, S., Ferullo, J.-M., Bazin, R., Darveau, A., Castonguay, Y., Allard, G., Lemieux, R., & Vézina, L.-P. (1999). Production of a Diagnostic Monoclonal Antibody in Perennial Alfalfa Plants. *Biotechnology and Bioengineering*. 64(2), 135-143.
- LaCount, W., An, G., & Lee, J.M. (1997). The effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) on the heavy chain monoclonal antibody production from plant suspension cultures. *Biotechnology Letters*. 19, 93-96.
- Lamboursain, L., & Jolicoeur, M. (2005). Determination of cell concentration in a plant cell suspension using a fluorescence microplate reader. *Plant Cell Reports*. 23, 665-672.
- Larrick, J.W., Yu, L., Naftzger, C., Jaiswal, S., & Wycoff, K. (2001). Production of secretory IgA antibodies in plants. *Biomolecular Engineering*. 18, 87-94.
- Lee-Parsons, C.W.T., & Shuler, M.L. (2002). The effect of ajmalicine spiking and resin addition timing on the production of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 79(4), 408-415.
- Lihme, A., Hansen, M., Olander, M., & Zafirakos, E. (2000). Expanded bed adsorption in the purification of biomolecules. In M.A. Desai (éd.), *Downstream processing of proteins, Methods and protocols* (pp. 121-139). Totowa: Humana press.
- Lin, D.Q., Fernandez-Lahore, H.M., Kula, M.R., & Thommes, J. (2001). Minimising biomass/adsorbent interactions in expanded bed adsorption processes: A methodological design approach. *Bioseparation*. 10(1-3), 7-19.
- Lütkemeyer, D., Ameskamp, N., Priesner, C., Bartsch, E.M., & Lehmann, J. (2001). Capture of proteins from mammalian cells in pilot scale using different STREAMLINE adsorbents. *Bioseparation*. 10, 57-63.
- Ma, J.K.-C., Drake P.M.W., & Christou, P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*. 4(10), 794-805.
- Ma, J.K.-C., Drake, P.M.W., Chargelegue, D., Obregon, P., & Prada, A. (2005). Antibody processing and engineering in plants, and new strategies for vaccine production. *Vaccine*. 23 (2005) 1814-1818.
- Menkhaus, T.J., & Glatz, C.E. (2005). Antibody Capture from Corn Endosperm Extracts by Packed Bed and Expanded Bed Adsorption. *Biotechnology Progress*. 21, 473-485.
- Miele, L. (1997). Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations. *Trends in Biotechnology*. 15(2), 45-50.

- Mullick, A., Griffith, C.M., & Flickinger, M.C. (1998). Expanded and Packed Bed Albumin Adsorption on Fluoride Modified Zirconia. *Biotechnology and Bioengineering*. 60, 333-340.
- Narayanan, S.R. (1994). Preparative affinity chromatography of proteins. *Journal of Chromatography A*. 658(2), 237-258.
- Newcombe, A.R., Cresswell, C., Davie, S., Watson, K., Harris, G., O'Donovan, K., & Francis, R. (2004). Optimised affinity purification of polyclonal antibodies from hyper immunised ovine serum using a synthetic Protein A adsorbent, MAbsorbent® A2P. *Journal of Chromatography B*. 814, 209-215.
- Noronha, S., Kaufman, J., & Shiloach, J. (1999). Use of Streamline chelating for capture and purification of poly-His-tagged recombinant proteins. *Bioseparation*. 8(1), 145-151.
- Odabasi, M., & Denizli, A. (2001). Polyhydroxyethylmethacrylate Based Magnetic DNA-Affinity Beads for Anti-DNA Antibody Removal from Systemic Lupus Erythematosus Patient Plasma. *Journal of Chromatography B*. 760(1), 137-148.
- Ohashi, R., Otero, J.M., Chwistek, A., Yamato, I., & Hamel, J-F.P. (2002). On-Line Purification of Monoclonal Antibodies Using an Integrated Stirred-Tank Reactor/Expanded-Bed Adsorption System. *Biotechnology Progress*. 18, 1292-1300.
- Okushima, Y., Koizumi, N., & Sano, H. (1999). Glycosylation and its adequate processing is critical for protein secretion in tobacco BY2 cells. *Journal of Plant Physiology*. 154, 623-627.
- Ozyurt, S., Kirdar, B., & Ulgen, K.O. (2002). Recovery of antithrombin III from milk by expanded bed chromatography. *Journal of Chromatography A*. 944, 203-210.
- Pai, A., Gondkar, S., & Lali, A. (2000). Enhanced performance of expanded bed chromatography on rigid superporous adsorbent matrix. *Journal of Chromatography A*. 867, 113-130.
- Perrin, Y., Vaquero, C., Gerrard, I., Sack, M., Drossard, J., Stoger, E., Christou, P., & Fischer, R. (2000). Transgenic pea seeds as bioreactors for the production of a single-chain Fv fragment (scFV) antibody used in cancer diagnosis and therapy. *Molecular Breeding*. 6, 345-352.
- Roque, A.C.A., Lowe, C.R., & Taipa, M.Â. (2004). Antibodies and genetically engineered related molecules: Production and purification. *Biotechnology Progress*. 20(3), 639-654.

Roque, A.C.A, Silva, C.S.O., & Taipa, M.A. (2007). Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: Advances and perspectives. *Journal of Chromatography A*. 1160, 44-55.

Schiermeyer, A., Schinkel, H., Apel, S., Fischer, R., & Schillberg, S. (2005). Production of *Desmodus rotundus* salivary plasminogen activator $\alpha 1$ (DSPA $\alpha 1$) in tobacco is hampered by proteolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. 89, 848-858.

Schillberg, S., Fischera, R., & Emans, N. (2003). 'Molecular farming' of antibodies in plants. *Naturwissenschaften*. 90, 145-155.

Schillberg, S., Twyman, R.M., & Fischer, R. (2005). Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants - technology assessment. *Vaccine*. 23, 1764-1769.

Sharp, J.M., & Doran, P.M. (1999). Effect of bacitracin on growth and monoclonal antibody production by tobacco hairy roots and cell suspensions. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 4, 253-258.

Sharp, J.M., & Doran, P.M. (2001). Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. *Biotechnology Progress*. 17, 979-992.

Song, M.-J., Bae, J., Lee, D.-S., Kim, C.-H., Kim, J.-S., Kim, S.-W., & Hong, S.-I. (2006). Purification and characterization of prodigiosin produced by integrated bioreactor from *Serratia* sp. KH-95. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101(2), 157-161.

Stoger, E., Vaquero, C., Torres, E., Sack, M., Nicholson, L., Drossard, J., Williams, S., Keen, D., Perrin, Y., Christou, P., & Fischer, R. (2000). Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Molecular Biology*. 42, 583-590.

Thömmes, J., Halfar, M., Lenz, S., & Kula, M.R. (1995). Purification of monoclonal antibodies from whole hybridoma fermentation broth by fluidised bed adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*. 45, 203-211.

Thömmes, J., & Kula, M.R. (1995). Membrane chromatography – An integrative concept in the downstream processing of proteins. *Biotechnology Progress*. 11, 335-367.

Thömmes, J., Bader, A., Halfar, M., Karau, A., & Kula, M.R. (1996). Isolation of monoclonal-antibodies from cell containing hybridoma broth using a protein-A coated adsorbent in expanded beds. *Journal of Chromatography A*. 752, 111-122.

Tsoi, B.M.-Y., & Doran, P.M. (2002). Effect of medium properties and additives on antibody stability and accumulation in suspended plant cell cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 35, 171-180.

Twyman, R.M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., & Fischer, R. (2003). Molecular farming in plants: hosts systems and expression technology. *Trends in Biotechnology*. 21(12), 570-578.

Vergnault, H. (2004). *Etude et amélioration de la chromatographie en lit expansé*. Ph.D. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, Toulouse, France.

Vijayalakshmi, M.A. (1998). Antibody purification methods. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 75, 93-102.

Williams, R.D., Chauret, N., Bédard, C., & Archambault, J. (1992). Effect of polymeric adsorbents on the production of sanguinarine by *Papaver somniferum* cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 40(8), 971-977.

Wongsamuth, R., & Doran, P.M. (1997). Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots. *Biotechnology and Bioengineering*. 54, 401-415.

ANNEXE : VALIDATION DE L'ELISA

Dans cette annexe sera présenté différents tests ayant été réalisés afin de valider le choix de notre méthode analytique.

Tout d'abord, 3 échantillons de milieu de fin de culture en flacon ont été testés par ELISA. Les résultats de ce premier ELISA sont résumés en figure A-1 et tableau A-1.

La figure A-1 présente la courbe de calibration entre 0 et 10 ng IgG1/mL, obtenue lors de la réalisation de cet ELISA. Il est à noter que chaque point de la courbe de calibration est réalisé en triplicata ; cela menant à un très faible écart type pour chacun de ces points. De plus, le coefficient de détermination R^2 de 0.996 permet de confirmer la linéarité entre l'absorbance à 450 nm et la concentration en IgG1 sur notre gamme de concentration.

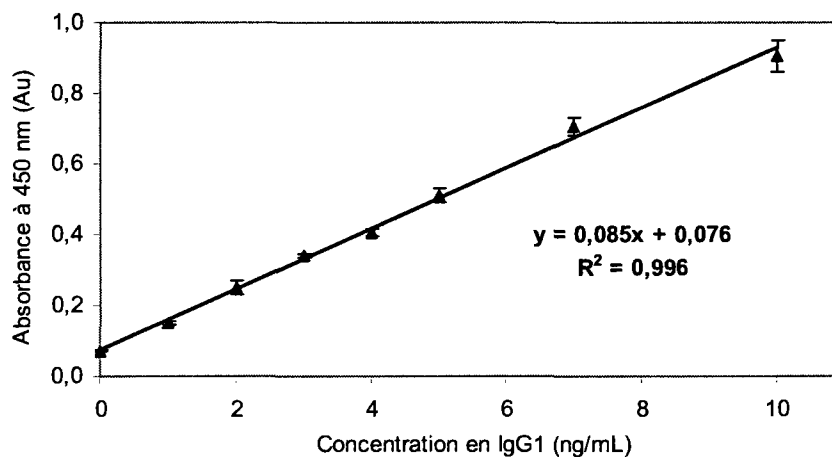


Figure A-1: Courbe d'étalonnage d'ELISA entre 0 et 10 ng IgG1/mL

Tableau A-1 : Résultats d'ELISA pour 3 échantillons de milieu de fin de culture en flacon.

Échantillon	Dilution	Absorbance (Au)	IgG1 ($\mu\text{g/mL}$)	Moyenne ($\mu\text{g/mL}$)	Écart type
1	200	0.799	1.696	1.735	0.049
		0.839	1.790		
		0.809	1.720		
2	200	0.589	1.204	1.262	0.064
		0.643	1.330		
		0.609	1.251		
3	100	0.832	0.887	0.916	0.035
		0.889	0.954		
		0.849	0.907		

L'équation reliant l'absorbance à la concentration permet ainsi de calculer la concentration en IgG1 de nos échantillons (tableau A-1). Encore une fois, l'écart type obtenu reste faible.

L'ELISA a ensuite été comparé à la méthode par résonance plasmonique de surface (SPR) à l'aide d'un anticorps anti-souris reconnaissant spécifiquement les IgG (GE Healthcare, BR-1008-38). Le tableau A-2 présente les résultats obtenus par SPR et les comparent à ceux obtenus précédemment par ELISA.

Tableau A-2 : Comparaison des concentrations en IgG1 obtenues par ELISA et par SPR pour 3 échantillons de milieu de fin de culture en flacon.

Échantillon	ELISA		SPR		SPR / ELISA
	IgG1 ($\mu\text{g/mL}$)	Écart type	IgG1 ($\mu\text{g/mL}$)	Écart type	
1	1.735	0.049	2.829	0.266	1.63
2	1.262	0.064	2.129	0.254	1.69
3	0.916	0.035	1.522	0.220	1.66

Le tableau A-2 montre tout d'abord que les valeurs obtenues en SPR sont entachées d'un écart type important. De plus, un facteur 1.66 en moyenne est observé entre les résultats obtenus en SPR et en ELISA pour ces échantillons. Cette différence significative peut être due à des interactions non spécifiques lors des tests par SPR. Suite à ces résultats, l'ELISA sera donc utilisé tout au long de ce projet de recherche étant donné notamment qu'il est considéré comme la méthode analytique standard pour doser la concentration d'un anticorps en solution.

Ainsi, un dernier test a été réalisé afin de connaître l'écart inter essai existant entre les mesures d'un même échantillon réalisées lors de deux analyses par ELISA différentes. Cette fois-ci, deux échantillons de milieu de fin de culture en flacon ainsi qu'un échantillon provenant de prélèvement lors d'une culture de R514 en bioréacteur seront analysés (Tableau A-3).

Tableau A-3 : Comparaison des concentrations en IgG1 obtenues lors de 2 analyses par ELISA différentes

Échantillon	ELISA 1		ELISA 2	
	IgG1 ($\mu\text{g/mL}$)	Écart type	IgG1 ($\mu\text{g/mL}$)	Écart type
Flacon 3	0.916	0.035	0.898	0.146
Flacon 4	1.039	0.082	1.060	0.128
Bioréacteur 2	0.344	0.039	0.354	0.048

En moyenne, un écart de 2.3 % (tableau A-3) entre ces 2 ELISA est observé ce qui semble tout a fait acceptable.