

Université de Montréal

**Impact de la modification du métabolisme primaire des
cellules CHO sur leur productivité**

par
Cécile Toussaint

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire
Faculté de Médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de Docteur
en Biochimie

Décembre, 2016

© Cécile Toussaint, 2016

Résumé

Les approches thérapeutiques à base d'anticorps monoclonaux font partie des avenues les plus encourageantes pour le traitement de nombreux cancers. Les cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) demeurent la plateforme d'expression d'anticorps la plus couramment utilisée dans l'industrie et est actuellement la plus efficace pour la production à grande échelle. Ces cellules sont capables de produire des anticorps présentant un patron de glycosylation très proche du profil humain et d'atteindre des niveaux de production généralement plus élevés que ceux obtenus avec les autres lignées cellulaires continues existantes. Ces dernières années, les progrès accomplis dans le développement de procédés en cuvée alimentée (*fed-batch*) ont permis d'augmenter significativement les rendements de production. Néanmoins, les performances des procédés de culture demeurent limitées par les caractéristiques métaboliques des cellules utilisées. Celles-ci présentent en effet une glycolyse et une glutaminolyse dérégulées associées à une forte production de métabolites toxiques tels que le lactate et les ions ammonium. Seule une fraction minime du pyruvate issu de la métabolisation du glucose est incorporée dans le cycle des acides tricarboxyliques (ATC), ce qui explique en partie le métabolisme peu efficace des cellules CHO. Une des enzymes responsables de la connexion entre la glycolyse et le cycle des ATC est la pyruvate carboxylase qui catalyse la conversion du pyruvate en oxaloacétate. Dans les cellules CHO, seulement 5 à 10 % du pyruvate est métabolisé par cette enzyme.

Ce projet de recherche s'appuie sur l'hypothèse selon laquelle contrer la déficience de l'activité de la pyruvate carboxylase dans les cellules CHO pourrait pallier en partie au phénomène de dérégulation de la glycolyse, ce qui permettrait d'améliorer la productivité d'anticorps des cellules tout en maintenant une glycosylation adéquate du produit final.

Au cours de ces travaux, une lignée cellulaire exprimant de façon stable l'enzyme pyruvate carboxylase de levure, au niveau cytosolique (PYC2) a été générée. Cultivées en mode cuvée alimentée, ces cellules ont montré une croissance et une production d'anticorps améliorées par rapport à la lignée parentale non modifiée. L'analyse des flux métaboliques par marquage isotopique a permis de caractériser en détail le métabolisme de ces cellules. Des différences majeures dans la distribution des flux métaboliques intracellulaires notamment au

niveau des flux associés à la lactate déshydrogénase et au cycle de Krebs ont été mises en évidence. L'analyse de la glycosylation a révélé pour sa part, que l'augmentation de la production d'anticorps associée à la modification du métabolisme n'avait pas altéré significativement la qualité du produit final.

De façon générale, ce projet de recherche semble corroborer l'existence d'un lien entre la productivité d'anticorps et le métabolisme cellulaire. La caractérisation du métabolisme des cellules CHO et plus précisément du métabolisme du lactate participe à améliorer notre compréhension du métabolisme des cellules CHO et pourrait permettre une amélioration plus rationnelle des fonctions cellulaires d'une part, et des conditions de culture d'autre part.

Mots-clés : Cellules CHO, anticorps, cuvée alimentée, métabolisme, lactate, flux métaboliques, glycosylation.

Abstract

Antibody-based therapy is a promising approach for cancer treatment. Chinese hamster ovary (CHO) cells represents the most common and efficient antibody expression platform for large scale production. Their abilities to perform human-like glycosylation and produce high antibody titer make them the most suitable system compared to other continuous cell lines. In the past few years, advances in fed-batch process development led to significantly increase production yields. Nevertheless, the metabolic features of continuous cell lines constitute a hurdle to the improvement of process performances. Continuous cell lines typically exhibit a deregulated glycolysis and glutaminolysis causing the accumulation of toxic metabolites such as lactate and ammonia. Thus, only a small percentage of pyruvate, derived from glucose, is incorporated into the tricarboxylic acids (TCA) cycle explaining at least, in part the inefficient CHO cell metabolism. The mitochondrial pyruvate carboxylase, which catalyzes the conversion of pyruvate into oxaloacetate, is one of the key enzymes at the junction of the glycolysis and the TCA cycle. In CHO cells, only 5-10 % of the pyruvate pool is metabolized via this pathway.

In this project, we hypothesized that counteracting the pyruvate carboxylase deficiency in CHO cells could alleviate in part, the deregulated glycolysis and consequently improve antibody production yield while maintaining satisfactory antibody glycosylation.

In this work, a recombinant CHO cell line producing an antibody was further genetically modified with the insertion of a cytoplasmic yeast pyruvate carboxylase (PYC2) gene. Cultivated in fed-batch mode, PYC2 cells exhibited enhanced cell growth and antibody production yield compared to the parental cell line. Metabolic flux analysis using isotopic tracer led to a detailed characterisation of both cell line metabolism. The metabolic flux distribution obtained highlighted major differences in lactate and TCA fluxes. Comparative glycosylation analysis revealed that the metabolism alteration associated with the increase in antibody production did not significantly alter the product quality.

This work seems to corroborate the presumed existence of a link between metabolism and antibody productivity. The cell metabolism characterization and more precisely, lactate production contribute to gain knowledge in CHO cell metabolism and led to rationally improve cellular functions and culture conditions.

Keywords: CHO cells, antibody, fed-batch, metabolism, lactate, metabolic flux analysis, glycosylation.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvii
Introduction.....	1
Hypothèse et Objectif.....	3
1. Problématique.....	3
2. Hypothèse et objectifs.....	3
3. Contribution de chacun des auteurs aux articles.....	4
Revue de littérature.....	6
1. Les anticorps à usage thérapeutique.....	6
1.1. Le marché des anticorps.....	6
1.2. Les formats d'anticorps et le cas particulier de l'EG2.....	7
1.3. Les plateformes d'expression des anticorps.....	9
2. La culture de cellules de mammifères.....	10
2.1. Développement de lignées cellulaires.....	10
2.1.1. Les cellules de mammifères utilisées comme systèmes d'expression.....	10
2.1.2. Génération de lignées cellulaires productrices d'anticorps.....	11
2.2. Amélioration de la productivité des cultures.....	12
2.2.1. Les stratégies d'alimentation.....	12
2.2.2. Procédés bi-phasiques avec changement de la température.....	15
3. Le métabolisme des cellules de mammifères en culture.....	17
3.1. Le métabolisme du glucose.....	18
3.2. Le métabolisme de la glutamine.....	23

3.3.	Le métabolisme du lactate	25
3.4.	Le métabolisme des acides aminés	29
3.5.	Lien entre métabolisme et production d'anticorps.....	30
4.	Stratégies pour minimiser la production de lactate et d'ammoniaque	32
4.1.	Stratégies pour minimiser la production de lactate.....	32
4.2.	Stratégies pour minimiser la production d'ammoniaque	36
4.3.	L'analyse des flux métaboliques par marquage isotopique : un outil pour le contrôle et la caractérisation du métabolisme des cellules	38
5.	La glycosylation des anticorps.....	41
5.1.	Les fonctions biologiques des anticorps	41
5.2.	Synthèse biologique des glycanes	45
5.3.	Les facteurs influençant la glycosylation.....	47
5.3.1.	La concentration en glucose.....	47
5.3.2.	La concentration en glutamine.....	47
5.3.3.	La disponibilité en acides aminés	48
5.3.4.	Les ions ammonium et le pH	48
5.4.	Stratégies pour améliorer la glycosylation des anticorps au cours du procédé de culture	50
5.4.1.	Les suppléments.....	50
5.4.2.	Ingénierie enzymatique.....	52
6.	Conclusion	53
Chapitre 1 : Modification du métabolisme du lactate de cellules CHO cultivées en mode cuvée alimentée.....		
54		
1.	Présentation de l'article.....	54
2.	Metabolic engineering to alter lactate metabolism during fed-batch cultures	55
2.1.	Abstract.....	55
2.2.	Introduction.....	56
2.3.	Materials et methods	58
2.3.1.	Stable cell line development	58
2.3.2.	Fed-batch culture in shake flasks for clone evaluation.....	59

2.3.3. PYC2 cytosolic expression	59
2.4. Results	62
2.5. Discussion	72
2.6. Conclusion	75
Chapitre 2 : Le devenir du lactate métabolisé par les cellules CHO	76
1. Mise en contexte	76
2. The fate of lactate metabolized by CHO cells	77
2.1. Abstract	77
2.2. Introduction	78
2.3. Materials and methods	80
2.4. Results	84
2.5. Discussion	92
2.6. Conclusion	95
Chapitre 3: Évaluation de l'impact du procédé et du génie cellulaire sur le rendement et la qualité du produit final.....	96
1. Mise en contexte	96
2. Combined assessment of process and CHO cell engineering on antibody yield and quality	97
2.1. Abstract	97
2.2. Introduction	98
2.3. Materials and Methods.....	100
2.4. Results and discussion	103
Discussion générale	114
Conclusions et recommandations	120
Bibliographie.....	i
Annexe 1 : Données supplémentaires relatives au chapitre 2.....	i

Liste des tableaux

Tableau 1 : Mode d'action des anticorps thérapeutiques.....	43
Tableau 2 : Comparaison de l'effet de supplémentation en précurseurs de la glycosylation sur la glycosylation d'anticorps monoclonaux produits en cellules CHO.....	51
Table 3 : Cell specific consumption/production rates in shake flask cultures.....	68
Table 4 : Cell specific consumption/production rates in bioreactor cultures.....	71
Table 5 : Specific rates of glucose/lactate consumption/production in PYC2 and parental cell lines during exponential and early decline phase in 1 L shake flask cultures	107
Table 6 : Specific rates of glutamine/ammonia consumption/production in PYC2 and parental cell lines during exponential and early decline phase in 1 L shake flask cultures.....	107
Table 7 : Effects of culture duration, addition of supplements, concentrated feed solution and cell line on the galactosylation and sialylation index	110

Liste des figures

Figure 1: Les différents types d'anticorps.	8
Figure 2: Génération de lignées cellulaires pour la production de protéines recombinantes. ..	11
Figure 3: Les différentes stratégies d'alimentation.	13
Figure 4: Aperçu du métabolisme central des cellules animales.	17
Figure 5: Comparaison du métabolisme des cellules normales et des lignées cellulaires continues en prolifération active.	18
Figure 6: Les différentes voies de régénération du NAD ⁺ dans le cytosol: La lactate déshydrogénase, la navette glycérophosphate et la navette malate/aspartate.	19
Figure 7: Les voies principales du métabolisme central et les protéines régulatrices clés qui contrôlent l'activation et l'expression des enzymes métaboliques.	22
Figure 8: Principales voies pour l'utilisation de la glutamine.	24
Figure 9: Voies alternatives de la métabolisation de la glutamine	25
Figure 10: La lactate déshydrogénase.....	26
Figure 11 : Le rôle des transporteurs MCT dans le métabolisme central	27
Figure 12: Implication des acides aminés dans le métabolisme central.	30
Figure 13: Différentes stratégies de génie métabolique pour améliorer l'efficacité du métabolisme des lignées cellulaires continues.....	34
Figure 14: Principe de l'analyse des flux métaboliques intracellulaires par marquage isotopique	38
Figure 15: Mode d'action des anticorps cytolytiques.....	42

Figure 16: Distribution des principales glycoformes présentes sur le Fc d'IgG circulant chez l'Homme	44
Figure 17: Voie de biosynthèse des nucléotides-sucres.....	45
Figure 18: Voie de synthèse des N-glycans des anticorps	46
Figure 19 : Generation of a stable cell line expressing PYC2..	62
Figure 20 : Lactate and viable cell concentration profiles.....	64
Figure 21: Final lactate and ammonia concentrations for PYC2 and parental cell lines cultivated in 4 different media in shake-flask cultures.....	65
Figure 22: Evolution of pH for the parental cell line and 3 PYC2 positive clones cultivated in 6 wells plates equipped with pH sensors (HydroDish®).....	66
Figure 23: Cell density, cell viability, glucose, lactate, glutamine and ammonia concentration profiles during batch and fed-batch cultivations in shake-flask cultures.....	67
Figure 24: Cell density, cell viability, glucose, lactate , glutamine and ammonia concentration profiles fed-batch cultivations in bioreactor cultures.....	70
Figure 25 : Comparison of maximum antibody titers between parental and PYC2-expressing cells cultivated in shake flasks and bioreactors.	71
Figure 26 : Viable cell density, cell viability, glucose, glutamine, lactate, ammonia and antibody profiles of PYC2 and parental clones cultivated in shake flasks in batch mode	85
Figure 27 : Cells specific uptake of extracellular metabolites in PYC2 and Parental cell lines during exponential and stationary phase in cultures containing 3-[13C] lactate.	87
Figure 28 : Mass isotopomer distribution of intracellular metabolites measured in PYC2 and parental cells during the exponential and the stationary phases.	88

Figure 29 : Metabolic flux map of parental and PYC2 cells line during exponential growth phase and stationary growth phase.....	90
Figure 30 : Time-course of pyruvate carboxylase enzyme activity during batch cultures in PYC2 and parental cell.	92
Figure 31 : Cell density, cell viability, antibody concentration profiles of parental and PYC2-expressing cells cultivated with EfficientFeed B and Feed12.7	104
Figure 32 : Glucose, glutamine, lactate and ammonia concentration profiles for parental and PYC2-expressing cells cultivated with Efficient Feed B and Feed12.7.	106
Figure 33 : Lectin-blot analysis of antibody galactosylation.....	108
Figure 34 : Glycan distribution of antibody produced in EfficientFeedB and in Feed12.7....	109

Liste des sigles et abréviations

1,3 BPG : 1,3-bisphosphoglycérate

2PG : 2-phosphoglycérate

AC : Anticorps

ACoA : Acétyl-Coenzyme A

ACL : ATP citrate lyase

ADCC : Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*)

ADCP : Phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (*Antibody dependent cellular phagocytosis*)

AFM-¹³C : Analyse des flux métaboliques par marquage au carbone 13

AlaT : Alanine transaminase

α Glc I: α -1,2 glucosidase I

α Glc II: α -1,2 glucosidase II

α -KG : α -cétoglutarate

α -KGDH : α -cétoglutarate déshydrogénase

α Man I: α -mannosidase I

α Man II: α -mannosidase II

AspT : Aspartate transaminase

ATC : Acides tricarboxyliques

BHK-21 : Rein de bébé hamster (*Baby hamster kidney*)

CDC : Cytotoxicité dépendante de l'activation du complément (*Complement dependent cytotoxicity*)

CHO : Ovaire de hamster chinois (Chinese hamster ovary)

Cit : Citrate

CRISPR/Cas9 : Courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées associées à la protéine 9 (Clustered regularly interspaced palindromic repeats associated protein 9)

CS : Citrate synthétase
CTP : Cytidine triphosphate
DHAP : Dihydroxyacétone phosphate
DHFR : dihydrofolate réductase
DMI : Distribution de masse des isotopomères
EGF : Facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor*)
EGFR: Recepteur de l'EGF
ENO : Enolase
EPO : Érythropoïétine
F2,6P2 : Fructose 2,6-bisphosphate
F1,6P2 : Fructose-1,6 bisphosphate
F6P : Fructose-6-phosphate
Fc: Fragment cristallisable des anticorps
Fc γ R: Récepteur γ au Fc
Fuc: Fucose
Fum : Fumarate
FUS : Fumarase
FUT8 : Fucosyltransférase 8
G3PDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
G3PH : Glycéraldéhyde-3-phosphate
G6P: Glucose-6-phosphate
Gal : Galactose
GalNAc : N-acétylgalactosamine
Gal T : Galactosyltransférase
GDH : Glutamate déshydrogénase
Glc : Glucose
GlcNAc : N-acétylglucosamine
GlcNAc TII : β -1,2 N-acétylglucosaminetransférase II
GLS : Glutaminase
GLUT : transporteur du glucose
GPI : Glucose-6-phosphatase isomérase (ou PGI : phosphoglucose isomérase)

GS : Glutamine synthétase
GTP : Guanosine triphosphate
HEK293 : Rein embryonnaire humain (*Human embryonic kidney*)
hFc : Fragment cristallisable humain des anticorps (*human Fc*)
hGM-CSF : Facteur humain de stimulation des colonies de macrophages et granulocytes (*human granulocyte macrophage colony stimulating factor*)
HIF-1: Facteur 1 inductible à l'hypoxie (Hypoxia inducible factor 1)
HK : Hexokinase
HRE : Élément de réponse à l'hypoxie (*Hypoxia response element*)
IDH : Isocitrate déshydrogénase
LDH : Lactate déshydrogénase
Mal : Malate
MCT : transporteur de monocarboxylate
MDH : Malate déshydrogénase
ME : Enzyme malique (*malic enzyme*)
MS : Spectrométrie de masse (*Mass spectrometry*)
MSX : methionine sulfoximine
MTX : méthotrexate
NK : *Natural Killer*
OAA : Oxaloacetate
OST : Oligosaccharyltransférase
PC : Pyruvate carboxylase
PEP : Phosphoénolpyruvate
PDH : pyruvate déshydrogénase
PDK : pyruvate déshydrogénase kinase
PFK : Phosphofructokinase
PGK : Phosphoglycérate kinase
PGM: Phosphoglycerate mutase
PK : Pyruvate kinase
PYC2 : Pyruvate carboxylase 2 de levure (*pyruvate yeast carboxylase 2*)
Pyr : Pyruvate

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SDH : Succinate déshydrogénase

Sia T : Sialyltransférase

Suc : Succinate

t-PA : Activateur tissulaire du plasminogène (*tissue activator plasminogen*)

TPI : Triose-phosphate isomérase

UDP-Gal : UDP-galactose

UDP-GalNAc : UDP-N-acétylgalactosamine

UDP-Glc : UDP-glucose

UDP-GlcNAc : UDP-N-acétylglucosamine

UTP : Uridine triphosphate

vWF : Facteur de von Willebrand (*Von Willebrand factor*)

À Nour, JM et Magali,

Remerciements

Je souhaite tout d'abord exprimer ma reconnaissance à M. Yves Durocher pour son encadrement, ses conseils scientifiques, mais aussi pour sa confiance accordée tout au long de cette thèse. Je tiens également à remercier vivement mon codirecteur de recherche, M. Olivier Henry pour ses conseils avisés, son implication et l'aide très précieuse qu'il m'a apportée tout au long de mon parcours.

A mon arrivée au labo du CNRC, j'ai pu rencontrer des personnes exceptionnelles. Aussi je souhaiterais donc remercier les membres du groupe HHT pour leurs expertises, leurs bonnes humeurs et leurs disponibilités. Christian, Roz, Sylvie, et Louis, je vous ai tellement sollicitée, et vous m'avez tellement aidée. Je vous remercie du fond du cœur. Gilles et Johnny, je ne suis pas prête d'oublier nos petites discussions. J'ai une pensée pour mes compagnons de doctorat qui sont déjà passés par cette étape; Élodie, Charles, Sam, Céline.

Je tiens également à remercier Adeline, Alina, Benoit, Charles, Éric, Florian, Fred, Kahina, Nesrine, Qi, et Yuan. Je vous suis reconnaissante pour tous les très bons moments passés en votre compagnie. Je vous dois tellement de fous rires. Je souhaite également remercier mon amie de longue date, Audrey qui a en quelque sorte tracé la voie et qui fut mon seul point de repère à mon arrivée au Québec.

Je voudrais remercier mes parents et ma sœur, pour leurs soutiens inconditionnels malgré l'océan qui nous sépare !

Je voudrais remercier ma famille québécoise pour sa grande générosité.

René, je te remercie d'être présent à mes côtés, te rencontrer aura été la plus belle chose qui me soit arrivée pendant mon doctorat.

Introduction

Le nombre d'anticorps utilisés pour des essais cliniques ou pour des applications thérapeutiques n'a cessé d'augmenter depuis ces dernières années. Leurs applications thérapeutiques sont très étendues, allant du traitement des cancers ou des maladies auto-immunes jusqu'au traitement des allergies. Dans le cadre de la lutte contre le cancer, il s'avère que les approches thérapeutiques basées sur l'utilisation d'anticorps soient des plus prometteuses.

La culture de cellules de mammifères, et plus particulièrement des cellules CHO, représente la plateforme de production d'anticorps la plus utilisée. En effet, 70 % des anticorps sont produits à partir de ces cellules. Leur capacité à produire de hauts niveaux d'anticorps sur de longues périodes (jusqu'à plusieurs semaines), leur relative stabilité génétique ainsi que leur machinerie post-traductionnelle capable de générer des patrons de glycanes proches de ceux des humains en font un système d'expression de choix pour des applications thérapeutiques humaines. Étant donné que les fonctions effectrices des anticorps sont dépendantes de leur patron de glycosylation, il est donc nécessaire de produire des anticorps présentant une glycosylation optimale. De plus, d'un point de vue industriel, il est primordial de garantir une qualité constante des anticorps d'un lot de production à l'autre.

Que ce soit pour soutenir les phases de développement d'un nouvel agent thérapeutique ou les besoins du marché une fois ce dernier homologué, la capacité de générer efficacement et à faibles coûts des anticorps demeure un élément capital. Les rendements des procédés de culture cellulaire dépendent à la fois de la productivité spécifique des cellules, de la concentration cellulaire maximale atteinte en culture et de la durée pendant laquelle les cellules peuvent maintenir une forte viabilité cellulaire. Les efforts entrepris pour améliorer les procédés de culture sont traditionnellement focalisés sur le développement de milieux de culture et la mise en œuvre de stratégies de contrôle pour gérer efficacement l'alimentation du procédé au cours du temps. Dans l'industrie, les procédés les plus optimisés permettent d'atteindre des rendements de production de l'ordre de 5-10 g d'anticorps par litre de culture. A ce jour, malgré les progrès réalisés, les performances des procédés demeurent limitées par les caractéristiques métaboliques des lignées cellulaires utilisées. Ces cellules présentent un métabolisme du

glucose et de la glutamine peu efficace car générant de fortes concentrations de lactate et d'ammoniaque dans le milieu de culture. L'accumulation de ces composés est à la fois néfaste pour la croissance cellulaire et la qualité du produit final. En effet, au-delà d'un certain seuil critique, le lactate inhibe la croissance cellulaire et entraîne l'acidification du milieu de culture. Dans le cadre d'une culture où le pH est régulé par l'ajout de base, l'accumulation de lactate amène une augmentation de l'osmolalité, qui peut elle aussi être délétère pour la croissance cellulaire. L'accumulation d'ammoniaque peut quant à elle altérer le profil de glycosylation des anticorps. Ainsi de nombreux efforts ont été entrepris afin de minimiser la production de déchets métaboliques pour améliorer les rendements de production des procédés de culture.

Deux types de stratégies peuvent être envisagés pour l'amélioration de l'efficacité du métabolisme cellulaire. Il est possible d'améliorer le procédé en lui-même en modifiant les paramètres physico-chimiques du procédé (*e.g.* ; la température ou la composition du milieu de culture). Une seconde stratégie consiste à modifier directement les voies du métabolisme central au moyen du génie génétique. La connaissance limitée des flux métaboliques et de leurs régulations sous-jacentes représente un frein à la conception plus rationnelle des milieux de culture et à l'identification de cibles potentielles pour l'utilisation des techniques modernes d'ingénierie métabolique.

Hypothèse et Objectif

1. Problématique

Les lignées cellulaires continues (immortelles) utilisées dans l'industrie présentent un métabolisme inefficace, caractérisé par une consommation de glucose et de glutamine supérieure au besoin requis pour la croissance cellulaire. Cette dérégulation est associée à la production de lactate et d'ammoniaque, délétères pour la viabilité cellulaire, les rendements de production et la qualité du produit final. Il est ainsi nécessaire de développer des stratégies permettant de réorienter le métabolisme cellulaire vers un métabolisme plus efficace améliorant ainsi la qualité et les rendements de production d'anticorps. Ces stratégies devront être transposables au mode de culture couramment utilisé dans l'industrie. Une compréhension approfondie de la physiologie des lignées cellulaires continues est requise pour une approche plus rationnelle de la mise en œuvre des stratégies d'alimentation et pour l'identification de cible potentielle pour l'ingénierie métabolique.

2. Hypothèse et objectifs

Les travaux présentés ici ont été élaborés à partir de l'hypothèse selon laquelle améliorer l'efficacité métabolique des cellules permettrait l'amélioration des performances des procédés de culture en termes de rendement et de qualité du produit final dans un contexte de culture en mode cuvée alimentée. L'ensemble des travaux présentés s'articule autour de l'hypothèse selon laquelle l'inefficacité du métabolisme des cellules CHO est dû à un manque de connectivité entre la glycolyse et le cycle de Krebs. Ainsi rétablir ce lien permettrait d'améliorer le métabolisme cellulaire, la longévité de la culture et finalement la production d'anticorps tout en maintenant la qualité (glycosylation) du produit final. Ainsi ce travail s'organise autour de 3 objectifs spécifiques.

- Objectif 1 : Générer une lignée cellulaire exprimant de façon stable l'enzyme de la pyruvate carboxylase 2 de levure (PYC2).

- Objectif 2 : Développer un procédé en cuvée alimentée exploitant les changements métaboliques générés par PYC2.
- Objectif 3 : Caractériser le métabolisme de la lignée cellulaire PYC2 et parentale grâce à l'utilisation de technique de marquage isotopique.
- Objectif 4 : Réaliser une analyse comparative de la glycosylation de l'anticorps produit dans les cellules PYC2 et de la lignée parentale.

3. Contribution de chacun des auteurs aux articles

Article 1: *Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures*

Cécile Toussaint ^{a,b}, Olivier Henry ^c, Yves Durocher ^{a,b}

Publié dans : *Journal of biotechnology*.

J'ai défini le sujet ainsi que ses limites. J'ai conçu et réalisé les expériences de clonage, de cultures cellulaires (flacons et bioréacteurs), d'analyses biochimiques et d'immuno-buvarages. J'ai réalisé l'analyse et l'interprétation des résultats. J'ai écrit le manuscrit.

Olivier Henry a supervisé l'ensemble de l'étude, relu et corrigé le manuscrit.

Yves Durocher a supervisé l'ensemble de l'étude, validé les résultats et leur analyse. Il a relu et corrigé le manuscrit avant de procéder à sa soumission.

Article 2: *The fate of lactate in metabolically engineered CHO cells*

Cécile Toussaint, Yves Durocher, Olivier Henry

En préparation

J'ai défini le sujet ainsi que ses limites. J'ai conçu et réalisé les expériences de cultures cellulaires et d'extraction des métabolites intracellulaires. J'ai participé à l'élaboration du modèle métabolique et aux calculs des flux métaboliques intracellulaires. J'ai réalisé l'analyse et l'interprétation des résultats. J'ai écrit le manuscrit.

Yves Durocher a supervisé l'ensemble de l'étude relu et corrigé le manuscrit.

Olivier Henry a supervisé l'ensemble de l'études, participé à l'élaboration du modèle métabolique et aux calculs des flux. Il a validé les résultats et leur analyse. Il a relu et corrigé le manuscrit.

Article 3: ***Combined assessment of process and CHO cell engineering on antibody yield and quality***

Cécile Toussaint, Denis Brochu, Michel Gilbert, Olivier Henry, Yves Durocher

En préparation

J'ai défini le sujet ainsi que ses limites. J'ai conçu et réalisé les expériences de cultures cellulaires, de purifications, d'analyses biochimiques et d'immuno-buvardage. J'ai analysé les résultats et écrit le manuscrit.

Denis Brochu a réalisé l'analyses de la distribution des glycanes par HILIC.

Michel Gilbert a supervisé l'analyse des échantillons par HILLIC.

Olivier Henry a supervisé l'ensemble de l'étude, validé les résultats et leur analyse. Il relu et corrigé le manuscrit.

Yves Durocher a supervisé l'ensemble de l'étude validé les résultats et leur analyse. Il relu et corrigé le manuscrit.

Revue de littérature

1. Les anticorps à usage thérapeutique

1.1. Le marché des anticorps

Les anticorps thérapeutiques constituent de loin la classe de produits biologiques la plus importante du marché des biopharmaceutiques. Ils couvrent de nombreuses indications contre des maladies répandues permettant le traitement de milliers de patients aussi bien que des indications contre des maladies orphelines. Les anticorps sont ainsi utilisés pour le traitement des scléroses multiples, de l'asthme ou de l'arthrite (Pavlou and Reichert, 2004). Néanmoins, la majorité des anticorps sont destinés à la lutte contre les cancers ou aux traitements des maladies auto-immunes et auto-inflammatoires. En termes d'indications, la lutte contre le cancer représente un marché de 91 milliards de dollars US alors que les maladies auto-immunes et inflammatoires représentent un marché de 41 milliards de dollars US (Ecker et al., 2015). Depuis l'autorisation de mise sur le marché en 1986 du premier anticorps à usage thérapeutique (OKT3), cette classe de produit biologique n'a cessé de se développer. Alors que pendant les années 1980-1990 les anticorps représentaient à peine 10% des produits biologiques, ils représentent aujourd'hui plus de 27 % des produits approuvés issus des biotechnologies (Walsh, 2014). Le nombre d'anticorps mis sur le marché a tellement augmenté qu'en 2013 le revenu global des ventes d'anticorps a atteint 75 milliards de dollars US, représentant une augmentation de 90 % depuis 2008. Pendant cette même période, le marché des protéines recombinantes n'a augmenté que de 26 %. En termes de ventes de produits biopharmaceutiques, la moitié est attribuée aux anticorps ce qui témoigne du développement beaucoup plus rapide du marché des anticorps comparé aux autres produits biopharmaceutiques (Elvin et al., 2013). Avec une moyenne de 3 à 5 nouveaux produits approuvés annuellement au États-Unis et en Europe au cours des dernières années et le développement de plus de 300 nouveaux anticorps candidats pour de nouvelles indications, on estime à plus de 70 le nombre d'anticorps devant être mis sur le marché d'ici 2020. Cela représenterait un marché de plus de 125 milliards de dollars US. Afin de répondre aux demandes de ce marché grandissant, les quantités d'anticorps produites annuellement ont dû être revues à la hausse. En 2013, 10 tonnes d'anticorps ont été produites

contre 8.6 tonnes pour toutes les autres classes de protéines recombinantes. À la vue de ces données, il paraît essentiel d'augmenter drastiquement les capacités de production ainsi que d'améliorer les méthodes de production pour les années à venir. L'amélioration des rendements de production permettrait également de produire ces anticorps de façon plus économique et dans des délais raisonnables. De cette manière, les anticorps pourraient pénétrer de nouveaux marchés et être offerts dans des zones géographiques pour lesquelles l'accès à des produits innovants et coûteux demeure très limité. L'expiration de nombreux brevets protégeant des *blockbusters* tels que le Trastuzumab (Herceptin) ou le Cetuximab (Erbix) laisse anticiper un développement accru de bio-similaires. Une version du Remicade (anti TNF α) a été le premier bio-similaire à être approuvé en Europe en septembre 2013. L'Amérique Latine, la Chine, l'Asie du Sud-Est, l'Inde et la Russie montrent un intérêt grandissant pour le développement de bio-similaires (Ecker et al., 2015).

1.2. Les formats d'anticorps et le cas particulier de l'EG2

La plupart des anticorps utilisés comme thérapeutiques sont des immunoglobulines G (IgG), la forme majoritaire circulante dans le sérum. Les anticorps thérapeutiques peuvent être utilisés dans leur forme dite intacte, c'est-à-dire composée de 2 chaînes lourdes, et de 2 chaînes légères (Figure 1). La chaîne lourde se divise en un domaine variable (VH) et en trois domaines constants ; CH1, CH2 et CH3. Ces deux derniers domaines constituent le fragment cristallisable (Fc). La chaîne légère, quant à elle, est composée d'un domaine variable (VL) et d'un domaine constant (CL). Les régions VH-CH1 et VL-CL, appelées également Fab, constituent le domaine de liaison à l'antigène, alors que les fonctions effectrices de l'anticorps (voir section 5) sont médiées par la partie Fc. Les avancées en ingénierie génétique des anticorps ont permis de mettre au point différents formats d'anticorps tels que des formats monovalents (Fab, scFv) ou divalents (Fab², diabodies, minibodies). Nombre de ces formats sont actuellement en essais cliniques. En effet, cinq Fab thérapeutiques sont actuellement disponibles sur le marché aux États-Unis et en Europe (Holliger and Hudson, 2005). Les fragments Fab (50kD) et scFv (27kD) présentent la même affinité que l'anticorps parental et ont l'avantage potentiel de pénétrer plus rapidement et plus efficacement les tissus tumoraux. Par contre, en l'absence du domaine Fc, ils présentent un temps de demi-vie en circulation beaucoup plus faible (quelque heures) comparé aux anticorps intacts (25 jours) (Chames et al., 2009).

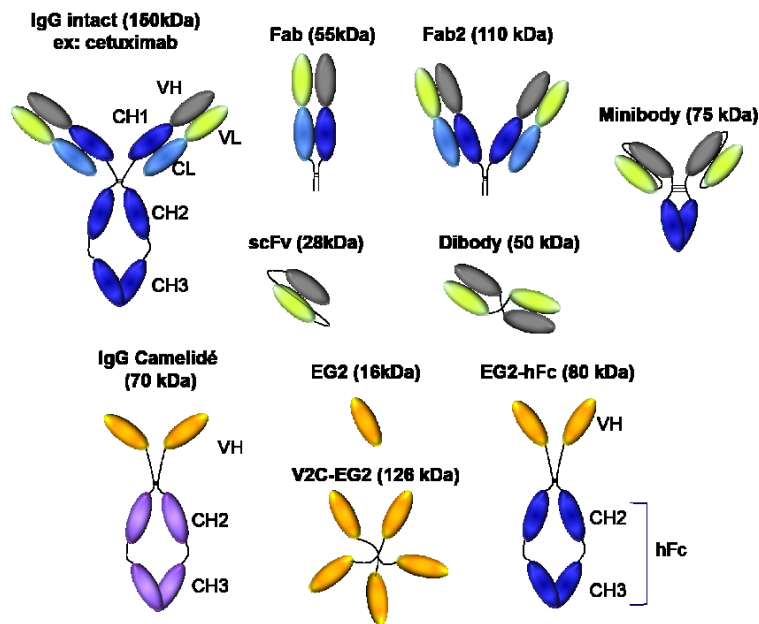


Figure 1: Les différents types d'anticorps.

En 1993, un format particulier d'anticorps, dépourvu de chaîne légère et de domaine CH1 est retrouvé naturellement chez les camélidés (lamas, alpagas) (Hamers-Casterman et al., 1993). L'importance biologique de ce type d'anticorps n'est pas encore établie, mais leur capacité à lier l'antigène avec une forte affinité, même dans des sites cryptiques, leur résistance aux détergents, aux protéases et aux températures élevées en font des anticorps qui pourraient se substituer, dans certains cas aux anticorps conventionnels (Omidfar and Shirvani, 2012; van der Linden et al., 1999). Un VH/camélidé dirigé contre le TNF α et un VH/camélidé dirigé contre le facteur von Willebrand sont actuellement en phase de développement clinique.

Dans notre étude, le produit d'intérêt est un anticorps dérivé de camélidé qui est dirigé contre le récepteur de l'EGF (Agrawal et al., 2012). De nombreuses études ont montré que le récepteur de l'EGF est surexprimé dans de multiples cancers épithéliaux. Dans les années 1980, plusieurs équipes de recherche ont produit des anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur de EGF et étudié leur mécanisme d'action (Aboud-Pirak et al., 1988; Kawamoto et al., 1983; Sato et al., 1988). En 2004, le Cetuximab (Erbix) a été approuvé par la FDA pour le traitement des cancers métastatiques du colon. Malgré son succès, une de ses limitations est sa

faible pénétration dans les tumeurs et sa distribution non uniforme dans les tissus. Cette situation est retrouvée dans la plupart des traitements utilisant des anticorps monoclonaux intacts dont la taille moyenne est d'environ 150 kDa. Ainsi, il semblerait qu'un anticorps d'une taille intermédiaire, soit inférieure à 150 kDa et supérieure à 60 kDa (seuil de filtration par les glomérules), serait un agent anti-tumoral idéal permettant une pénétration rapide et efficace des tissus (Minchinton and Tannock, 2006; Wang et al., 2008).

Bell et al. (2010) ont testé sur des souris trois types de construction d'anticorps de camélidés dirigés contre le récepteur de l'EGF : L'EG2 (VHH ~ 16 kDa), V2C-EG2 (5VH~ 126 kDa) et EG2-hFc (VH fusionné à un Fc humain d'IgG ~ 80 kDa) (Figure 1). Injecté en intraveineuse, l'EG2-hFc montre une excellente accumulation au niveau de la tumeur ainsi qu'un temps de demi-vie équivalent aux IgG. Sa taille modérée de 80 kDa et son Fc humain font de l'EG2-hFc un anticorps qui pourrait surpasser les anticorps thérapeutiques conventionnels.

1.3. Les plateformes d'expression des anticorps

Parmi les 47 anticorps approuvés aux États-Unis et en Europe, 44 sont produits dans les cellules de mammifères. Cette situation s'explique par le fait que, contrairement aux levures et bactéries, les cellules de mammifères possèdent la machinerie post-traductionnelle nécessaire pour générer les structures de glycans spécifiques des anticorps. Seulement 3 fragments d'anticorps sont produits en *E. coli*, il s'agit de deux Fab et d'un Fc non glycosylé fusionné à un peptide. Étant donné que la plupart des Fab ne sont pas naturellement glycosylés, il est avantageux de les produire en *E. coli*. En revanche, pour contrecarrer leur pharmacocinétique rapide, ils doivent être chimiquement modifiés, par exemple, en les conjuguant avec du polyéthylène glycol comme dans le cas du Certolizumab (Elvin et al., 2013). Dans le cas de la production d'un Fc non glycosylé, il faut s'attendre à une activité effectrice minimale (voir section 5.1 les fonctions biologiques des anticorps) (Beck and Reichert, 2011; Reichert, 2012). Ainsi, les anticorps destinés à déclencher des réponses cytolytiques dans le cadre d'une indication oncologique doivent être produits dans des systèmes de mammifères.

2. La culture de cellules de mammifères

2.1. Développement de lignées cellulaires

2.1.1. Les cellules de mammifères utilisées comme systèmes d'expression

Les rendements des procédés de culture cellulaire dépendent à la fois de la productivité spécifique des cellules, de la concentration cellulaire maximale atteinte et de la durée pendant laquelle les cellules peuvent maintenir une forte viabilité cellulaire (Dinnis and James, 2005). Pour la production d'anticorps, les cellules doivent être capables de permettre une forte expression du produit sur une longue période de temps, de présenter une stabilité génétique (expression stable du transgène au cours du temps), d'être facilement cultivable à grande échelle, de présenter une machinerie post-traductionnelle proche de l'humain et d'être sécuritaire pour l'Homme. Les anticorps mis sur le marché sont produits dans les cellules CHO, NS0 et Sp2/0. Les cellules HEK293 dérivées de cellules rénales embryonnaires humaines et les cellules PER.C6 dérivées de cellules rétinienne fœtales humaines font l'objet de très nombreux travaux de recherche pour le développement de nouveaux systèmes d'expression (Wurm, 2004). Cependant, depuis l'utilisation des cellules CHO en 1986 pour la production de l'activateur du plasminogène tissulaire (t-PA), ces cellules sont restées le système d'expression préférentiel pour la production industrielle de protéines recombinantes. Les cellules NS0 et Sp2/0 sont des cellules dérivées de myélome murin qui présentent le désavantage de produire des patrons de glycosylation potentiellement immunogènes, constitués d'acide glycolylneuraminique (Neu5Gc) et de résidus α -1,3 galactose, qui sont absents dans les cellules CHO (Jefferis, 2009). (Jefferis, 2009). Les cellules CHO sont capables d'ajouter l'acide sialique uniquement en α -2, 3, alors que la liaison humaine est en α -2, 6 pour les anticorps. De plus, il semblerait que les cellules NS0, HEK293 et PER.C6 présentent des productivités spécifiques d'anticorps généralement plus faibles (5-20 pg/cellule jour) que les cellules CHO (> 50 pg/cellule jour) (Kunert and Reinhart, 2016).

2.1.2. Génération de lignées cellulaires productrices d'anticorps

Le développement de procédés de production de protéines recombinantes suit un processus bien établi (Figure 2). Le gène d'intérêt, accompagné d'un marqueur de sélection, est transféré dans les cellules. Les cellules transfectées présenteront ainsi un avantage lorsqu'elles seront soumises à un agent de sélection et seules les cellules ayant intégré le gène de sélection pourront survivre en culture. Le marqueur de sélection peut consister en une cassette de résistance à un antibiotique, comme l'hygromycine, la généticine ou la puromycine. Actuellement, la plupart des compagnies pharmaceutiques utilisent les systèmes dihydrofolate réductase (DHFR) / méthotrexate (MTX) ou le système glutamine synthétase (GS) / méthionine sulfoximine (MSX) comme méthode de sélection. La dihydrofolate réductase est une enzyme impliquée dans le métabolisme des nucléotides et la glutamine synthétase est impliquée dans la synthèse de la glutamine.

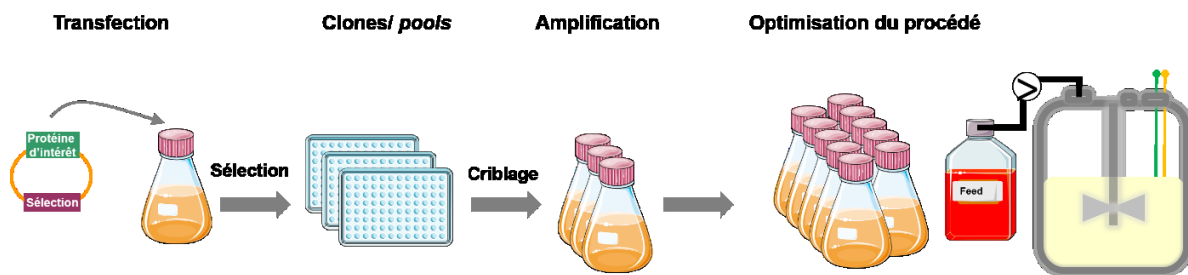


Figure 2: Génération de lignées cellulaires pour la production de protéines recombinantes.

Le méthotrexate et la méthionine sulfoximine inhibent respectivement la dihydrofolate réductase et la glutamine synthétase. Ainsi, en présence de ces inhibiteurs, les cellules qui auront le niveau le plus élevé d'expression de dihydrofolate réductase ou de glutamine synthétase seront résistantes au méthotrexate ou à la méthionine sulfoximine et pourront croître en culture, contrairement aux cellules non transformées.

Après l'étape de sélection, des clones individuels ou des *pools* cellulaires sont criblés en fonction de leur niveau d'expression de la protéine d'intérêt. Les meilleurs producteurs sont

retenus pour des analyses plus poussées, telles que la stabilité génétique, la qualité du produit final, la croissance cellulaire et la productivité. En général, un seul candidat est retenu pour la production à grande échelle de la protéine recombinante.

Le type cellulaire, les promoteurs utilisés pour l'expression du produit d'intérêt, les méthodes de transfection ou de sélection, et le choix du milieu de croissance sont autant de facteurs qui ont un impact sur les niveaux d'expression du produit (Costa et al., 2010). Ainsi, les constantes améliorations apportées au cours des 30 dernières années au niveau de la croissance cellulaire et des rendements de production ont permis de passer d'une densité maximale de 2×10^6 cellules/mL pour 10 pg/cellules jours d'anticorps à plus de 35×10^6 cellules/mL pour plus de 50 pg/cellules jours d'anticorps. Cette progression est le fruit d'une meilleure compréhension de l'expression des gènes, du métabolisme et de la croissance des cellules de mammifères. Ainsi, la poursuite de l'amélioration de l'ingénierie des cellules hôtes d'une part et du développement des procédés de production d'autre part demeurent deux axes de recherche cruciaux pour le perfectionnement des systèmes de production.

2.2. Amélioration de la productivité des cultures

2.2.1. Les stratégies d'alimentation

Au cours de cette dernière décennie, différents modes de culture ont été développés dans l'optique d'améliorer les rendements de production en protéines recombinantes. Dans cette section, les modes de culture en cuvée (*batch*), cuvée alimentée (*fed-batch*) et perfusion ainsi que leurs impacts sur les performances des procédés de production seront abordés (Figure 3).

La culture en mode cuvée consiste en un système fermé dans lequel aucun ajout n'a lieu, sauf des ajouts de base pour la régulation du pH dans le cadre d'un bioréacteur contrôlé. Ce genre de procédé est simple à mettre en œuvre, mais est caractérisé par une déplétion rapide des nutriments du milieu de culture tandis que les métabolites toxiques s'accumulent au cours du temps. Ce type de procédé ne permet généralement pas d'atteindre de hautes densités cellulaires ni des rendements de production satisfaisants.

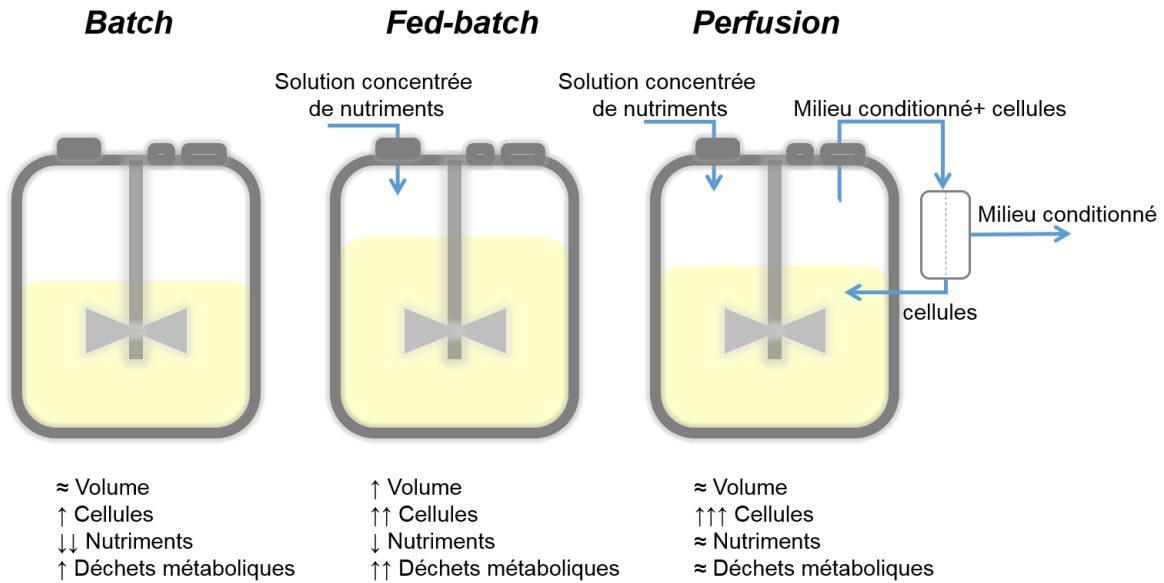


Figure 3: Les différentes stratégies d'alimentation.

Le développement de cultures opérées en mode cuvée alimentée a permis de pallier au moins en partie aux limitations en nutriments observées pendant les cultures en mode cuvée (Wlaschin and Hu, 2006). Il s'agit d'ajouter des solutions concentrées de nutriments au milieu de base au cours de la période de culture. Ce mode opératoire permet généralement d'augmenter la biomasse, la longévité de la culture et la concentration finale en anticorps. Les efforts entrepris pour améliorer les procédés en cuvée alimentée se sont traditionnellement focalisés sur le développement de milieux de culture et la mise en œuvre de stratégies de contrôle pour gérer efficacement l'alimentation du procédé. Dans l'industrie, ce mode d'opération permet d'atteindre des rendements de production de l'ordre de 5-10 g/L d'anticorps pour les procédés les plus optimisés (Vijayasankaran et al., 2010). A ce jour, malgré les progrès réalisés, les performances de ces procédés sont limitées par le fait que les lignées cellulaires utilisées présentent un métabolisme du glucose et de la glutamine peu efficace, c'est-à-dire qu'elles génèrent de fortes concentrations de déchets métaboliques, comme le lactate et l'ammonium dans le milieu de culture. L'accumulation de ces composés est à la fois néfaste pour la croissance cellulaire et la qualité du produit final (Borys et al., 1994; Omasa et al., 1991). Néanmoins, le mode cuvée alimentée reste le mode de culture prédominant de cette dernière décennie ; il est

plus performant que le mode cuvée tout en conservant une simplicité de mise en œuvre, puisqu'il ne nécessite pas d'équipements coûteux et sophistiqués contrairement au mode de culture en perfusion (Heath and Kiss, 2007). Cependant, il nécessite un travail important de développement pour un meilleur contrôle des paramètres opératoires. Le métabolisme des cellules de mammifères étant très complexe et la connaissance de la régulation des facteurs intracellulaires impliqués dans le métabolisme étant limitée, la définition des paramètres opératoires tels que la fréquence, la nature et la quantité des ajouts se fait généralement suivant des approches empiriques. Néanmoins, il est nécessaire d'établir des méthodes de développement rationnelles et systématiques. Une bonne alimentation doit garantir que la croissance cellulaire et la formation du produit final ne soient pas limitées par une déplétion de certains composés du milieu ou inhibées par des concentrations excessives de nutriments et/ou de déchets métaboliques accumulés. Une bonne estimation des taux de consommation des composés du milieu est donc requise (Xie and Wang, 1993). En mode cuvée alimentée, certains nutriments peuvent être ajoutés à des taux insuffisants, affectant ainsi la croissance cellulaire et la production d'anticorps. Ainsi, la glycosylation de l'anticorps peut être altérée lorsque des quantités insuffisantes de glutamine et de glucose sont ajoutées pendant la période de culture (Hayter et al., 1992; Nyberg et al., 1998). Pour le développement de ce genre de procédés, trois éléments sont à prendre en compte : i) la concentration minimale qui doit être maintenue pour les principaux nutriments, ii) le mode d'alimentation continu ou intermittent et iii) le moment et les volumes à ajouter (Wlaschin and Hu, 2006). Une bonne stratégie d'ajout de milieu est généralement conçue pour ajouter les nutriments dans des ratios stœchiométriques appropriés correspondant à leurs vitesses de consommation tout en gardant leurs concentrations dans la gamme ciblée (Adams et al., 2007).

Depuis quelques années, l'industrie s'intéresse au développement de procédés perfusés pour la production d'anticorps. Ce mode de culture consiste à ajouter continuellement du milieu frais et à soutirer le milieu conditionné (contenant la protéine produite) au même débit permettant ainsi l'élimination des déchets toxiques pour les cellules. Ce procédé permet l'obtention de très hautes densités cellulaires, jusqu'à 40×10^6 cellules / mL, et une productivité volumétrique plus élevée comparé aux autres modes de culture (Karst et al., 2016). Outre les

coûts de mise en place, les volumes à purifier peuvent devenir assez importants, entre 10 et 50 fois plus grands que le volume utile du bioréacteur, suivant le débit et la durée de la culture.

Le mode de culture continu, appelé également *chemostat* consiste à ajouter en continu de milieu frais et à soutirer le milieu conditionné en même temps que les cellules. Ce système permet le maintien et le contrôle du taux de croissance et de la densité cellulaire. Ce procédé fournit aux cellules un environnement stable en régime permanent, intéressant pour les études de physiologie et de métabolisme cellulaire (Maranga and Goochee, 2006; Vergara et al., 2014; Xie et al., 1997).

2.2.2. Procédés bi-phasiques avec changement de la température

De nombreuses études ont montré qu'une réduction de la température de 37 °C à 28- 33 °C entraîne un ralentissement ou une inhibition de la croissance, ainsi qu'une augmentation de la longévité de la culture, accompagnés d'une augmentation de la productivité spécifique des cellules CHO cultivées en mode cuvée. Le mécanisme selon lequel la productivité spécifique des cellules est augmentée dans des conditions de légère hypothermie est mal connu. Il semblerait cependant que la régulation du cycle cellulaire, la machinerie transcriptionnelle, ainsi que l'expression de protéines chaperonnes spécifiques soient impliquées dans la réponse cellulaire à la réduction de la température. Quelques études ont montré que l'arrêt de croissance induit par la réduction de température était corrélé avec le maintien d'une grande proportion des cellules CHO en phase G0/G1 (Oguchi et al., 2006; Yoon et al., 2006; Yoon et al., 2003). Cependant, certains travaux montrent que le contrôle seul de la prolifération par l'ajout d'inhibiteur de croissance ou par le contrôle du taux de dilution dans des cultures en *chemostat* ne semble pas suffisant pour augmenter la productivité spécifique des cellules (Oguchi et al., 2006; Vergara et al., 2014). Ces données suggèrent un effet positif supplémentaire de la réduction de la température. Au niveau transcriptionnel, les études sont contradictoires. Alors que Fox et al. (2005) montrent qu'une diminution de température entraîne une augmentation du niveau ARNm de l'IFN γ , Yoon et al. (2003) n'observent aucun changement de niveau de transcription de l'anticorps. Étant donné que le niveau d'ARN dépend de sa vitesse de transcription et de dégradation, il serait possible d'envisager que la diminution de température permettrait d'augmenter la stabilité des ARNm de façon globale par l'intermédiaire de

l'expression de protéines chaperonnes. Danno et al. (1997) ont mis en évidence une augmentation des niveaux de transcription de *cold inductible RNA binding protein* (CIRP) et de *RNA binding motif protein 3* (RBM3) lors d'une diminution de température ou d'un blocage de la synthèse protéique par la cycloheximidine (inhibiteur de la phase d'initiation et d'élongation de la synthèse protéique). CIRP et RBM3 sont impliquées dans la modulation de la transcription et de la traduction en fonctionnant en tant que chaperonnes de l'ARN. CIRP induit l'arrêt de croissance à faible température et est capable de protéger et restaurer la conformation native des ARNm. Elle permet d'améliorer l'efficacité de la traduction et la stabilité des ARNm. RBM3 peut interagir avec des miRNA et améliorer la synthèse protéique.

Dans le domaine des procédés de culture, des procédés dits « bi-phasiques » ont été mis en place (Kumar et al., 2007). La première phase de culture s'effectue à 37° C pour permettre de maximiser la biomasse. Ensuite, la température est diminuée afin de réduire la croissance des cellules pendant la phase de production.

3. Le métabolisme des cellules de mammifères en culture

La croissance et la survie cellulaire sont directement liées au métabolisme des cellules. Pendant une culture, il est essentiel de suivre l'état métabolique des cellules afin de fournir aux cellules un environnement adéquat pour garantir une croissance et une production d'anticorps optimale. Le métabolisme est composé de l'anabolisme, correspondant aux voies de biosynthèse qui permettent l'accumulation de la biomasse, et du catabolisme générateur d'énergie et de précurseurs de l'anabolisme. Le métabolisme énergétique comprend principalement la glycolyse, le cycle des acides tricarboxyliques (ATC ou cycle de Krebs) et la chaîne respiratoire (Figure 4). Ainsi, l'état métabolique cellulaire dépend de différents mécanismes, notamment la disponibilité en nutriments, leur transport, l'activité de chacune des voies, la phosphorylation oxydative et l'équilibre oxydo-réducteur. En réponse à l'altération de certaines voies métaboliques, la flexibilité du métabolisme cellulaire permet l'ajustement d'autres voies modifiant ainsi le métabolisme général de la cellule. Pour les cellules en culture, le glucose et la glutamine constituent les principales sources de carbone qui alimentent le métabolisme central permettant ainsi de soutenir la croissance et la productivité des cellules de mammifères.

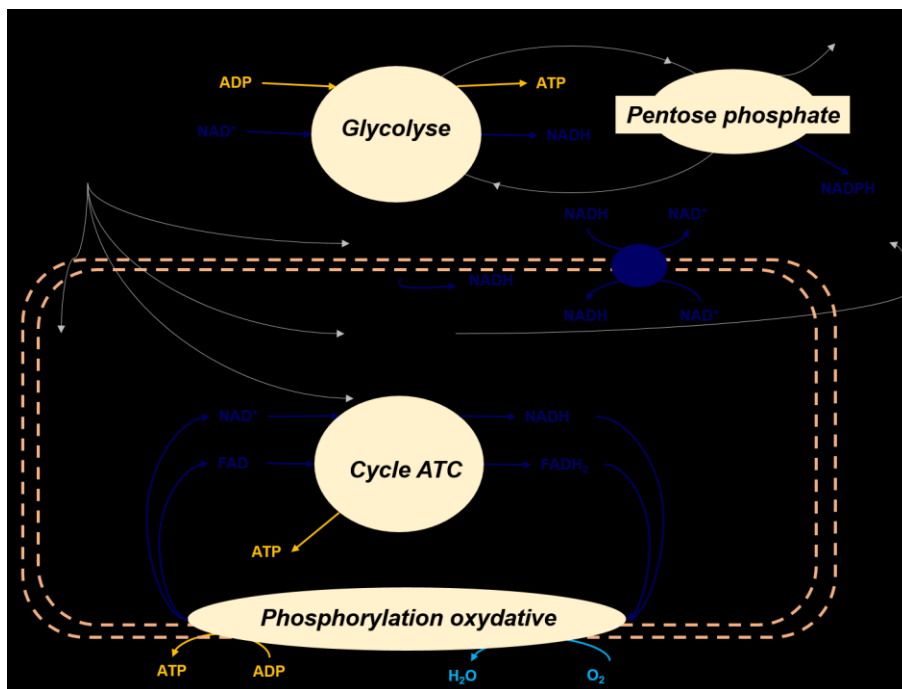


Figure 4: Aperçu du métabolisme central des cellules animales.

3.1. Le métabolisme du glucose

De nombreuses études décrivent la glycolyse comme étant très rapide dans les cellules de mammifères en culture et liée à la génération de grande quantité de lactate, même dans des conditions où l'oxygène n'est pas limitant (Godia and Cairo, 2006) (Figure 5).

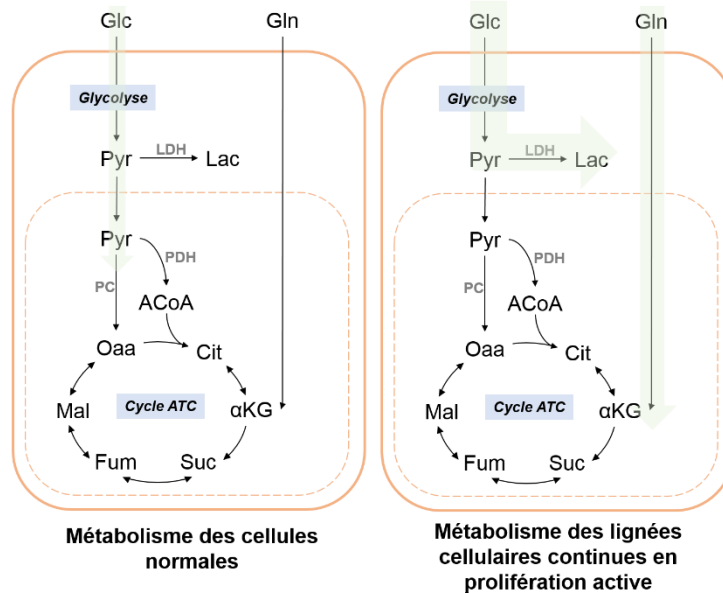


Figure 5: Comparaison du métabolisme des cellules normales et des lignées cellulaires continues en prolifération active.

Ce phénomène implique que seulement une faible proportion de pyruvate est incorporée dans le cycle des ATC alors que cette voie métabolique, plus intéressante d'un point de vue énergétique, permet de générer 36 ATP au lieu de 2 ATP à partir d'une molécule de glucose. L'analyse des vitesses de consommation du glucose et de production du lactate a montré que les cellules de mammifères consomment le glucose à une vitesse bien plus élevée par rapport à leur besoin. Ce phénomène de dérégulation n'est toujours pas bien compris, mais différentes hypothèses existent.

La production de lactate à partir de pyruvate pourrait participer à l'équilibre du potentiel oxydo-réducteur de la cellule. En effet, la production de lactate pourrait être utilisée comme moyen de régénération de NAD^+ dans le cytosol. Il a été montré que les cellules à croissance

rapide présentent une glycolyse très rapide à l'origine d'une forte consommation de NAD^+ (Sanfeliu et al., 1997). Dans le cytosol, la régénération du NAD^+ peut se faire grâce aux navettes malate/aspartate et glycérphosphate (Figure 6). Dans le cas d'un dysfonctionnement de ces voies ou d'une vitesse maximale trop faible par rapport au taux de la glycolyse, l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH), responsable de la production de lactate, pourrait être considérée comme un moyen de régénération du NAD^+ , afin de maintenir le potentiel oxydo-réducteur des cellules essentiel au fonctionnement du métabolisme cellulaire.

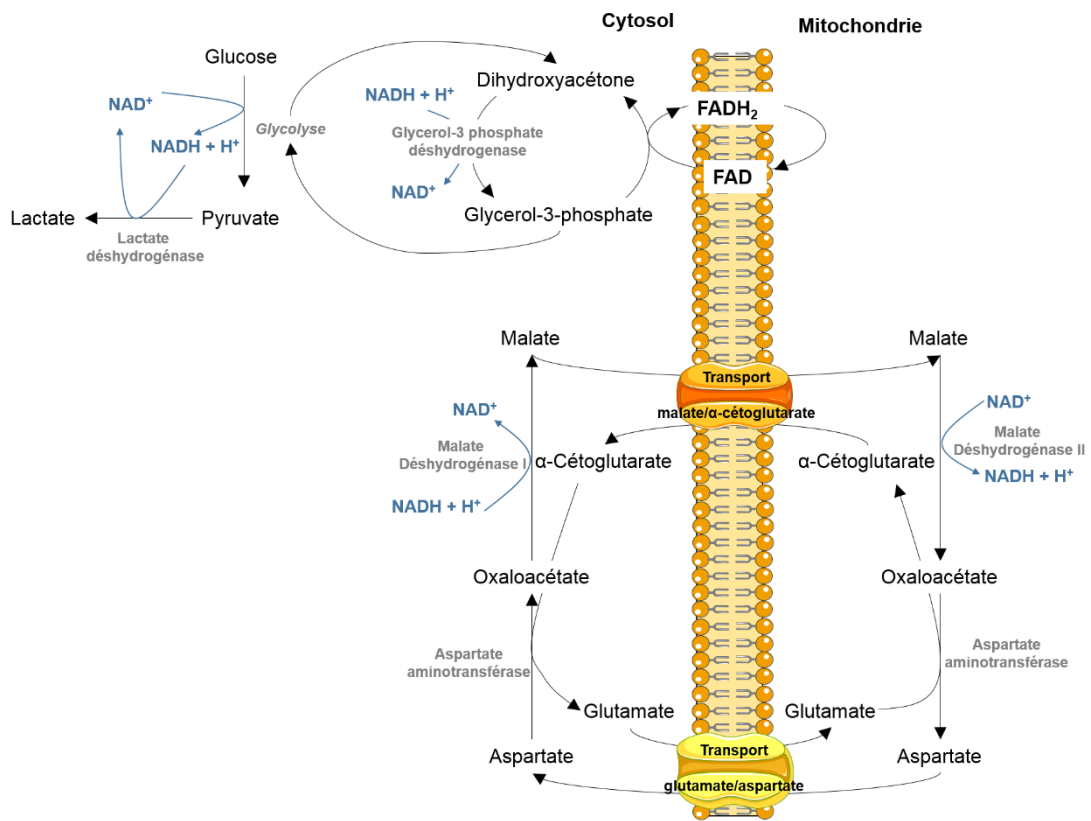


Figure 6: Les différentes voies de régénération du NAD^+ dans le cytosol: La lactate déshydrogénase, la navette glycérphosphate et la navette malate/aspartate.

Une des raisons possibles d'une forte sécrétion de lactate par les cellules en prolifération active serait une déficience dans l'activité de certaines enzymes responsables du lien entre la glycolyse et le cycle des ATC, à savoir la pyruvate déshydrogénase (PDH) et la pyruvate carboxylase (PC) (Fitzpatrick et al., 1993; Neermann and Wagner, 1996). Dans le cas d'une déficience d'activité de l'une ou l'autre de ces enzymes, la métabolisation du pyruvate en lactate serait la voie préférentielle (Figure 5).

Un parallèle peut être fait entre le métabolisme des cellules de mammifères utilisées pour la production de protéine recombinantes et le métabolisme des cellules cancéreuses. Dans les deux cas, leur métabolisme glycolytique est dérégulé. Il y a plus de 90 ans, Otto Warburg a observé que les cellules cancéreuses présentaient une glycolyse et une production de lactate bien plus élevée que les cellules normales, même en présence de concentrations d'oxygène non limitantes. Cet « effet Warburg » a été confirmé dans de nombreux cancers, mais également dans des cellules normales comme les lymphocytes en prolifération (Cairns et al., 2011; Dell'Antone, 2012). DeBerardinis et al. (2008) expliquent que l'effet Warburg pourrait être avantageux dans le cas où la vitesse de la glycolyse est suffisamment grande pour que la proportion d'ATP fourni par cette dernière dépasse celui de la phosphorylation oxydative. Dans le cas où la vitesse maximale de la glycolyse est supérieure à celle de la pyruvate déshydrogénase, un système rapide d'élimination du pyruvate accumulé serait nécessaire.

L'étude de la régulation de la glycolyse a fait l'objet de nombreux travaux que ce soit dans les lignées cellulaires continues ou dans les cellules cancéreuses (DeBerardinis et al., 2008; Mulukutla et al., 2010). Le métabolisme du glucose débute par son transport à l'intérieur des cellules. Il existe deux mécanismes de transport du glucose. Le transport actif du glucose est réalisé par les co-transporteurs sodium/glucose (SGLT), ces transporteurs sont exprimés spécifiquement au niveau des reins, de l'intestin et des muscles squelettiques. Le transport passif du glucose est assuré par les transporteurs GLUT. Il existe 12 types de transporteurs GLUT, l'isoforme GLUT-1 (Km 1-2 mM) est l'isoforme majoritaire retrouvée de façon ubiquitaire dans tous les tissus (Mueckler and Thorens, 2013). GLUT-1 est retrouvé surexprimé dans de nombreux cancers (Porporato et al., 2011). Son expression peut être induite par HIF-1 (pour *hypoxia inducible factor 1*), facteur de transcription fortement exprimé dans de nombreux cancers. Le transporteur GLUT-5, présent au niveau de l'intestin, des reins et des testicules, a la

particularité de transporter le fructose (K_m 6 mM), alors qu'aucune affinité pour le glucose n'a été montrée. A l'exception de GLUT-5, les autres transporteurs présentent des affinités variables pour le glucose et d'autres sucres, tels que le galactose, le mannose, le maltose et la glucosamine (Zhao and Keating, 2007). Une fois dans le cytosol de la cellule, le glucose peut entrer dans la voie de la glycolyse. Celle-ci est régulée par trois enzymes principales à l'origine de réactions irréversibles : l'héxokinase (HK), la phosphofructokinase 1 (PFK1) et la pyruvate kinase (PK) (Figure 7). Ces enzymes sont souvent retrouvées différemment exprimées ou régulées dans de nombreux cancers. Par exemple l'héxokinase II qui présente la particularité d'être formée de deux sites catalytiques, est retrouvée majoritairement exprimée dans les cancers du foie et du pancréas. Cette isoforme spécifique serait impliquée dans la promotion et le maintien de l'état cancéreux des cellules (Mathupala et al., 2006). L'activité de la phosphofructokinase 1 augmente dans les cellules cancéreuses et les tumeurs primaires. (Yalcin et al., 2009). L'isoforme M2 de la pyruvate kinase est majoritairement exprimée dans les cancers du colon, des reins et des poumons. Le *knockout* de pyruvate kinase M2 semble diminuer la vitesse de la glycolyse, la production de lactate et la prolifération des cellules (Wong et al., 2013).

Dans les cellules CHO en prolifération active, Mulukutla et al. (2012) ont montré que la phosphofructokinase 1 était sur-réglée alors que la pyruvate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase (IDH3A) et la succinate déshydrogénase (SDH) étaient sous-réglées. Dans les cellules cancéreuses en prolifération rapide, il a été montré que le cycle des ATC était tronqué dû à une fuite de citrate. Ce dernier, une fois dans le cytosol, est converti par l'ATP citrate lyase (ACL) en oxaloacétate et acétyl-CoA, précurseurs de la synthèse lipidique (Figure 7). Une inhibition de l'ATP citrate lyase a permis de diminuer la synthèse des lipides ainsi que de réduire la prolifération des cellules (Baenke et al., 2013). Ainsi, dans les cellules de mammifères en prolifération rapide, l'activité mitochondriale serait surtout destinée à la formation d'intermédiaires de la biosynthèse plutôt qu'à la production d'énergie.

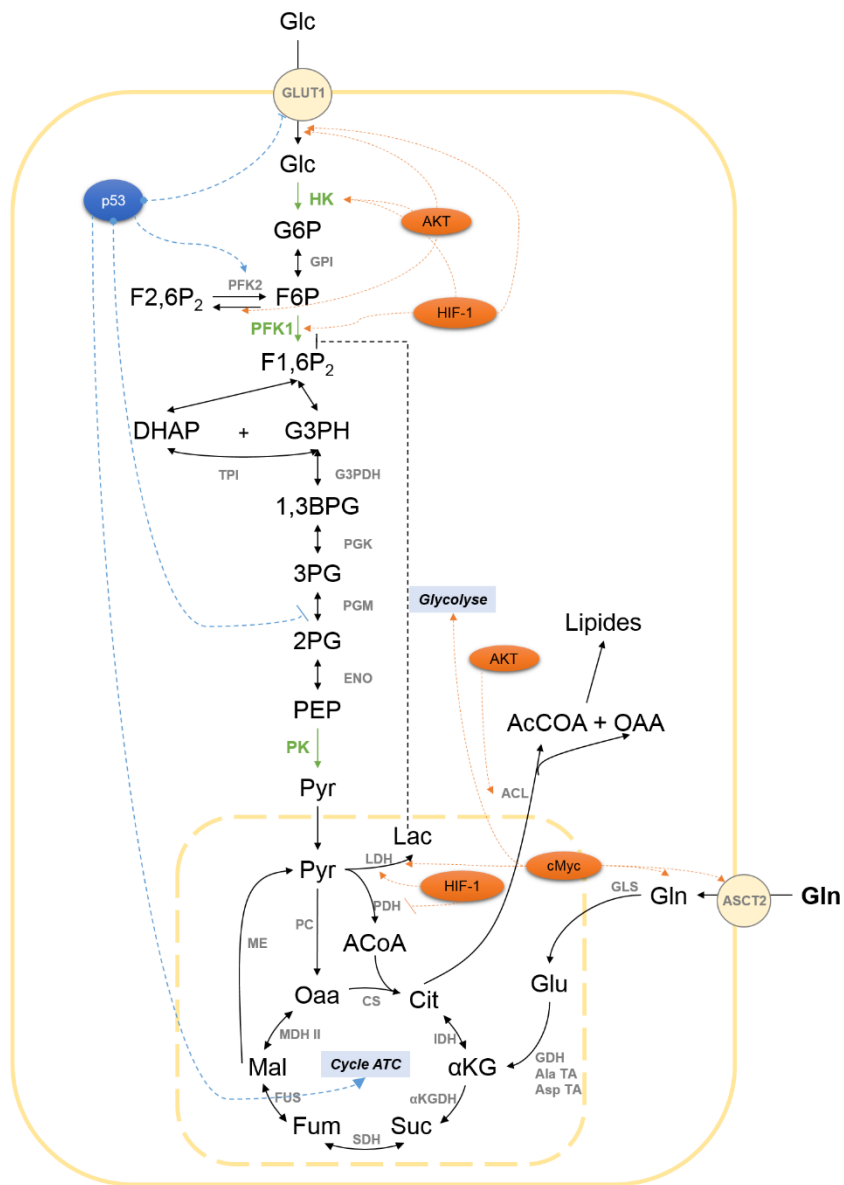


Figure 7: Les voies principales du métabolisme central et les protéines régulatrices clés qui contrôlent l'activation et l'expression des enzymes métaboliques.

Toutes ces données tendent à démontrer un lien possible entre une activité glycolytique importante et la tumorigénécité et même plus généralement avec l'immortalisation des lignées cellulaires. Que ce soit dans les cellules tumorales ou dans les lignées cellulaires continues, la

majorité du pyruvate issu de la glycolyse est converti en lactate, ne laissant qu'une faible portion de pyruvate entrant dans le cycle des ATC.

3.2. Le métabolisme de la glutamine

Chez l'homme, la glutamine est l'acide aminé le plus abondant représentant environ 20 % de la réserve totale d'acides aminés dans le sang et 40 % dans les muscles. Dans les cellules à division rapide telles que les lymphocytes, les entérocytes ou les cellules cancéreuses, la glutamine est rapidement consommée et est utilisée comme source de carbone et d'azote (Bhutia et al., 2015; Pochini et al., 2014). La glutamine est principalement impliquée dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques, des nucléotides sucres et de l'asparagine.

Le transport de la glutamine à l'intérieur de la cellule ne dépend pas de transporteurs qui lui soient spécifiques. Ainsi, la glutamine peut emprunter les différents systèmes de transport des acides aminés tels que les co-transporteurs Na^+ dépendants ou les transporteurs passifs (Bhutia et al., 2015).

Une fois dans la mitochondrie, la glutaminase convertit la glutamine en glutamate générant un ion ammonium. Le glutamate ainsi produit peut emprunter deux voies métaboliques. Le glutamate peut être transaminé par l'aspartate transaminase (aspTA) ou par l'alanine transaminase (alaTA). Le glutamate peut subir une désamination par la glutamate déshydrogénase (GDH) avec relargage d'un ion ammonium (Figure 8). Les réactions de transamination peuvent avoir lieu dans le cytosol ou dans la mitochondrie. Elles sont souvent considérées comme un moyen de contrebalancer la production d'ions ammonium, car il s'agit de transférer un ion ammonium du glutamate sur d'autres espèces (oxaloacétate et pyruvate) former l' α -cétoglutarate (α -KG). Alors que la production de l' α -cétoglutarate par la glutamate déshydrogénase génèrent des ions ammonium (Godia and Cairo, 2006). L' α -cétoglutarate issu de la glutamine peut être incorporé au cycle des ATC et suivre différents chemins possibles. La glutamine peut subir une oxydation complète permettant ainsi de générer 27 ATP.

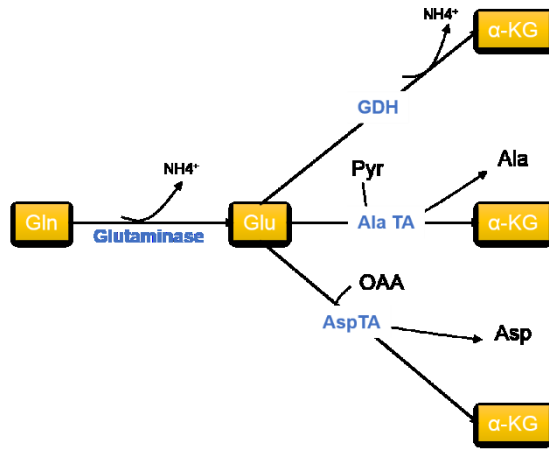


Figure 8: Principales voies pour l'utilisation de la glutamine.

Dans les lymphocytes B humains, l'activité du cycle de Krebs serait entièrement dépendante de la glutamine impliquant l'activité concomitante de l'ATP citrate lyase, de l'enzyme malique (ME), de la pyruvate déshydrogénase et/ou de la pyruvate carboxylase (Le et al., 2012a) (Figure 9).

Dans certains cancers, le Na^+ co-transporteur ASCT2 est retrouvé surexprimé expliquant en partie la dépendance des cellules cancéreuses à la glutamine. De plus, ce transporteur est surexprimé par l'oncogène c-Myc (Bhutia et al., 2015) (Figure 7). Une étude de flux métaboliques a montré que, dans les cellules CHO, la glutamine contribue de façon non négligeable (16-25 %) à la formation du lactate en empruntant une voie tronquée du cycle de Krebs (Dean and Reddy, 2013) (Figure 9). Dans les cellules d'hybridomes produisant un anticorps, il a été montré que la glutamine participe dans des proportions plus grandes que le glucose à la synthèse lipidique en utilisant une partie de la voie des ATC avec l'enzyme malique (Mancuso et al., 1994; Sharfstein et al., 1994) (Figure 9). Metallo et al. (2011) ont montré que des cellules de mammifères en condition d'hypoxie présentent une fuite de citrate dépassant le flux d'entrée de pyruvate dans la mitochondrie dû à la contribution de la glutamine au cycle de Krebs et à l'activité de l'isocitrate déshydrogénase qui conduit à la formation de citrate (Figure 9).

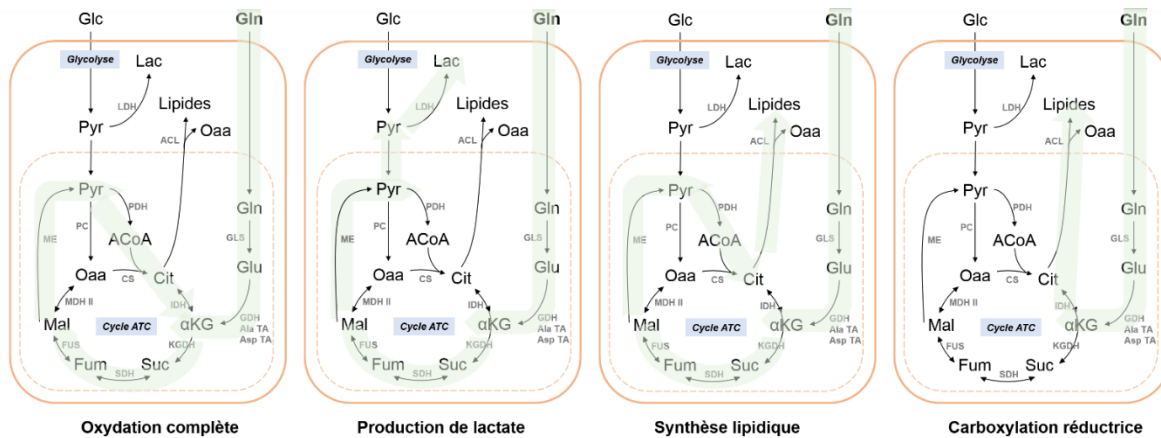


Figure 9: Voies alternatives de la métabolisation de la glutamine (Young, 2013).

Le métabolisme de la glutamine semble pouvoir s'adapter en empruntant des voies métaboliques différentes en fonction du type cellulaire et des conditions de culture (Figure 9). Ces données montrent également que le métabolisme de la glutamine et du glucose sont interconnectés.

3.3. Le métabolisme du lactate

Les sections précédentes ont montré que, dans les lignées cellulaires continues ou dans les cellules cancéreuses, le pyruvate constitue un nœud central du métabolisme. Il peut être issu de la glycolyse ou de l'oxydation du malate et il peut alimenter le cycle des ATC ou la lactate déshydrogénase pour être converti en lactate. Il a été montré que la conversion du pyruvate en lactate libère une molécule de NAD^+ , or cette dernière est fortement consommée lorsque les cellules présentent une glycolyse élevée associée à une forte prolifération. De plus, Thangaraju et al. (2006) ont montré que dans les cellules de cancer du sein (MCF7) exprimant SLC5A8 (transporteur de pyruvate et lactate), l'accumulation de pyruvate entraîne l'apoptose des cellules. Ainsi, la conversion de pyruvate en lactate pourrait être un moyen de maintenir les niveaux de pyruvate suffisamment bas afin d'éviter la mort cellulaire.

La conversion du pyruvate en lactate est une réaction réversible. La lactate déshydrogénase est une enzyme tétramérique issue de l'association de deux sous-unités différentes (Figure 10). La sous-unité H est codée par le gène ubiquitaire LDH-B et la sous-

unité M est codée par le gène de la LDH-A. Le gène LDH-A contient une séquence HRE pour *hypoxia response element* qui est la cible du facteur de transcription HIF-1. La lactate déshydrogénase-5, constituée de 4 sous-unités M, catalyse préférentiellement la conversion du pyruvate en lactate alors que la LDH1, composée de 4 sous-unités H, catalyse préférentiellement la conversion du lactate en pyruvate (Porporato et al., 2011). Aussi, la lactate déshydrogénase 5 joue un rôle crucial dans le maintien d'une glycolyse rapide et probablement dans la résistance à l'apoptose. L'expression élevée de lactate déshydrogénase 5 représente un pronostic défavorable dans de nombreux cancers (Koukourakis et al., 2011; Koukourakis et al., 2009). Dans les lignées cellulaires continues utilisées pour la production d'anticorps, la forte production de lactate pendant la phase de prolifération active pourrait être attribuée à l'expression du gène LDH-A.

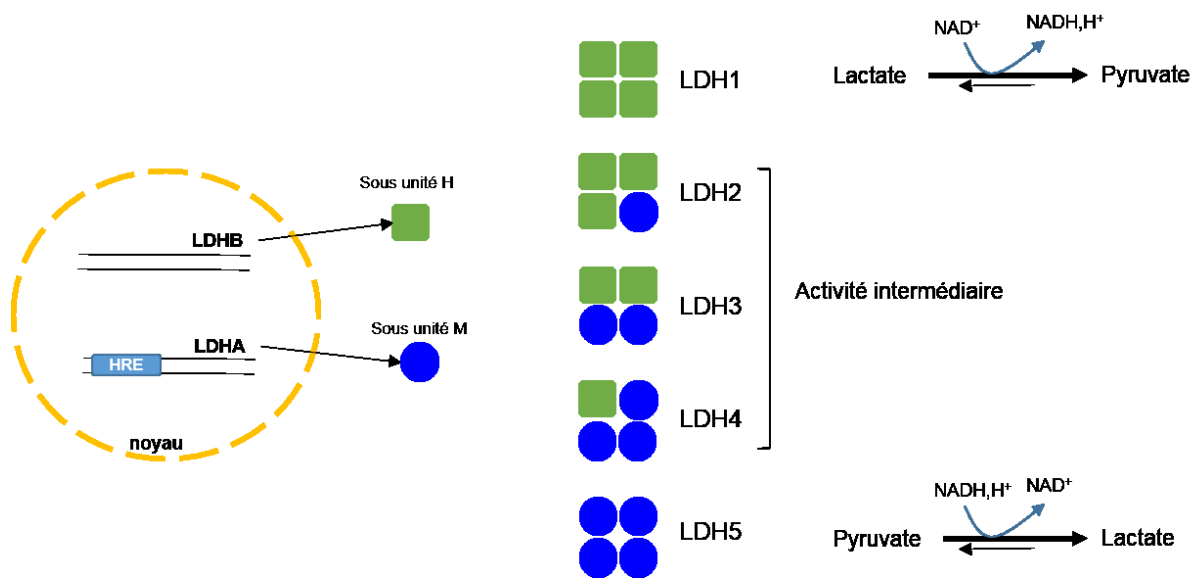


Figure 10: La lactate déshydrogénase (Porporato et al., 2011).

L'accumulation de lactate dans les cultures cellulaires entraîne une acidification du milieu qui peut être néfaste pour la croissance. Lorsque la culture est réalisée dans un environnement contrôlé où le pH est régulé par l'ajout de base, l'accumulation de lactate entraîne une augmentation de l'osmolalité, qui peut elle aussi être délétère pour la croissance cellulaire.

Certains types cellulaires comme les neurones, les cellules du foie, du cœur et les cellules striées musculaires peuvent présenter une consommation de lactate. Le lactate peut subir une oxydation complète (cœur, muscles, et neurones) ou être utilisé pour la néoglucogenèse (foie et rein) (Halestrap, 2012). Dans ce cas, les transporteurs de monocarboxylates dépendant de H^+ (MCT) jouent un rôle important (Figure 11). En fonction des tissus et des espèces, le MCT1 ou 2 est utilisé pour l'entrée du lactate dans la cellule. Dans les tissus qui dépendent de la glycolyse pour leur génération d'énergie (muscle squelettique), l'excrétion de lactate se fait par MCT4, dans des conditions de normoxie. Dans des conditions d'hypoxie, la sécrétion de lactate se fait par MCT1 dans la plupart des cas. Dans les cellules cancéreuses, la surexpression de MCT1 et MCT4 serait corrélée avec l'invasion des cancers du poumon (Porporato et al., 2011).

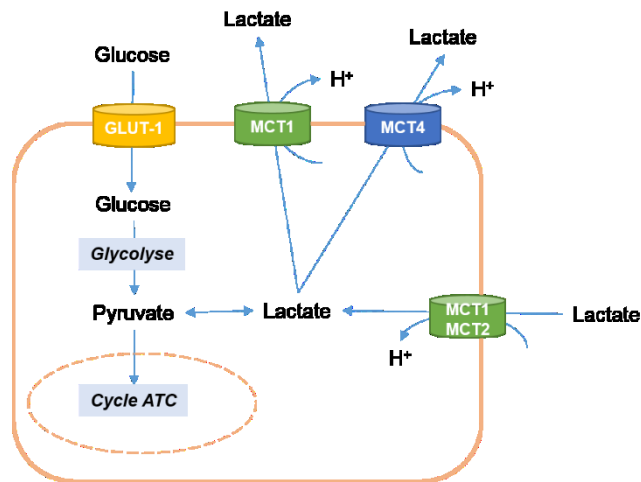


Figure 11 : Le rôle des transporteurs MCT dans le métabolisme central .

Il est intéressant de noter que, dans les cellules CHO, la surexpression de gènes anti-apoptotiques (XIAP, Aven et un homologue de Bcl-2) a entraîné, parallèlement à l'augmentation de la survie cellulaire, une re-consommation du lactate produit par les cellules lorsque que le glucose devient limitant. De plus, lors de la phase de consommation du lactate, l'ajout quotidien de celui-ci dans le milieu a permis d'augmenter la biomasse totale et la production d'anticorps de 40% (Dorai et al., 2009). Ces données suggèrent une interconnexion entre les mécanismes de survie cellulaire et le métabolisme central des cellules. Certaines études

ont observé une consommation de lactate au moment où le glucose ou la glutamine devenaient limitants dans le milieu. De ces données, il a été déduit que le lactate pouvait servir de nutriment pour pallier aux limitations en source carbonée (Martínez et al., 2013; Zagari et al., 2013a). Cependant, de nombreuses études ont révélé la co-consommation de lactate, glucose et glutamine dans les cellules CHO (Luo et al., 2012; Mulukutla et al., 2012; Pascoe et al., 2007).

Dans la plupart des cas, le lactate est consommé par les cellules lorsque la croissance cellulaire ralentit et atteint la phase stationnaire. Ce changement marqué du métabolisme du lactate passant de la production à la consommation a été observé dans 243 cultures de production menées à Genentech et semble corrélé à l'obtention de bons rendements de production (Le et al., 2012b). Ce phénomène de changement métabolique est encore mal compris, mais de nombreuses recherches ont été menées afin d'élucider les mécanismes mis en jeu et identifier les facteurs contribuant à la réorientation du métabolisme du lactate.

Aux niveaux transcriptomique et protéomique, le changement métabolique vers la consommation de lactate est associé à une diminution des niveaux d'expression des transcrits et des protéines de la glycolyse (phosphofructokinase 1, triose-phosphate isomérase (TPI), glucose-6-phosphate isomérase (GPI), phosphoglycérate mutase (PGM), émolase (ENO) et pyruvate kinase) dans les hybridomes (Korke et al., 2004). De façon similaire, les niveaux de transcrits des transporteurs de glucose et de glutamine (GLUT-1, ASCT2), des enzymes impliquées dans la glycolyse (phosphofructokinase, phosphoglycérate mutase) et le cycle de Krebs sont également diminués dans les cellules CHO. Cette étude montre une augmentation des niveaux des transcrits des enzymes impliquées dans la chaîne de respiration (Mulukutla et al., 2012). L'analyse des flux métaboliques montre une réduction globale de la glycolyse accompagnée d'une légère augmentation des flux à travers le cycle des ATC et une augmentation de la consommation d'oxygène par les cellules (Mulukutla et al., 2012). En lien avec ces données, une étude comparative entre un clone produisant du lactate tout au long de la culture et un autre clone capable de re-consommer le lactate montre que ce dernier présente un potentiel de membrane mitochondriale et une consommation d'oxygène plus importants (Zagari et al., 2013a). De manière générale, les études menées sur la caractérisation des flux métaboliques pendant les phases de production et de consommation du lactate s'accordent sur le fait que la phase de production est associée à une glycolyse élevée et une prolifération

cellulaire intense, alors que la phase de consommation de lactate est associée à un ralentissement de la croissance cellulaire accompagné d'un changement métabolique vers un phénotype plus oxydatif (Ahn and Antoniewicz, 2011; Dean and Reddy, 2013; Goudar et al., 2010; Martínez et al., 2013). Martínez et al. (2013) estiment qu'il y a 5,9 fois plus d'ATP produit à partir du lactate pendant la phase stationnaire comparé à l'ATP produit à partir du glucose pendant la phase exponentielle. Cependant, il semblerait que la consommation de lactate pourrait se déclencher seulement quand la concentration de celui-ci atteint un certain seuil, permettant une forte inhibition de la phosphofructokinase 1, entraînant ainsi le ralentissement de la glycolyse et de la croissance cellulaire (Mulukutla et al., 2014; Mulukutla et al., 2015). De plus, le ratio NAD^+/NADH pourrait également jouer un rôle, lorsque celui devient trop élevé la conversion du lactate en pyruvate pourrait alors être favorisée.

3.4. Le métabolisme des acides aminés

Les acides aminés participent à la fois à la biosynthèse et au métabolisme énergétique des cellules. Ils interviennent dans l'alimentation du cycle de Krebs en participant à la formation d'acétylCoA, de pyruvate, d' α -cétoglutarate, d'oxaloacétate, de succinylCoA et de fumarate (Figure 12). Afin de limiter toute déplétion, il est donc nécessaire de fournir aux cellules en culture des niveaux adéquats d'acides aminés pour maintenir le métabolisme énergétique, la viabilité et la croissance cellulaire (Fan et al., 2015; Lu et al., 2013). Une étude a montré que l'ajout de sérine, cystéine et tyrosine, qui se retrouvaient entièrement consommées au cours de la culture, a permis de modifier le métabolisme cellulaire et d'augmenter la production d'anticorps sans altérer la croissance cellulaire. Les cellules alimentées par ces trois acides aminés ont montré une diminution de la consommation du glucose et de la production de lactate. De plus, en fin de culture, une re-consommation de lactate a également été observée (Kishishita et al., 2015).

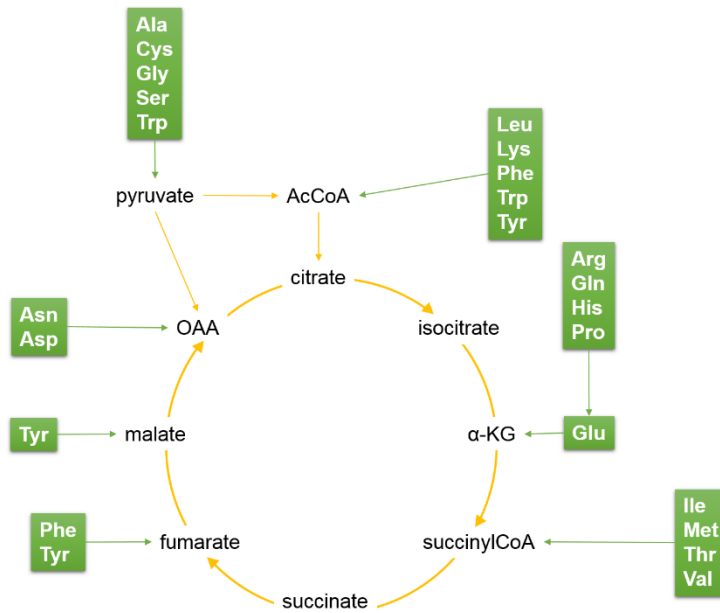


Figure 12: Implication des acides aminés dans le métabolisme central.

Lors de la mise en place de stratégies d'alimentation, le taux de consommation de glucose et/ou de glutamine sont généralement pris comme référence pour ajuster la quantité de solution de nutriments à ajouter à la culture. Dans ce cas, il est préférable que le glucose soit équilibré de façon stœchiométrique avec les acides aminés essentiels aux cellules (Kuwae et al., 2005; Xie and Wang, 1993). Le défi majeur est que les compositions exactes des milieux et des solutions d'alimentation commerciales sont, la plupart du temps, inconnues (secrets industriels).

3.5. Lien entre métabolisme et production d'anticorps

De nombreux travaux s'intéressent au lien qui pourrait exister entre le métabolisme et la production d'anticorps dans les lignées cellulaires continues. Comprendre ce lien permettrait un développement plus rationnel des procédés et des formulations des milieux de culture.

Schaub et al. (2010) ont montré qu'un certain nombre de gènes étaient exprimés différemment dans les cellules CHO lorsque celles-ci étaient cultivées selon un procédé permettant d'obtenir un fort ou un faible titre en anticorps. Les gènes impliqués dans le

métabolisme cellulaire et plus spécifiquement dans le métabolisme des lipides ont été retrouvés surexprimés dans les cellules fortement productrices. Une étude de flux métaboliques menée dans une lignée CHO a montré que le pic de production d'anticorps était associé à la phase stationnaire de croissance et à l'augmentation de l'activité du cycle de Krebs. Ce phénomène pourrait être une réponse à l'augmentation des besoins énergétiques des cellules liée à la synthèse, le repliement et la sécrétion de protéines (Templeton et al., 2013). En lien avec cette étude, Dean and Reddy (2013) ont montré que les cellules CHO fortement productrices d'anticorps présentaient une activité du cycle des ATC plus intense que les cellules faiblement productrices. Il semblerait que dans les cellules fortement productrices, le glucose contribue dans une plus large proportion à l'alimentation du cycle de Krebs. Dans les cellules NS0, l'augmentation de la production d'anticorps est concomitante avec l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'augmentation du potentiel membranaire mitochondrial suggérant ainsi une plus grande activité de la phosphorylation oxydative (Khoo and Al-Rubeai, 2009). L'équipe de Le et al. (2012b) a montré que la croissance cellulaire et le métabolisme du lactate semblent être les deux facteurs influençant le plus la production d'anticorps. Selon eux, la consommation de lactate par les cellules pourrait être utilisée comme un indicateur pour la sélection de forts producteurs d'anticorps.

4. Stratégies pour minimiser la production de lactate et d'ammoniaque

L'augmentation des rendements de production des procédés de culture réside en partie dans l'amélioration de l'efficacité des voies du métabolisme central permettant ainsi d'optimiser la croissance cellulaire et les rendements de production de protéines recombinantes. L'efficacité des voies métaboliques peut être modulée par la modification des conditions ou du milieu de culture ou par la modification génétique des cellules.

4.1. Stratégies pour minimiser la production de lactate

Dans la littérature, deux stratégies sont couramment utilisées pour limiter la vitesse de la glycolyse et ainsi réduire la production de lactate néfaste pour la croissance cellulaire. La première consiste à réduire les apports en glucose dans le milieu de culture et la seconde consiste à limiter l'entrée du glucose dans la cellule au moyen du génie génétique ou par la substitution du glucose par d'autres sucres métabolisables par les cellules.

De nombreuses études ont été fondées sur le fait que le taux de consommation du glucose par les cellules dépend de la concentration extracellulaire de celui-ci. Ainsi des études opérées en *chemostats* ont montré que la diminution du taux de consommation de glucose, (en raison d'une diminution d'apport en glucose extracellulaire) est accompagnée d'une diminution de production de lactate dans différents types cellulaires. De plus, dans les conditions où le glucose est maintenu à un faible niveau, un ratio molaire de lactate/glucose plus faible est observé, témoignant ainsi d'une amélioration de l'efficacité du métabolisme cellulaire (Hayter et al., 1992; Maranga and Goochee, 2006; Xie et al., 1997). Des analyses de la distribution des flux métaboliques ont montré que la diminution de la concentration du glucose du milieu permet d'augmenter la proportion de pyruvate entrant dans le cycle de Krebs, laissant une plus petite portion de pyruvate pour la formation de lactate (Altamirano et al., 2001; Cruz et al., 1999).

Une autre approche consiste à utiliser des sucres alternatifs au glucose, tels que le fructose, le galactose ou le mannose (Altamirano et al., 2006; Altamirano et al., 2000; Altamirano et al., 2004). Cette stratégie est fondée sur deux hypothèses. L'une est basée sur la probable compétition ou différence d'affinité des transporteurs entre le glucose et les autres

sucres, réduisant ainsi la vitesse d'entrée des carbohydrates dans la cellule. L'autre hypothèse serait une différence d'affinité des hexokinases pour les différents sucres. Altamirano et al. (2000) ont montré que l'utilisation du glucose avec du galactose ou du fructose entraînait une forte diminution des taux de consommation des sucres et de production du lactate dans les cellules. Ces sucres ont permis d'augmenter l'efficacité du métabolisme cellulaire, car les rendements globaux de production de lactate par rapport au glucide consommé ont été réduits de 30 % avec le galactose et de 15 % avec le fructose. L'inconvénient majeur de cette approche est toutefois la réduction du taux de croissance cellulaire. Une étude similaire combinant la surexpression du transporteur GLUT-5 (dont l'affinité est plus élevée pour le fructose que GLUT-1) et l'ajout de fructose dans le milieu de culture a permis de maintenir la croissance tout en augmentant l'efficacité du métabolisme des cellules CHO (Wlaschin and Hu, 2007).

Certains travaux se sont basés sur le fait qu'augmenter l'entrée de pyruvate dans le cycle de Krebs permettrait d'augmenter l'activité de ce dernier tout en diminuant la disponibilité du pyruvate cytosolique pour la lactate déshydrogénase, réduisant ainsi la production de lactate. Ces travaux se sont principalement intéressés à la pyruvate carboxylase mitochondriale dont le flux est typiquement très faible dans les lignées cellulaires continues. Kim and Lee (2007b) ont mis en évidence une légère diminution de production de lactate dans les cellules CHO transformées avec le gène humain de la pyruvate carboxylase (Figure 13). Plusieurs groupes ont utilisé le gène de la pyruvate carboxylase retrouvé chez la levure, appelée PYC2. Cette enzyme présente l'avantage d'être cytosolique et donc de pouvoir entrer en compétition directe avec la lactate déshydrogénase pour la conversion du pyruvate en oxaloacétate. Le deuxième avantage de cette enzyme réside dans le fait que l'oxaloacétate cytosolique produit, peut potentiellement être converti par la malate déshydrogénase I endogène en malate qui peut ensuite rejoindre le cycle de Krebs (Figure 13). Ainsi, l'expression de PYC2 dans les cellules BHK-21 et HEK293 a engendré des diminutions marquées de la production de lactate dans ces cellules. Certains groupes ont constaté l'amélioration de la croissance cellulaire, d'autres l'augmentation de la production de la protéine recombinante (Elias et al., 2003; Henry and Durocher, 2011; Irani et al., 2002; Vallée et al., 2013). Dans les cellules CHO, l'expression de PYC2 semble améliorer l'efficacité du métabolisme des cellules, car les ratios molaires de lactate/glucose semblent diminuer de 10 à 25%.

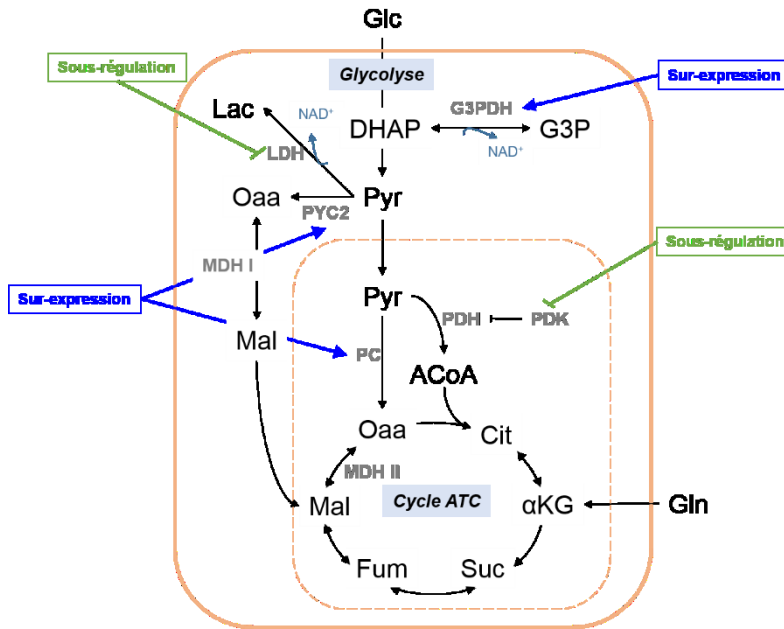


Figure 13: Différentes stratégies de génie métabolique pour améliorer l’efficacité du métabolisme des lignées cellulaires continues.

Les effets sur la croissance et la production de la protéine d’intérêt divergent cependant d’une étude à l’autre. Fogolín et al. (2004) ont observé une augmentation de la longévité de la culture et de la production de hGM-CSF alors que la concentration maximale de cellules s’est vue réduite de moitié. Wilkens and Gerdtzen (2015) ont rapporté une amélioration de la croissance cellulaire, mais une diminution de la production d’anticorps.

Certains groupes de recherche se sont employés à inhiber directement l’enzyme responsable de la production de lactate (Figure 13). Dans les cellules CHO, il semblerait que la répression seule de la lactate déshydrogénase ne soit pas suffisante pour améliorer la croissance et la production des cellules (Kim and Lee, 2007a). En effet, l’inhibition de l’expression de la lactate déshydrogénase par ARN interférant n’a pas eu d’effet sur la croissance ni sur le rendement global de lactate produit par rapport au glucose consommé. L’impact sur la production n’est pas clairement établi et semble sujet à variation en fonctions des clones. La diminution de la production spécifique de lactate est également très variable en fonction des

clones (Kim and Lee, 2007a). Jeong et al. (2006) ont également observé que l'inhibition de la lactate déshydrogénase n'a eu que peu d'effet sur les performances des cellules à moins que l'inhibition de la lactate déshydrogénase ne soit couplée à la surexpression de la glycerol-3-phosphate déshydrogénase (enzyme impliquée notamment dans la régénération du NAD^+ cytosolique (Voir figure 6). De cette façon, la croissance cellulaire a été améliorée, mais pas la production de t-PA. La sous-expression de la lactate déshydrogénase et des pyruvate déshydrogénase kinases (enzymes inhibitrices de la pyruvate déshydrogénase) a permis non seulement de diminuer les niveaux de production de lactate, mais également de diminuer le ratio molaire de production de lactate par rapport à la consommation de glucose. Ces données montrent que l'efficacité du métabolisme de ces cellules a été améliorée. Dans ces conditions, la production globale d'anticorps s'est vue augmentée (Zhou et al., 2011). De façon générale, ces études sont souvent entachées par des variations clonales importantes. Il est intéressant de noter que l'inhibition totale du gène de la lactate déshydrogénase A ne permet pas aux cellules de survivre (Yip et al., 2014). Cette donnée aurait tendance à confirmer le rôle important de la lactate déshydrogénase dans le maintien du potentiel oxydo-réducteur de la cellule lorsque la glycolyse est très rapide. De plus, dans les cellules CHO, la surexpression de aralar1, élément primordial des navettes malate/aspartate, semble favoriser la consommation de lactate, sans modifier la vitesse de la glycolyse (Zagari et al., 2013b).

Au niveau de l'optimisation des milieux de culture, le cuivre pourrait être un oligo-élément capital pour le métabolisme cellulaire. Quelques études ont en effet montré qu'augmenter les concentrations de cuivre du milieu de culture de 5 à 100 fois permet d'augmenter la longévité de la culture et la densité cellulaire maximale (Luo et al., 2012; Xu et al., 2016; Yuk et al., 2014). L'ajout de cuivre provoque également la re-consommation du lactate. Finalement, tous ces facteurs semblent avoir contribué à l'augmentation importante du titre final en anticorps (Luo et al., 2012; Yuk et al., 2014).

Il est intéressant de noter que, dans les cellules HEK293, l'ajout d'acide lactique ou de sodium lactate exogène, suivi d'une diminution du point de contrôle du pH autour de 6,6-6,8 peut provoquer une re-consommation de lactate pendant la phase exponentielle de croissance, alors que ce changement métabolique s'opère la plupart du temps en phase stationnaire, quand la croissance cellulaire ralentit (Liste-Calleja et al., 2015). Ces données confirment l'hypothèse

qu'une concentration suffisante de lactate doit être produite pour exercer une forte inhibition sur la phosphofructokinase 1 et déclencher ce changement métabolique. Le pH intracellulaire doit également jouer un rôle, étant donné que les transporteurs identifiés comme participant à l'entrée de lactate dans les cellules dépendent du co-transport de H⁺.

La composition du milieu de culture joue également un rôle important, puisque des cellules productrices de lactate peuvent par un simple changement de milieu, re-consommer le lactate produit (Ma et al., 2009; Zagari et al., 2013a; Zagari et al., 2013b).

4.2. Stratégies pour minimiser la production d'ammoniaque

De la même façon que pour le métabolisme du glucose, de nombreux travaux se sont intéressés à la compréhension du métabolisme de la glutamine afin d'améliorer son efficacité et minimiser la production d'ions ammonium néfastes pour la croissance cellulaire et pour la glycosylation des protéines recombinantes. Les approches entreprises dans la littérature sont similaires à celles utilisées pour le contrôle du métabolisme du glucose. Ainsi, le maintien de niveaux faibles de glutamine (< 1 mM) en *chemostats* ou en cultures *fed-batch* a permis de réduire le taux de consommation de glutamine ainsi que la production d'ions ammonium (Maranga and Goochee, 2006; Nadeau et al., 2000). Ces stratégies nécessitent cependant un contrôle constant de la culture et des ajustements très réguliers du niveau de glutamine.

Une autre approche consiste à substituer la glutamine par d'autres acides aminés comme le glutamate, premier produit de la glutaminolyse, ou l'asparagine qui peut être convertie en oxaloacétate. Les cellules BHK-21 cultivées dans un milieu pauvre en glutamine et enrichi en glutamate présentent un ratio ions ammonium/glutamine 5 fois plus faible que les cellules cultivées avec de la glutamine seule. Cependant, la diminution de la concentration finale d'ammoniaque n'a pas permis d'augmenter la croissance cellulaire (Christie and Butler, 1999). De manière similaire, la substitution de la glutamine par le glutamate dans les cultures de CHO a permis de réduire de 40 % le rendement globale de production d'ions ammonium par rapport à la glutamine ou au glutamate consommé, et ceci sans modifier le métabolisme du glucose (les ratios de lactate produit/glucose consommé restant inchangés). Malgré l'amélioration de l'efficacité de la glutaminolyse, le taux de croissance cellulaire a été réduit de 17 % (Altamirano et al., 2000). La substitution de la glutamine (2 mM) avec le pyruvate (10 mM) a permis de

réduire le taux de production d'ions ammonium, mais les ratios métaboliques ammonium/glutamine et lactate/glucose sont restés inchangés dans les cellules CHO (Genzel et al., 2005).

Au niveau génétique, l'expression de la glutamine synthétase (GS) dans les cellules CHO a été un grand succès, permettant la croissance des cellules dans un milieu sans glutamine (Wilson and Bebbington, 1992). Le *GS system*TM est une technologie propriétaire de Lonza qui est aujourd'hui utilisée par plus de 85 compagnies biopharmaceutiques. Au départ, ce système a été développé pour la sélection de clones (section 2.1.2), mais il est également exploité pour améliorer l'efficacité du métabolisme de la glutaminolyse et réduire la production d'ions ammonium (Paredes et al., 1999; Zhang et al., 2006).

Depuis ces 20 dernières années, diminuer l'accumulation de métabolites toxiques a été un des buts principaux des chercheurs œuvrant dans le domaine de la culture des cellules animales. Mais, réorienter le métabolisme cellulaire au moyen de différentes stratégies d'alimentation ou par l'utilisation de génie génétique implique une connaissance approfondie du métabolisme cellulaire. L'utilisation de traceurs isotopiques pour quantifier et analyser la distribution des principaux flux métaboliques a permis de réaliser de grands progrès dans le domaine de la cartographie des voies intracellulaires et représente aujourd'hui un outil incontournable de caractérisation du métabolisme des cellules en culture. Dans le cadre de stratégies de génie génétique, cette technique permet non seulement d'identifier des cibles potentielles, mais également de valider si la sur/sous-expression d'une enzyme se traduit bien par un changement de flux métabolique intracellulaire.

4.3. L'analyse des flux métaboliques par marquage isotopique : un outil pour le contrôle et la caractérisation du métabolisme des cellules

L'analyse des flux métaboliques par marquage isotopique (AFM-¹³C) permet la quantification des principaux flux intracellulaires du métabolisme central des cellules. Cette technique est fondée sur l'utilisation de substrats contenant des atomes de carbone marqués. En fonction de l'activité des voies métaboliques, le marquage est ensuite incorporé dans différents métabolites (Figure 14). Lorsque l'enrichissement isotopique de l'ensemble des métabolites intracellulaires est stable, la distribution des isotopomères peut être mesurée par spectrométrie de masse ou par résonance magnétique nucléaire (Wiechert, 2001). La combinaison des données apportées par le marquage isotopique et par le calcul des taux extracellulaires permet d'estimer les principaux flux métaboliques des cellules.

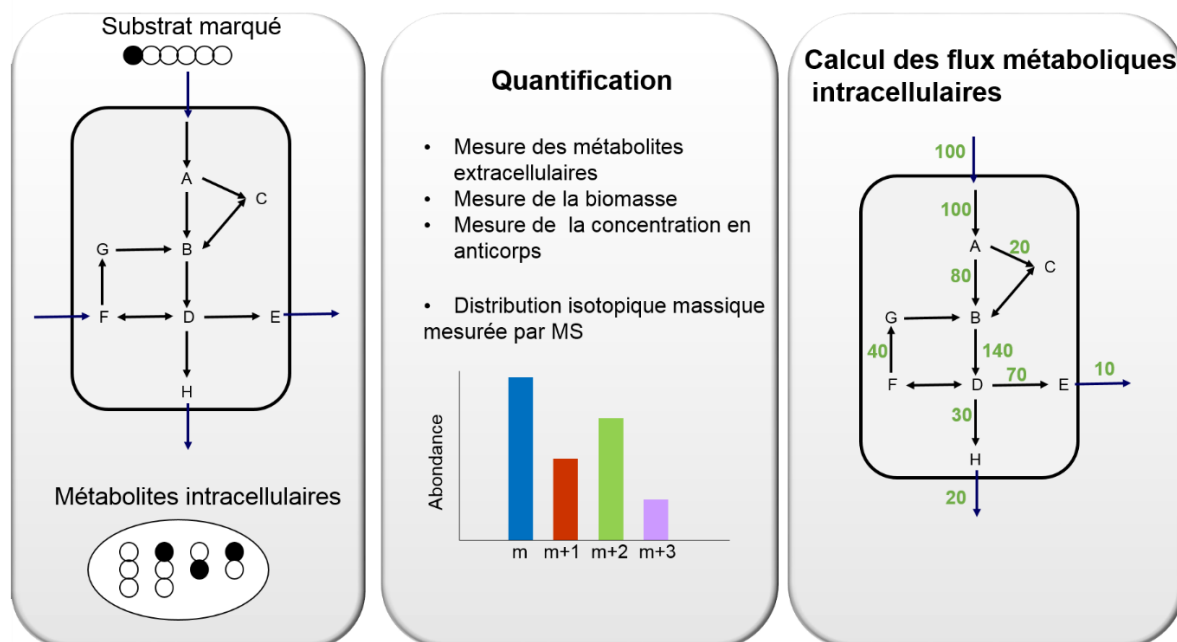


Figure 14: Principe de l'analyse des flux métaboliques intracellulaires par marquage isotopique.

L'utilisation de cette technique présente l'avantage de pouvoir quantifier les flux qui ne peuvent pas être estimés par simple bilan de masse et mesures extracellulaires. Il s'agit

principalement des flux cycliques ou des flux parallèles comme ceux retrouvés dans le cycle des pentoses phosphates. L'AFM-¹³C permet de résoudre de tels flux dans la mesure où le traceur utilisé engendre des patrons de distribution distincts. Ainsi, par la méthode classique d'analyse de flux métaboliques (c-à-d sans marqueur isotopique), la réaction anaplérotique de la pyruvate carboxylase est considérée comme négligeable (Martínez et al., 2013; Nolan and Lee, 2011). Cependant, les études utilisant des traceurs isotopiques ont mis en évidence une activité faible, mais non négligeable de la pyruvate carboxylase. Dans certains cas de figure, ce flux s'est même avéré plus actif que celui de la pyruvate déshydrogénase (Goudar et al., 2010; Templeton et al., 2013). De manière similaire, l'AMF-¹³C a permis de mettre en évidence une forte activité de la voie des pentoses phosphates notamment pendant la phase stationnaire de croissance (Ahn and Antoniewicz, 2011; Goudar et al., 2010; Sengupta et al., 2011). De plus, la méthode classique d'analyse des flux métaboliques est fondée sur des postulats difficilement vérifiables (p ex. minimisation de l'énergie, maximisation de la croissance) contrairement à l'AMF-¹³C qui dépend uniquement de la distribution des carbones marqués.

L'application de l'AFM-¹³C pour les cellules de mammifères représente cependant un défi majeur du fait de la complexité des milieux de culture et la compartimentation des cellules (e.g. présence de réactions mitochondriales et/ou cytosoliques). Les milieux de culture utilisés contiennent de nombreuses sources de carbone (glucose, glutamine, acides aminés, acides gras et acides organiques) dans des concentrations assez élevées. La concentration moyenne en glucose des milieux de culture commerciaux est de l'ordre de 30 mM. Ainsi, le traceur isotopique peut être fortement dilué rendant plus difficile la détermination précise de la distribution de la masse des isotopomères (DMI). La présence d'isoenzymes qui peuvent catalyser des réactions analogues dans plusieurs compartiments, comme par exemple l'enzyme malique, rend la quantification de certaines voies particulièrement difficile.

La précision avec laquelle les flux intracellulaires peuvent être quantifiés par AFM-¹³C dépend à la fois de la justesse du modèle métabolique utilisé, du choix du (des) traceur(s) isotopique(s), ainsi que du type et du nombre de mesures de marquage disponibles. Le type de traceur régit la distribution de la masse des isotopomères de chaque métabolite pour un flux donné. Il est choisi en fonction des flux métaboliques à déterminer. Des travaux d'évaluation de différents types de traceurs isotopiques des cellules de mammifères ont montré que i) les traceurs [1,2-¹³C], [2-¹³C] et [3-¹³C] glucose permettent l'estimation la plus précise des flux de

la glycolyse et du cycle des pentoses phosphates et que ii) les traceurs [$U^{13}C$] glucose et [1,2- ^{13}C], [3,4- ^{13}C] et [$U^{13}C$] glutamine permettent la meilleure estimation des flux du cycle des ATC (Crown et al., 2012; Metallo et al., 2009). Idéalement, les expériences sont réalisées en combinant plusieurs traceurs pour obtenir l'information la plus riche possible.

L'analyse des voies métaboliques par marquage isotopique est facilitée si les cultures cellulaires ont atteint des états métaboliques et isotopiques stables. Pour des cellules de mammifères ayant un taux de croissance constant, l'état d'équilibre peut être atteint rapidement, soit quelques heures après l'ajout du traceur, étant donné que les *pools* de métabolites intracellulaires sont typiquement assez faibles. Depuis quelques années, des groupes de recherche développent une AFM- ^{13}C dite « dynamique » qui ne nécessite pas l'atteinte de l'équilibre métabolique et isotopique pour l'estimation des flux (Ahn and Antoniewicz, 2012; Noh and Wiechert, 2006). Cette méthode est basée sur la mesure du marquage des métabolites au cours du temps. La vitesse lente de marquage ainsi que la compartimentation des cellules de mammifères représentent un grand défi à l'application de l'AMF- ^{13}C dynamique dans ce type de cellules.

5. La glycosylation des anticorps

Afin de répondre aux demandes d'un marché en pleine expansion, il est non seulement nécessaire de développer des procédés de culture permettant de maximiser les rendements de production d'anticorps, mais il faut également assurer une qualité constante et optimale du produit final. Ce dernier aspect revêt actuellement une importance capitale dans l'industrie biopharmaceutique. Étant donné l'importance de la glycosylation, notamment, sur les fonctions biologiques des anticorps, il est devenu primordial d'améliorer la compréhension et la maîtrise de la glycosylation des anticorps produits au cours du procédé.

5.1. Les fonctions biologiques des anticorps

L'utilisation d'anticorps thérapeutiques est fondée sur la capacité de ces derniers à cibler de façon spécifique une molécule associée à une pathologie. Dans certains cas, la partie Fab de l'anticorps se lie à un ligand de manière à bloquer un site présentant une fonction spécifique comme un site de liaison. Il peut s'agir par exemple de cytokine, de ligands solubles, de domaine de récepteur impliqué dans la liaison d'un ligand, ou d'un antigène spécifique exprimé à la surface de cellules cancéreuses. L'affinité de l'anticorps est alors un paramètre déterminant son efficacité. Dans certains cas où l'antigène est présent à la surface des cellules, la liaison de l'anticorps à sa cible peut enclencher des effets cytolytiques grâce à leur domaine Fc. La partie Fc de l'anticorps est impliquée dans le recrutement d'effecteurs de la réponse immunitaire (Figure 15). Une fois l'épitope fixé à l'antigène, le Fc des anticorps peut se fixer aux récepteurs Fc γ récepteur IIIA des cellules *natural killer* (NK) et aux récepteurs Fc γ récepteur IIA des neutrophiles et entraîner la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC pour *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) ou la cytotoxicité dépendante de l'activation du complément (CDC pour *complement dependent cytotoxicity*). Les cellules *natural killer* et les neutrophiles libèrent des agents lytiques contre la cellule cible entraînant sa mort. La fixation du Fc au Fc γ récepteur IIA des macrophages entraîne la phagocytose de la cellule cible, phénomène appelé phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP pour *antibody dependent cellular phagocytosis*). Le phénomène de CDC dépend de la capacité du Fc des anticorps à se lier au composé C1q du complexe du complément. Cette fixation aboutit à la

formation du complexe d'attaque membranaire qui conduit à la destruction de la membrane de la cellule cible.

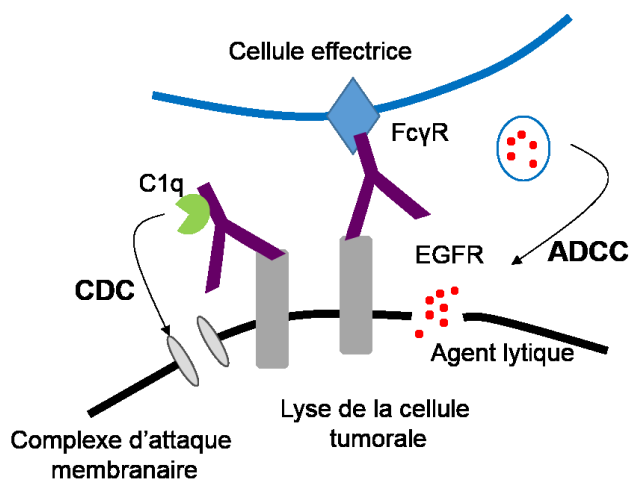


Figure 15: Mode d'action des anticorps cytolytiques.

Bien que le nombre d'anticorps thérapeutiques approuvés augmente constamment, leur mode d'action est mal caractérisé. Albanesi and Daëron (2012) ont compilé les travaux menés sur les réponses cellulaires spécifiques de plusieurs anticorps. Il semblerait que, dans la plupart des cas, les anticorps étudiés entraîneraient l'ADCC mais que les types de Fcγ récepteurs impliqués ne sont pas toujours clairement identifiés (Tableau 1). La présence d'un patron de glycosylation spécifique sur l'anticorps est important puisque celui-ci influence la liaison du Fc au Fcγ récepteur ou au C1q pour le déclenchement des fonctions effectrices de l'anticorps. Les oligosaccharides participent également au maintien de la structure quaternaire, à la solubilité, à la clairance et à la stabilité des anticorps. Les différentes classes d'anticorps (IgG, IgM, IgA, IgE et IgD) présentent des sites de glycosylation variables au niveau du Fc et du Fab. Étant donné que les IgG sont les anticorps présents en circulation dans le sang humain et que les anticorps thérapeutiques sont majoritairement des IgG, seule la glycosylation de cette classe d'anticorps sera traitée ici.

Les IgG présentent un seul site conservé de N-glycosylation (Asn-X-Serine/Thréonine) au niveau de l'asparagine 297 dans chaque domaine CH2. La structure la plus commune des oligosaccharides des anticorps est de type bi-antennaire, composée d'un degré variable de

fucose, de N-acétylglucosamine (GlcNAc), de mannose, de galactose et d'acide sialique (Figure 16).

Tableau 1 : Mode d'action des anticorps thérapeutiques (Albanesi and Daëron, 2012)

Produits	Cibles	Indications	Effets dépendant du Fab	Effet dépendant du Fc	Récepteurs impliqués
Rituximab (Rituxan)	CD20	Lymphome non Hodgkinien	↑ apoptose	CDC, ADCC	FcγRIIIA
Ofatumumab (Arzerra)	CD20	Leucémie lymphoïde chronique	↑ apoptose	CDC, ADCC	
Trastuzumab (Herceptin)	HER2	Cancer du sein métastatique	↓ prolifération cellulaire	ADCC	FcγRIIIA
Alemtuzumab (Campath)	CD52	Leucémie lymphocytaire chronique	↑ apoptose	ADCC	
Daclizumab (Zenapax)	CD25	Rejet de greffe rénale	↓ activation des cellules T	ADCC	
Cetuximab (Erbix)	EGFR	Cancer colorectal métastatique, Lymphome non Hodgkinien	↑ apoptose	ADCC	FcγRIIIA
Infliximab (Remsima)	TNFα	Arthrite, maladie de crohn	↓ TNFα		
Bevacizumab (Avastin)	VEGF	Cancer colorectal métastatique, glioblastome, carcinome rénal métastatique	↓ VEGF		

La glycosylation est dépendante de nombreux facteurs. Dans le cadre de la production d'anticorps thérapeutiques, la glycosylation est sujette à variation en fonction des cellules hôtes utilisées et des paramètres de culture (Anumula, 2012). La plupart des anticorps thérapeutiques sont produits dans les cellules CHO, NS0 et Sp2/0. Bien que ces cellules soient capables de synthétiser les patrons de glycosylation présentés figure 16, la proportion des anticorps mono-galactosylés (G1) et di-galactosylés (G2) est relativement réduite et elles ne sont pas capables d'ajouter le GlcNAc bisectant (bGlcNAc). Contrairement aux cellules humaines, les cellules NS0 et Sp2/0 sont capables d'ajouter un résidu α-1,3 galactose au niveau du galactose β-1,4GlcNAc, ce qui peut être potentiellement immunogène pour l'homme.

De nombreuses recherches ont tenté d'élucider l'impact de chaque oligosaccharide sur les fonctions effectrices des anticorps thérapeutiques. Ainsi, il a été montré qu'une dé-glycosylation complète des anticorps thérapeutiques abolit presque totalement leur capacité de liaison au Fcγ récepteur (Boyd et al., 1995; Houde et al., 2010; Mimura et al., 2001). Bien que chez l'Homme les IgG semblent majoritairement fucosylées, de nombreuses études montrent

que lorsque les anticorps thérapeutiques sont dé-fucosylés, la liaison au Fc γ récepteur IIIA et l'ADCC sont améliorées et ceci sans altérer la liaison anticorps-antigène. Plus précisément, une corrélation a été mise en évidence entre le pourcentage d'anticorps non-fucosylés, l'ADCC et l'affinité pour le Fc γ récepteur IIIA (Chung et al., 2012). De plus il semblerait qu'une concentration plus faible d'antigène soit requise pour déclencher l'ADCC lorsque l'anticorps est non-fucosylé (Chung et al., 2012; Houde et al., 2010; Niwa et al., 2005; Shields et al., 2002; Yamane-Ohnuki et al., 2004).

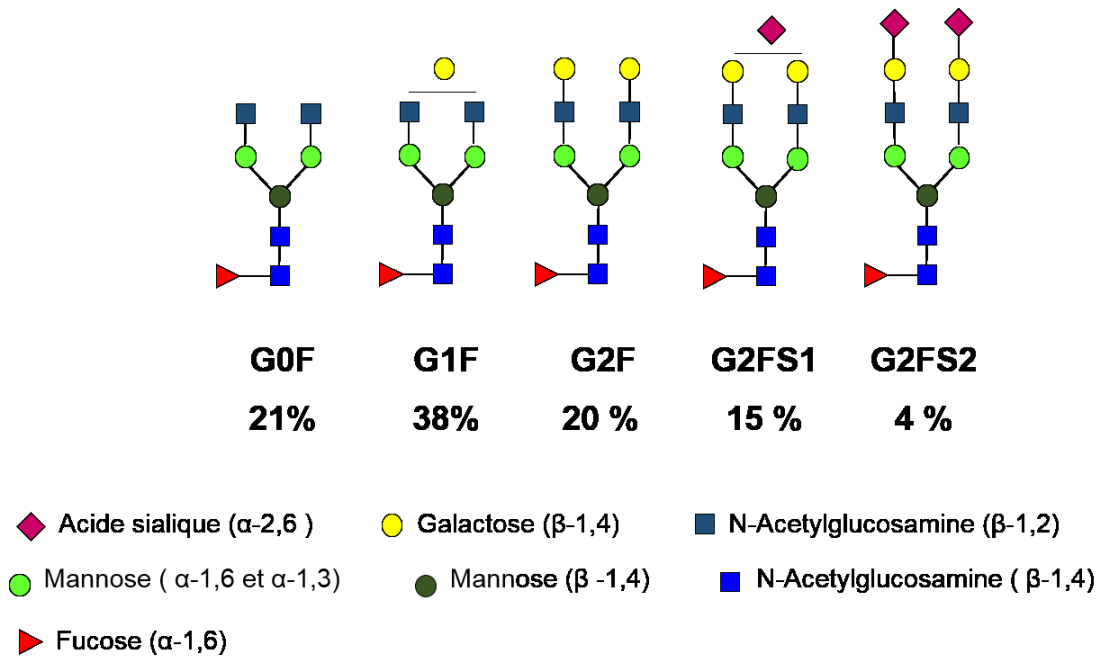


Figure 16: Distribution des principales glycoformes présentes sur le Fc d'IgG circulant chez l'Homme (Anumula, 2012).

L'impact du galactose sur les fonctions effectrices des anticorps est controversé. Certaines études montrent que la suppression des résidus de galactose a un effet uniquement sur le CDC (Boyd et al., 1995; Hodoniczky et al., 2005; Shinkawa et al., 2003). D'autres études montrent au contraire qu'une augmentation de la galactosylation améliore la liaison au Fc γ récepteur IIIA et l'ADCC (Houde et al., 2010; Thomann et al., 2015). Par contre, ces études s'accordent sur le fait que l'effet d'une dé-fucosylation est bien plus grand que l'effet d'une hyper-galactosylation. Le rôle de l'acide sialique dans l'ADCC et le CDC n'est pas très clair. Il

a été rapporté qu'une hyper-sialylation n'aurait pas d'effet ou serait néfaste pour l'ADCC (Scallon et al., 2007; Thomann et al., 2015). Certaines études laissent à penser que la présence d'acide sialique aurait des propriétés anti-inflammatoires (Kaneko et al., 2006; Nimmerjahn and Ravetch, 2007).

5.2.Synthèse biologique des glycanes

La glycosylation est un processus complexe et séquentiel régi par le bon arrangement des réactions enzymatiques, la spécificité de chaque enzyme ainsi que leur régulation. Près de 40 réactions enzymatiques et de nombreux précurseurs sont nécessaires à l'élaboration d'un glycan. Les réactions de glycosylation ont lieu dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi alors que les précurseurs de la glycosylation (nucléotides-sucres) sont synthétisés dans le cytoplasme (Figure 17).

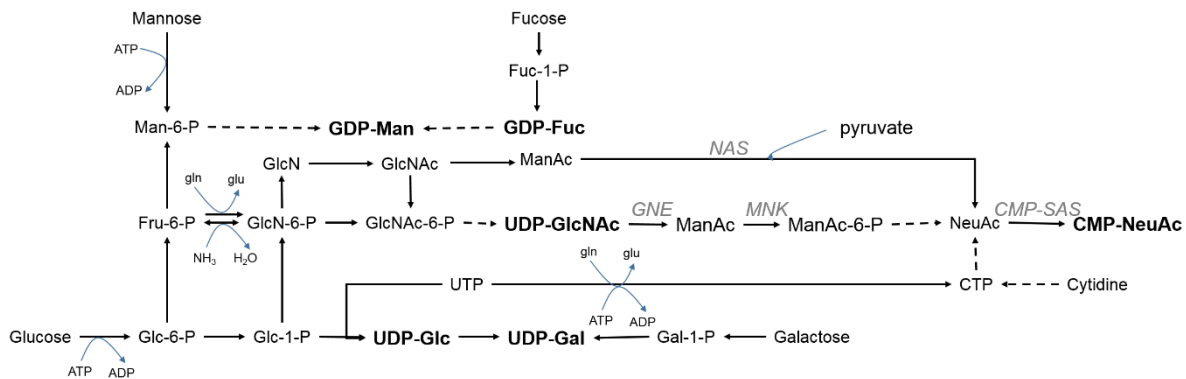


Figure 17: Voie de biosynthèse des nucléotides-sucres.

NAS: Neuraminic acid synthase, GNE: GlcNAc épimérase, MNK: ManAc kinase, CMP-SAS: CMP sialic acid synthase
 Les flèches en pointillées représentent plusieurs étapes enzymatique

Chaque glycotransférase est spécifique d'un accepteur, d'un donneur et d'une liaison. Chaque enzyme présente une localisation subcellulaire précise ce qui fait que chaque réaction est bien compartimentée. Les glycotransférases catalysent le transfert d'un monosaccharide apporté par un nucléotide-sucre (UDP-glucose, UDP-galactose, UDP-N-acétylglucosamine, GDP-mannose, GDP-fucose, CMP- N-acétylneuraminique) sur un accepteur (Figure 18). Les premières étapes de glycosylation s'effectuent dans le réticulum endoplasmique. Un précurseur

oligosaccharidique (Glc3Man9GlcNAc2-PP-Dol) est transféré en bloc sur l'asparagine d'un séquen consensus (Asn-X-Ser/Thr) de la protéine en voie de synthèse (Figure 18). La maturation se poursuit par l'action de glucosidases spécifiques qui permettent la formation d'une structure Man8GlcNAc2 sur la protéine. La glycoprotéine peut alors s'engager dans l'appareil de golgi et poursuivre sa maturation. Dans le cis-golgi, la structure du complexe oligosaccharidique est modifiée pour donner Man5GlcNAc2. Dans le media-golgi, le glycan est remanié en Man3GlcNAc2. Il s'en suit par l'action séquentielle de N-acétylglucosaminyl-, galactosyl-, fucosyl-, et sialyltransférases, la génération des structures glycaniques spécifiques présentées figure 18. La glycosylation des anticorps et plus généralement des protéines est un processus complexe et difficile à contrôler vu le nombre d'acteurs mis en jeu.

Dans le cadre de la production industrielle d'anticorps thérapeutiques, il est primordial de produire des anticorps biologiquement actifs et donc de veiller à leur bonne glycosylation. Afin de minimiser les variations de glycosylation d'un lot à l'autre, il est nécessaire d'identifier les paramètres physico-chimiques du procédé de culture susceptibles d'influencer la glycosylation des anticorps.

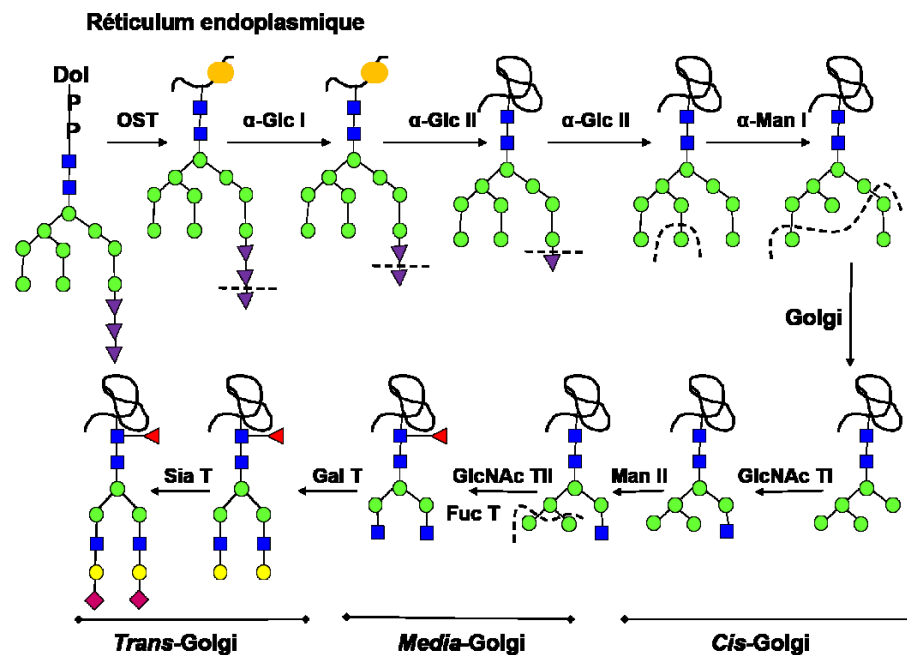


Figure 18: Voie de synthèse des N-glycans des anticorps

OST : Oligosaccharyltransférase α Glc I: α -1,2 glucosidase I, α Glc II: α -1,2 glucosidase II, α Man I: α -mannosidase I, α Man II: α -mannosidase II, GlcNAc TI: β -1,2 N-acétylglucosaminettransférase I, GlcNAc TII: β -1,2 N-acétylglucosaminettransférase II, Fuc T : fucosyltransférase, Gal T : galactosyltransférase, Sia T : sialyltransférase

5.3. Les facteurs influençant la glycosylation

5.3.1. La concentration en glucose

Le glucose constitue la source de carbone essentielle au métabolisme cellulaire et intervient dans la synthèse des nucléotides-sucres. De nombreuses études ont montré que la glycosylation des protéines est sensible à la disponibilité en source de carbone durant le procédé de culture. Il a été montré que des cultures de CHO épuisées en glucose produisent un précurseur oligosaccharidique tronqué de type Man5GlcNAc3 qui pourrait être à l'origine d'une glycosylation moins efficace (Rearick et al., 1981). Des études ont également montré que la proportion d'IFN- γ totalement glycosylé se trouve diminuée lorsque les cellules CHO subissent une période de déplétion en glucose, mais l'ajout subséquent de glucose semble restaurer la glycosylation (Hayter et al., 1992; Xie et al., 1997). Il a été observé que la glycosylation de IFN- γ diminue avec le *pool* d'UDP-GlcNAc, dans des conditions de culture où le glucose est limitant. Nyberg et al. (1998) en ont déduit que lorsque le glucose se trouve en concentration limitée, celui-ci est utilisé pour la synthèse d'énergie au détriment de la biosynthèse et de la glycosylation. Plus récemment, des travaux ont montré également une diminution des *pools* UDP-GlcNAc et GDP-Man quand les concentrations initiales de glucose sont réduites dans les cultures de CHO produisant l'EG2-hFc. Une augmentation des structures pauci-mannose (Man2,3GlcNAc), non-galactosylées et non-sialylées est observée (Liu et al., 2014; Villacres et al., 2015).

5.3.2. La concentration en glutamine

La glutamine est un acide aminé primordial pour le métabolisme énergétique ainsi que pour la synthèse des nucléotides. Dans des conditions de limitation en glutamine, la glycosylation de IFN- γ semble diminuée ainsi que la réserve en UDP-GlcNAc (Nyberg et al., 1998). Nyberg et al. (1998) pose alors l'hypothèse qu'une limitation en glutamine limiterait l'activité de la glutamine/fructose 6-phosphate amidotransférase responsable de la formation de Glucosamine-6-phosphate, à l'origine de la diminution du *pool* de N-acétylglucosamine. Une limitation en glucose quant à elle, inhiberait la voie de synthèse de l'UTP limitant ainsi la formation de nucléotides-sucres. Une étude similaire a montré qu'une limitation en glutamine (0.3 mM) pouvait affecter la glycosylation de l'IFN- γ en entraînant une diminution de structures

complexes ainsi qu'une diminution de 17 % de la sialylation (Chee Furng Wong et al., 2005). Plus récemment, il a été montré que les cellules CHO cultivées en présence de concentrations de glutamine limitantes produisaient une protéine d'intérêt moindrement sialylée avec des structures glycaniques moins complexes. Une diminution du *pool* intracellulaire d'UDP-GlcNAc est également observée (Burleigh et al., 2011).

5.3.3. La disponibilité en acides aminés

Crowell et al. (2007) ont montré que la supplémentation d'acides aminés, totalement consommés au cours de la culture, ne permettait pas d'améliorer la sialylation de l'EPO produit par des cellules CHO. Cependant, il semblerait que dans un contexte où la concentration d'ammonium est très élevée, la modulation des concentrations en acides aminés pourrait avoir un impact sur la glycosylation des protéines produites. Une étude a montré que la diminution du niveau d'asparagine dans le milieu de culture permettait de diminuer la concentration d'ammonium et d'augmenter la galactosylation de l'anticorps produit dans des cellules CHO (McCracken et al., 2014). Chen and Harcum (2005) ont montré que l'ajout de thréonine, de proline et de glycine dans des cultures de CHO permettait d'atténuer les effets néfastes de l'ajout de chlorure d'ammonium. Ainsi, en présence de fortes concentrations de chlorure d'ammonium, la croissance cellulaire, la productivité et la glycosylation du produit (t-PA) ont été rétablies par l'ajout de ces trois acides aminés. Ces derniers pourraient constituer une source alternative de carbone et d'azote permettant de contribuer à la croissance et à la production de protéine. Au niveau de la glycosylation, l'ajout de thréonine, de proline et de glycine a permis d'augmenter les contenus en acide sialique et N-acétylgalactosamine du t-PA (Chen and Harcum, 2005).

5.3.4. Les ions ammonium et le pH

Les effets néfastes des ions ammonium sur la glycosylation sont connus depuis plusieurs années. Borys et al. (1994) ont montré que l'ajout de NH₄Cl inhibait la glycosylation du lactogène-I placentaire murin produit dans les cellules CHO. Des études similaires, menées dans les cellules CHO produisant de l'EPO (Yang and Butler, 1999), du G-CSF (Andersen and Goochee, 1995) ou du TNFR-Fc (Gawlitzeck et al., 2000) ont montré que l'ajout de NH₄Cl dans le milieu de culture altérait la glycosylation de ces protéines. Cependant, les mécanismes d'action des ions ammonium sur la glycosylation ne sont pas bien caractérisés. Il existerait

plusieurs niveaux de régulation. Au niveau génétique, des études menées sur des CHO soumises à des stress d'ammonium ont montré une augmentation d'expression de gènes des sialidases 1, 3 et des galactosidases ainsi qu'une diminution d'expression des gènes de la β -1,4galactosyltransferase 1. Par contre, l'expression des gènes des β -1,4galactosyltransferases 4 et 5 a été retrouvée augmentée (Chen and Harcum, 2006; Ha et al., 2015). Cependant, des travaux similaires menés avec des cellules NS0 ont montré qu'aucun des gènes reliés à la glycosylation n'étaient différemment exprimés en présence de concentration similaire de NH_4Cl . Ces résultats suggèrent l'existence d'autres niveaux de régulation. Un certain nombre d'études se sont basées sur le fait que l'ajout de NH_4Cl pourrait induire une augmentation de pH des compartiments acides de la cellule (Réticulum endoplasmique et appareil de Golgi) qui serait à l'origine d'un dysfonctionnement des enzymes impliquées dans la glycosylation. En effet, l'ajout de chloroquine (base faible) ou de NH_4Cl semble avoir des effets similaires sur la glycosylation. En présence de chloroquine, le contenu en acide sialique et en galactose du TNFR-Fc est retrouvé réduit tout comme en présence de NH_4Cl (Gawlitzeck et al., 2000). Des études similaires utilisant la chloroquine ou la bafilomicine 1A (inhibiteur ATPase) et NH_4Cl sur d'autres types cellulaires (COS-7 et Hela) ont montré qu'une augmentation minime de pH dans le Golgi suffisait à inhiber l' α -2,3sialyltransférase et à délocaliser la N-acétylgalactosaminetransférase 2, la galactosyltransférase 1 et la N-acétylglucosaminetransférase I (Axelsson et al., 2001; Rivinoja et al., 2009). Des études sur l'effet du pH du milieu de culture ont révélé qu'une glycosylation optimale peut être obtenue à l'intérieur d'une fenêtre de régulation assez précise qui dépend du type cellulaire et de la protéine d'intérêt (Borys et al., 1993; Muthing et al., 2003; Yoon et al., 2005). D'autres groupes ont observé une corrélation entre l'ajout de NH_4Cl et l'augmentation des réserves de UDP-GlcNAc et UDP-Gal. L'augmentation de ces *pools* pourrait être à l'origine de l'augmentation de l'hétérogénéité de la glycosylation de l'EPO (Yang and Butler, 2002), de IL-2 (Grammatikos et al., 1998; Ryll et al., 1994) et de IL-Mu6 (Gawlitzeck et al., 1997). De plus, il serait possible que l'augmentation de UDP-GlcNAc et UDP-Gal entraîne une inhibition du transport de CMP-NeuAc dans le Golgi, expliquant la diminution de sialylation de IL-Mu6 produite dans les cellules BHK-21 (Gawlitzeck et al., 1997).

5.4.Stratégies pour améliorer la glycosylation des anticorps au cours du procédé de culture

Pour améliorer la glycosylation des anticorps, deux approches sont principalement envisagées. La première consiste à agir au niveau du procédé en lui-même, par exemple en modifiant la composition du milieu de culture. La seconde consiste à cibler spécifiquement les gènes impliqués dans le processus de glycosylation.

5.4.1. Les suppléments

L'ajout au milieu de culture de précurseurs de la glycosylation peut s'avérer être un moyen simple et efficace pour moduler la glycosylation des protéines recombinantes. L'impact de supplémentation en galactose, glucosamine, mannose, uridine et manganèse sur la glycosylation des protéines recombinantes est particulièrement bien documenté. Les lignées cellulaires employées dans ces études, la nature des protéines recombinantes ainsi que les conditions de culture utilisées sont très diverses et semblent être à l'origine de résultats variables et même parfois contradictoires. Ici, nous nous attacherons plus spécifiquement à la glycosylation des anticorps produits dans les cellules CHO (Tableau 2). De manière générale il semble qu'un cocktail de galactose et de manganèse améliore la galactosylation des anticorps.

Tableau 2 : Comparaison de l'effet de supplémentation en précurseurs de la glycosylation sur la glycosylation d'anticorps monoclonaux produits en cellules CHO

Produits	Supplémentation (Concentration totale finale)	Nombres d'ajouts	Effet sur la sialylation et la galactosylation	Références
TNFR-Fc	Glucosamine (5mM)		Pas d'effet	(Gawlitzeck et al., 2000)
IgG	Galactatose (40mM) Manganèse (16 uM) Uridine (8mM)	+ 12	↑ 23 % galactosylation	(Gramer et al., 2011)
IgG4	Galactose (100 mM) Manganèse (1uM) Uridine (0.5 mM)	+ 1	↑ 2 à 3 x sialylation ↑ galactosylation (1.5 x G1 et 4 x G2)	(Grainger and James, 2013)
IgG	Galactose (30 mM) Manganèse (4 uM)	+ 1	↑ 10 % galactosylation (G1 +G2)	(Surve and Gadgil, 2015)
IgG1	Galactose (100 mM) Manganèse (4uM)	1	↑ 8% galactosylation (G1 + G2) ↑ high mannose	(St Amand et al., 2014)
TNF-Fc	Galactose (20 mM)	1	↑ 1.5 x galactosylation (G1 + G2) ↑ 2x sialylation	(Liu et al., 2015)
EG2-hFc	N-acetylglucosamine (2.5mM)		↑ 15 % des formes G0	(Blondeel et al., 2015)
IgG	Galactose (18 mM)	5	↑ galactosylation (20 % G1) ↑ sialylation	(Villiger et al., 2016)
	Galactose (18 mM) Manganèse (2.5 mM) N-acetylglucosamine (8 mM) Uridine (4 mM)	+ 5 (8 5 5	↑ galactosylation (+80% G1 et + 4% G2) ↑ 10 % des formes G0 ↓ 10 % des formes G1 ↑ des formes G1 (+10%)	
IgG	Galactose (20 mM) N-acetylglucosamine (20 mM)	1 (20 1	↑ 50 % Galactosylation (G1 + G2) ↓ 20 % Galactosylation (G1 + G2)	(Kildegaard et al., 2016)

L'ajout seul de manganèse, un co-facteur de la β -1,4 galactosyltransférase semble n'avoir que peu d'effet sur la galactosylation des anticorps (St Amand et al., 2014). Cependant, il a été rapporté qu'une combinaison de manganèse et de galactose a un effet synergique permettant d'améliorer la galactosylation des anticorps (Grainger and James, 2013; St Amand et al., 2014). L'uridine semblerait également être un facteur agissant en synergie avec le galactose et le manganèse (Grainger and James, 2013; Gramer et al., 2011). Cependant, des études ont montré que l'uridine à certaines concentrations est un puissant inhibiteur de la croissance cellulaire et de la production d'anticorps (Grainger and James, 2013; Villiger et al., 2016).

5.4.2. Ingénierie enzymatique

Étant donné l'importance de la glycosylation sur les fonctions effectrices des anticorps thérapeutiques, de nombreuses recherches se sont attachées à modifier génétiquement les cellules hôtes afin d'obtenir une production d'anticorps dont la glycosylation est plus homogène. Des études se sont intéressées au rôle de la surexpression de β -1,4 N-acetylglucosaminetransférase III (GnTIII) dans les cellules CHO et HEK293. Cette enzyme est responsable de l'ajout de GlcNAc bisectant sur des anticorps encore non galactosylés, dans le *media*-Golgi. L'ajout de galactose et/ou l'ajout de GlcNAc empêche l'ajout de fucose. Ainsi, il a été montré que l'augmentation du contenu en GlcNAc bisectant d'IgG produit par des CHO et des HEK293 permettait d'augmenter la liaison au Fc γ récepteur IIIA des cellules *natural killer* et l'activité ADCC des l'anticorps (Ferrara et al., 2006; Umanà et al., 1998).

Un grand nombre d'études se sont penchées sur la production d'anticorps dépourvus de fucose, car ces derniers présentent l'avantage de déclencher une réponse ADCC plus importante contrairement aux anticorps fucosylés. Ainsi, des travaux de répression du gène de la fucosyltransférase 8 par ARN interférant a permis d'augmenter la proportion d'anticorps non fucosylé (Mori et al., 2004). La combinaison de la sous-régulation du gène de la fucosyltransférase 8 et du gène de la GDP-mannose-4,6 déshydratase (enzyme intermédiaire dans la voie de synthèse du GDP-fucose) a permis l'obtention d'une population d'anticorps non fucosylés de 67-98% (Imai-Nishiya et al., 2007). Des travaux de double délétion par recombinaison homologue, par CRISPR/cas9, ou par des nucléases à doigts de zinc du gène de la fucosyltransférase ont permis de produire des anticorps entièrement non fucosylés (Malphettes et al., 2010; Sun et al., 2015; Suzuki et al., 2007; Yamane-Ohnuki et al., 2004). Cette modification a permis d'améliorer jusqu'à 100 fois l'activité ADCC des IgG tout en nécessitant moins d'antigène (Suzuki et al., 2007; Yamane-Ohnuki et al., 2004).

De nombreux travaux se sont également intéressés à l'amélioration de la sialylation des protéines recombinantes par génie génétique. Ces études traitent, pour la majorité, de la sialylation de l'EPO et de IFN γ . Pour ces deux protéines, la sialylation joue un rôle capital pour augmenter leur temps de demi-vie. L'impact de la sialylation sur les anticorps est plus controversé d'autant plus que chez l'humain les niveaux de sialylation des anticorps sont relativement bas (<15%) (Anumula, 2012). Néanmoins, la sialylation semble importante pour

des applications anti-inflammatoires. Les cellules CHO expriment seulement l' α -2,3 sialyltransférase bien que le gène de l' α -2,6 sialyltransférase soit présent, mais n'est pas exprimé. Par conséquent, de nombreuses études ont été consacrées à la surexpression de l' α -2,6 sialyltransférase, combinée ou non à la surexpression de la β -1,4 galactosyltransférase I. Ces travaux ont montré que le contenu des anticorps en acide sialique peut passer de 1-8% à 30-60% quand l' α -2,6 sialyltransférase et/ou β -1,4 galactosyltransférase I sont surexprimées dans les cellules CHO (Onitsuka et al., 2012; Raymond et al., 2015; Weikert et al., 1999).

L'ingénierie des glycanes représente un enjeu industriel important, comme en témoignent les nombreuses plateformes technologiques spécialisées dans l'ingénierie des sucres qui établissent des partenariats avec les grandes entreprises pharmaceutiques. On peut citer le partenariat de Lonza avec Biowa pour la génération de CHO délétées pour la fucosyltransférase 8 ou l'acquisition de GlycoFi par Merck pour la production d'anticorps produit dans *Pichia pastoris* présentant des glycoformes homogènes totalement galactosylées ou totalement non galactosylées ou totalement sialylées (Jefferis, 2009).

6. Conclusion

Au cours de ce chapitre nous avons vu qu'il était primordial d'augmenter les capacités de production des procédés pour répondre aux demandes d'un marché en pleine expansion. Cependant, la dérégulation du métabolisme des lignées cellulaires continues utilisées constitue un frein à l'obtention de rendements de production plus élevés. Il est donc nécessaire de poursuivre les efforts entrepris dans la mise en œuvre de stratégies permettant de réorienter le métabolisme cellulaire vers un métabolisme plus efficace, générant moins de lactate et d'ions ammonium. Le développement de telles stratégies nécessite une bonne compréhension de la physiologie des lignées cellulaires, notamment des liens entre le métabolisme, la croissance, la production et la qualité du produit final.

Chapitre 1 : Modification du métabolisme du lactate de cellules CHO cultivées en mode cuvée alimentée

1. Présentation de l'article

Ce chapitre reprend l'article de recherche intitulé « *Metabolic engineering to alter lactate metabolism during fed-batch cultures* » publié dans le *Journal of Biotechnology* (217 (2016) 122–131).

Au cours de ce travail une lignée cellulaire de CHO, exprimant constitutivement l'EG2-hFc, a été génétiquement modifiée par l'insertion du gène de la pyruvate carboxylase cytoplasmique de levure (PYC2). Les clones obtenus ont été criblés en fonction de leur niveau d'expression de PYC2. Contrairement à la lignée parentale, les clones présentant une forte expression de PYC2 consomment le lactate pendant la phase stationnaire de croissance jusqu'à une quasi-totale déplétion de ce métabolite du milieu de culture. Ce changement métabolique a été retrouvé de façon consistante dans tous les milieux commerciaux testés. Ce changement métabolique a permis également de retarder significativement l'acidification du milieu de culture dans des conditions non contrôlées en flacons agités. Cultivées en mode cuvée alimentée dans des bioréacteurs, en environnement contrôlé et en présence de haut niveau de glucose, les cellules PYC2 conservent leur capacité à métaboliser le lactate et présentent une production d'anticorps augmentée de 30 % par rapport à la lignée parentale.

2. Metabolic engineering to alter lactate metabolism during fed-batch cultures

Cécile Toussaint ^{a,b}, Olivier Henry ^c, Yves Durocher ^{a,b}

a Département de biochimie et médecine moléculaire, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

b Life Sciences, NRC Human Health Therapeutics Portfolio, Building Montreal-Royalmount, National Research Council Canada, Montreal, QC H4P 2R2, Canada

c Département de Génie Chimique, École Polytechnique de Montréal, C.P. 6079, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3A7, Canada

Journal of Biotechnology 217 (2016) 122–131

Keywords: CHO cells, Pyruvate carboxylase, metabolic engineering, fed-batch, monoclonal antibody

2.1. Abstract

Recombinant yeast pyruvate carboxylase (PYC2) expression was previously shown to be an effective metabolic engineering strategy for reducing lactate formation in a number of relevant mammalian cell lines, but, in the case of CHO cells, did not consistently lead to significant improvement in terms of cell growth, product titer and energy metabolism efficiency. In the present study, we report on the establishment of a PYC2-expressing CHO cell line producing a monoclonal antibody and displaying a significantly altered lactate metabolism compared to its parental line. All clones exhibiting strong PYC2 expression were shown to experience a significant and systematic metabolic shift toward lactate consumption, as well as a prolonged exponential growth phase leading to an increased maximum cell concentration and volumetric product titer. Of salient interest, PYC2-expressing CHO cells were shown to maintain a highly efficient metabolism in fed-batch cultures, even when exposed to high glucose levels, thereby alleviating the need of controlling nutrient at low levels and the potential negative impact of such strategy on product glycosylation. In bioreactor operated in fed-batch mode, the

higher maximum cell density achieved with the PYC2 clone led to a net gain (35 %) in final volumetric productivity.

2.2.Introduction

Whether to support new therapeutic antibody development or to respond to market needs, the ability to cost-efficiently generate high yield and high quality of biotherapeutics is critical for the biopharmaceutical industry, owing to the great pressure to lower the cost and shorten the period between drug discovery and product manufacturing. The development and implementation of high-yield fed-batch strategies have contributed greatly at increasing the productivity of mammalian cell cultures (Bibila and Robinson, 1995; Wlaschin and Hu, 2006; Wurm, 2004). In fed-batch processes, the prolonged culture time is often associated with significant lactate and ammonia accumulation in the culture medium over time, which can have detrimental impacts on cell growth and product quality. Continuous cell lines, like CHO cells, show a deregulated glucose metabolism associated with high lactate production that can cause medium acidification or undesired osmolality changes due to alkali addition for culture pH control (Cruz et al., 2000; Lao and Toth, 1997; Omasa et al., 1991; Ozturk et al., 1992). Ammonia is well-known to alter the glycosylation patterns of monoclonal antibodies and other glycoproteins (Andersen and Goochee, 1995; Borys et al., 1994; Chen and Harcum, 2006; Gawlitzek et al., 2000; Yang and Butler, 2002). Appropriate glycosylation of monoclonal antibodies and recombinant proteins is necessary to ensure their biological function and their use as therapeutics. Thus, maintaining consistent and comparable product quality in high cell density cultures remains a critical challenge.

Several waste reduction strategies have been proposed using either metabolic or process engineering approaches. This includes the use of nutrients replacement strategies, for example the substitution of glucose with galactose (Altamirano et al., 2006; Altamirano et al., 2000; Altamirano et al., 2004) or pyruvate (Genzel et al., 2005) or substituting glutamine with asparagine (Kurano et al., 1990) or glutamate (Altamirano et al., 2000; Hassel and Butler, 1990). While effective at reducing waste metabolite formation, these substitutions are often associated with a concomitant reduction in cellular growth. Reduced lactate and ammonia production during fed-batch can be achieved by maintaining glucose and glutamine at very low levels (Omasa et al., 1992; Zhou et al., 1995). Under low nutrient availability, the cell metabolism is

shifted toward a more efficient metabolic state characterized by a lower molar ratio of lactate/glucose (Chee Fung Wong et al., 2005; Maranga and Goochee, 2006). However, this requires the constant monitoring of nutrient levels and feed rate adjustments since non-limiting concentrations must be maintained at all time during the culture. Even short period of glucose starvation were shown to alter the glycosylation of the product (Xie et al., 1997). Moreover, it has been demonstrated that low glucose concentrations (<15mM) lead to reduced site occupancy and decreased galactosylation and sialylation of antibodies (Liu et al., 2014). A dynamic fed-batch strategy to maintain low glutamine (0.1 – 0.3 mM) and glucose (0.35-0.70 mM) concentrations was also shown to decrease complex-type glycan formation and sialic acid content (Chee Fung Wong et al., 2005). These results emphasize the need to optimize both product titer and quality concurrently.

Different metabolic engineering approaches have also been investigated to generate cell lines with improved metabolic characteristics. The amplification of the glutamine synthetase gene in CHO and myeloma cells allowed growth in glutamine-free medium, thereby significantly reducing ammonia formation (Paredes et al., 1999; Zhang et al., 2006). Partial disruption of the gene encoding lactate dehydrogenase A by the means of homologous recombination in hybridoma cells (Chen et al., 2001) or siRNA in CHO cells (Jeong et al., 2006; Kim and Lee, 2007a) was shown to greatly lower the production of lactate, as well as glucose consumption. Studies by Chen et al. (2001) and Kim and Lee (2007a) on the down regulation of LDHA led to increased final product concentrations, although cell growth remained unaffected. In contrast, Jeong et al. (2006) observed an increased cell growth rate, but no significant impact on t-PA production unless downregulation of LDH was combined with the overexpression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. A recent study demonstrated that the simultaneous downregulation of LDH and pyruvate dehydrogenase kinase can significantly reduce lactate accumulation and increase the volumetric antibody production, without impairing cell growth (Zhou et al., 2011). The expression of anti-apoptotic genes was also found to significantly alter the lactate metabolism of CHO cells, inducing a metabolic shift toward lactate consumption and increasing the final antibody titer by 40% (Dorai et al., 2009). Another approach consisted in the expression of the cytosolic yeast pyruvate carboxylase 2 (PYC2) gene in BHK (Irani et al., 1999) and HEK293 cells (Elias et al., 2003; Henry and Durocher, 2011; Vallée et al., 2013). In all cases, lactate formation was significantly decreased and, depending on the cell type and prevailing

culture conditions, translated into improvement of either productivity or cell growth, but not both. In the case of CHO cells, two strategies were explored. First, the insertion of the human pyruvate carboxylase (hPC) gene in DG44 cells, which led to a slight decrease in lactate production (Kim and Lee, 2007b), as this enzyme is expressed in the mitochondria and is therefore not competing directly with LDH for pyruvate conversion. Second, one study reported on the expression of PYC2 in CHO cells, which allowed to decrease the specific lactate production (Fogolin et al., 2004). However, the molar ratio of lactate/glucose remained high (~ 1.5) and relatively unchanged compared to the untransformed cells (~ 1.7), indicating that the reduction in lactate accumulation was mostly due to a decrease in glucose uptake rate. Moreover, while prolonged cell viability was observed, this was at the expense of the maximum cell density, which exhibited a 2-fold reduction in batch culture. Recently, PYC2 overexpression in CHO cells was shown to prolong culture longevity and reduce the lactate/glucose ratio by 25%, but at the expense of a 50 % reduction in the cell specific antibody production rate and an overall decrease in antibody titer (Wilkens and Gerdtzen, 2015).

In the present work, we show the establishment of a PYC2-expressing CHO cell line with a greatly improved metabolic efficiency that translated into reduced lactate accumulation without impairing the cells' specific productivity. All the PYC2- expressing clones that were generated exhibited a prolonged exponential growth phase leading to increases in maximum cell concentration and volumetric productivity. We also demonstrate that the PYC2-expressing cells can maintain their improved phenotype during fed-batch cultures employing concentrated nutrient solutions. In fed-batch bioreactor cultures, this resulted in further significant increases in terms of maximum cell density and final product titer.

2.3. Materials et methods

2.3.1. Stable cell line development

The CHO-EG2 clone 1A7 stably expressing a chimeric human-llama heavy chain monoclonal antibody (EG2) against epidermal growth factor receptor (EGFR) (Bell et al., 2010) was established from the CHO-DUXB11 cell line (Agrawal et al., 2012). The CHO-EG2-PYC2 clone was obtained by transfection of the CHO-EG2 cell line with the pTT18 vector encoding the yeast pyruvate carboxylase 2 gene. After transfection, hygromycin B was added to the cell

culture at a final concentration of 900 µg/mL. After two weeks of selection, the pool of hygromycin-resistant cells was cloned by limiting dilution in 96-well plate. After 2 weeks, colonies were expanded and screened for their PYC2 expression level by western blot. Since the PYC2 enzyme is naturally biotinylated, it allows its detection using HRP-conjugated streptavidin (Sigma). Briefly, cells pellets were incubated on ice 20 minutes in a lysis buffer containing 50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Thesit[®] (Roche), 0.5% Na Deoxycholate, 1x complete–protease inhibitor cocktail (Roche). Cell lysates were centrifuged for 20 min at 12,000 g at 4°C. Supernatants were incubated 5 min at 70°C in SDS sample buffer containing 5 mM dithiothreitol. Samples were electrophoresed on an SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and transferred onto a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell). Membranes were probed with HRP-conjugated streptavidin (Sigma). An anti-GAPDH rabbit polyclonal antibody (Sigma) was utilized for detection of the GAPDH to control total protein load. As a secondary antibody, an anti-rabbit polyclonal antibody HRP-conjugated (Sigma) was employed. The blots were developed using a chemiluminescence kit (Boehringer Mannheim, Germany) and visualized with the Kodak imager system 440CF.

2.3.2. Fed-batch culture in shake flasks for clone evaluation

Eleven PYC2-positive clones and 4 PYC2-negatives clones were cultivated in 250 mL shake-flasks. After 4 days of cultivation, glucose was added daily in order to maintain a concentration of 20 mM. Lactate formation was measured daily for phenotypic screening to confirm that the change in lactate metabolism was the results of PYC2 over-expression rather than clonal effect.

2.3.3. PYC2 cytosolic expression

Three clones were selected according to their stable expression of PYC2. In order to confirm cytosolic PYC2 expression, the cytosols of these clones were isolated using mitochondria isolation kit for cultured cells (Thermo Scientific- cat#89874). Their PYC2 expression level was assessed by western blot using HRP-conjugated streptavidin (Sigma) as described before.

2.3.4. Medium and culture conditions

PowerCHO2 chemically defined medium (Lonza) supplemented with 8 mM glutamine, 0.1% Kolliphor[®] (Sigma) and 2% (v/v) anti clumping agent (Gibco) was used for stable cell line

development and batch shake-flasks experiments. Cultures were inoculated at a cell concentration of 0.2×10^6 cells/mL and were grown at 37°C and 5% CO_2 under constant agitation (120 rpm).

2.3.5. pH monitoring in 6 well plates

Cell cultures were inoculated at a cell concentration of 0.2×10^6 cells/mL and grown at 37°C and 5% CO_2 under constant agitation (120 rpm) in 6-well plates with integrated pH sensors (HydroDish®, PreSens-Precision Sensing GmbH, Germany).

2.3.6. Fed-batch cultivation

For fed-batch cultivation in shake flask or bioreactor, cells were seeded at a target cell concentration of 0.2×10^6 cells/mL in BalanCD (Irvine) chemically defined medium supplemented with 8 mM glutamine, 0.1% Kolliphor® and 2% (v/v) anti clumping agent (Gibco). Samples were taken daily to measure the cell density and nutrient/metabolite concentrations. Once the analyses completed, addition of CHO CD EfficientFeed™ B (Gibco) supplemented with 40 mM of glutamine was performed on a daily basis. The daily feeding volume is calculated according to the cell specific consumption of glucose:

$$\text{Feed Volume} = \frac{(R \times IVCD_{\text{predicted}}) - (C_t \times V - C_{\text{target}} \times V)}{C_{\text{feed}}}$$

Where R denotes the specific nutrient consumption rate. C_t and C_{target} are the nutrient concentration and the desired nutrient concentration, respectively. V denotes the volume of the vessel and C_{feed} represents the nutrient concentration in the feed.

2.3.7. Bioreactor

Bioreactor experiments were performed in 2 L stirred bioreactor (Labfors 4 cell, Infors HT, Switzerland) operated at a 0.6 L starting volume. Dissolved oxygen was maintained at 50% of air saturation by surface aeration using a gas mixture of oxygen/nitrogen/air with a gas flow set at 100 mL/min. When necessary, pure oxygen was sparged at 2 mL/min with an on/off controller. The temperature was maintained at 37°C with a double-wall water-jacketed. The stirring speed started at 80 rpm and was gradually increased during culture to reduce cell clumping and optimize gas transfer, until a maximum of 120 rpm. Culture pH was controlled at

7.0 by a surface gassing of CO₂ or 1 M sodium hydroxide addition. Addition of feeding medium was operated with a digital tubing pump delivering the desired feed volume at a flow rate of 280 µL/min.

2.3.8. Analytical methods

2.3.8.1. Cell count and viability, glucose, lactate, ammonium, glutamine quantification

Cell number and viability were assessed by trypan blue exclusion and counting on a hemocytometer. Samples were centrifuged and the supernatants were frozen at -80°C for subsequent analysis. The glucose, lactate and glutamine concentrations in supernatants were measured with YSI 2700 Select biochemistry analyzer (Yellow Spring, USA). Ammonia concentration was measured by the VITROS 350 (Orthoclinical Diagnostics, USA).

2.3.8.1.1. Antibody quantification

Antibody quantification in supernatants was determined by high performance liquid chromatography (WATERS Corporation, Milford, MA) using a protein A cartridge (POROS® A20 column, 2.1 mmD x 30 mmH, 104 µL, Invitrogen, Grand Island, NY). Samples were filtered by centrifugation at 8000g-11000g for 3 minutes using NANOSEP MF GHP 0.45µm centrifugal devices (PALL Life Sciences) prior to being injected on the column at a flow rate of 2 mL/min (PBS) and elution was performed using 0.15M NaCl, pH 2.0. UV detection was done at 280 nm.

2.4. Results

2.4.1. Generation of CHO clones overexpressing PYC2

The pTT18 vector encoding the yeast pyruvate carboxylase 2 gene was transfected in CHO cells stably expressing a chimeric human-llama heavy chain monoclonal antibody (EG2). 129 individual clones were assessed for their level of PYC2 expression by western blot (Figure 19 A).

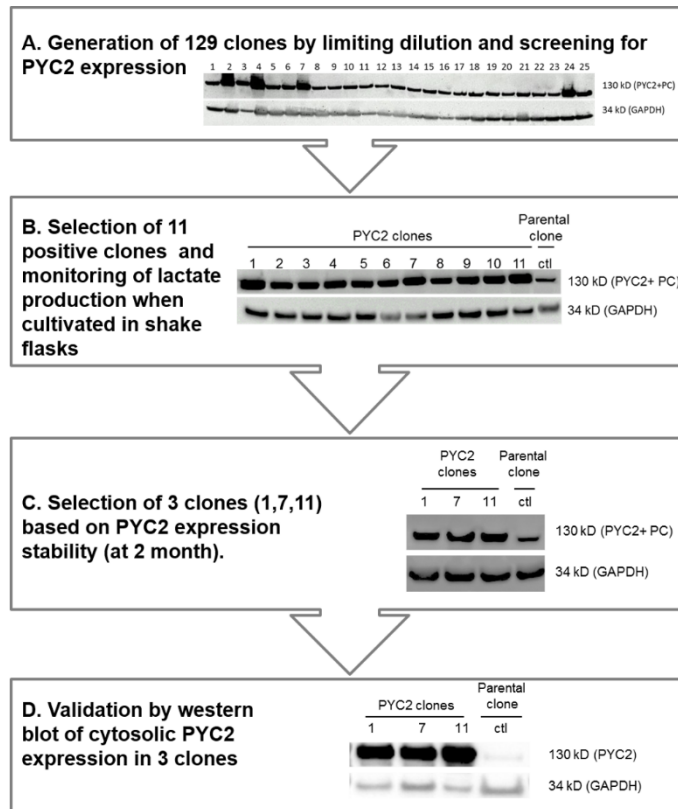


Figure 19 : Generation of a stable cell line expressing PYC2. (A) Example of western blot analysis of CHO cells transfected with the PYC2 gene. PYC2 and PC expression levels are detected using HRP-conjugated streptavidin. Lane 1: parental cell line (untransfected), lanes: 2, 4, 7, 24: PYC2 positive clones. Lanes: 3, 5, 6-23, 25: PYC2 negative clones. (B) Western blot of the 11 PYC2 positives clones chosen for batch cultivation. (C) Western blot of the 3 PYC2 clones exhibiting overexpression of PYC2 after 2 months in culture (D) Western blot analysis of PYC2 expression in the cytosolic fraction. Lanes 1-3: PYC2 positive clones. Lane 4: parental cell line (untransfected).

For the parental cell line (Lane 1), the observed signal corresponds to the presence of the endogenous pyruvate carboxylase (PC) naturally expressed in the mitochondria of cells and

which bears the same apparent molecular weight. PYC2-expressing clones (e.g., lanes 2, 4, 7 and 24 in Figure 19 A) all displayed a stronger signal reflecting the combined expression of PC and PYC2. Clones transfected with the pTT18 vector but showing a signal similar to the parental cells (e.g., lanes 3, 5, 6, 8-23 and 25 in Figure 19) were considered as negative.

Finally, 11 clones that exhibited significant PYC2 expression were selected and used for further analysis (Figure 19 B). Given that PYC2 is expected to be expressed in the cytosol (in contrast to endogenous PC that is localized in the mitochondria), a subcellular fractionation was performed on three PYC2-positive clones (clones 1, 7 and 11 from Figure 19 C) that were selected on the basis of their stable PYC2 expression for over 2 months in culture. As shown in Figure 19 D, western blot analysis revealed a signal corresponding to PYC2 that was indeed specific to the transfected clones and confirmed its proper expression in the cytosol. As expected, GAPDH expression was observed in all the cytosolic fractions.

2.4.2. Phenotypic evaluation of PYC2 clones

To rapidly assess the impact of PYC2 expression on cell growth and metabolism, 11 PYC2-positive clones were cultivated in shake flasks operated in fed-batch mode, whereby glucose was added on a daily basis to maintain a target concentration of 20 mM. Maintaining glucose in excess was used to create conditions favoring an overflow metabolism (i.e. lactate production) and to avoid limitations that could alter lactate metabolism as reported in previous studies (Altamirano et al., 2006; Martínez et al., 2013). To rule out potential effects attributable to clonal variation, the kinetics of cell growth and lactate production of the 11 PYC2-positive clones were evaluated and compared to that of the parental cell line and to 4 PYC2-negative clones that were randomly chosen to serve as negative controls. As shown in figure 20 and in striking contrast with the negative clones and the parental cells, all the PYC2-expressing clones exhibited the same altered metabolism characterized by a significant shift towards lactate consumption around day 6. Noteworthy, cell growth was not negatively impacted and most of the positive clones even reached slightly higher maximum viable cell concentrations (Figure 20).

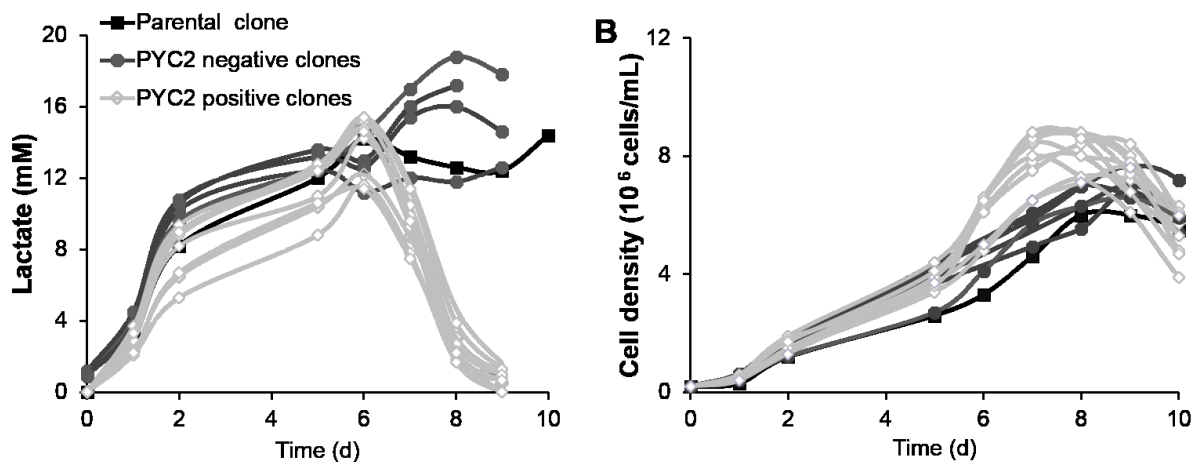


Figure 20 : (A) Lactate and (B) viable cell concentration profiles for PYC2 clones compared to PYC2 negative clones and the parental cell line cultivated in shake-flask cultures in PowerCHO2 medium.

Several studies have previously shown that the culture medium composition can strongly influence the metabolism of a given cell line, including its pattern of lactate production/consumption (Altamirano et al., 2006; Luo et al., 2012; Ma et al., 2009; Yuk et al., 2014; Zagari et al., 2013a). In order to confirm the consistency of the metabolic shift displayed by the PYC2 clones, cells were cultivated in 5 commonly used commercial media. As shown in figure 21 A, the final lactate concentrations varied depending on the culture medium, but were always consistently lower in the case of the PYC2-expressing clones compared to the parental cells. It should be emphasized that the differences observed were not the result of significant changes in cell densities, as the calculated cell specific lactate production rates were also consistently lower for PYC2 clones compared to the parental cell line (data not shown). Of salient interest, significant reductions in final ammonia concentrations (up to 50 %) were also observed for PYC2 clones in three of the five commercial media formulation tested (Figure 21 B).

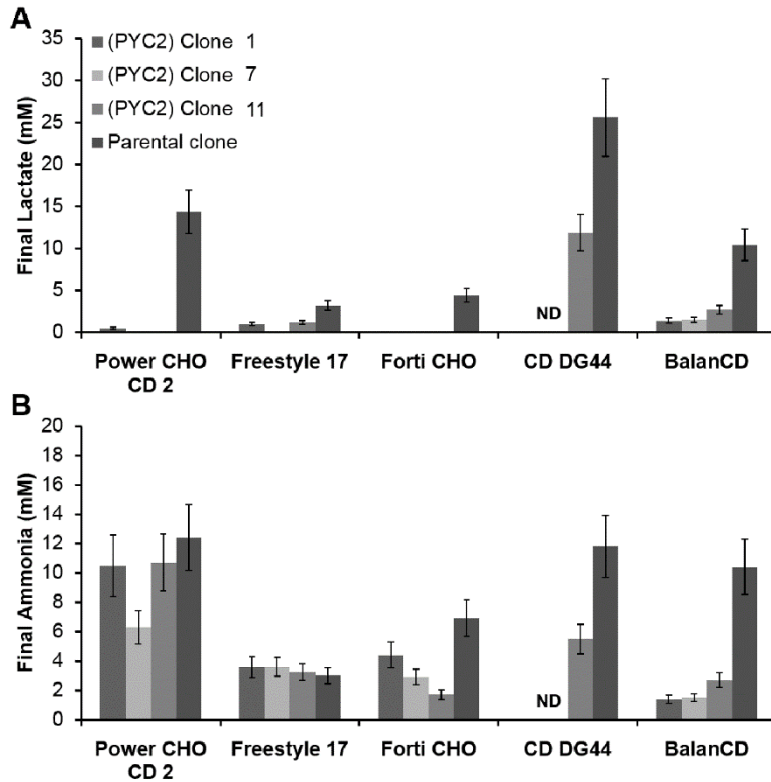


Figure 21: (A) Final lactate and (B) ammonia concentrations for PYC2 and parental cell lines cultivated in 4 different media in shake-flask cultures. Error bars depict standard deviations of the measurements. ND: medium not tested for clones 1 and 7.

Lactate accumulation and the consequent medium acidification in uncontrolled flask cultures can be detrimental to the cells and/or the product quality. We therefore investigated the impact of PYC2 expression on the evolution of pH. To that end, cells were cultivated in batch mode in a 6-well plate and pH was monitored using a sensor dish reader (SensorDish®). The recorded pH signals are presented in Figure 22 and clearly demonstrate that the acidification of the medium is significantly reduced in cultures performed with PYC2 clones.

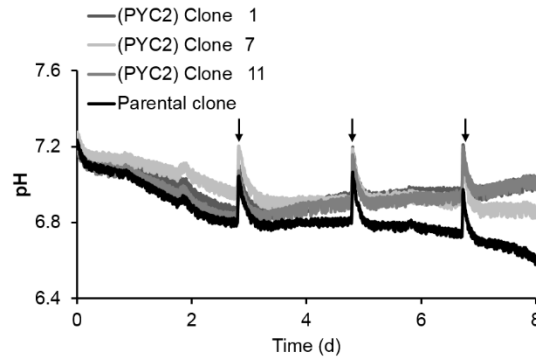


Figure 22: Evolution of pH for the parental cell line and 3 PYC2 positive clones cultivated in 6 wells plates equipped with pH sensors (HydroDish®). The 3 pH peaks indicated by arrows correspond to sampling of the cultures.

2.4.3. Batch and fed-batch cultivations in shake flasks

In order to assess the potential of PYC2 clones for fed-batch applications, cells were cultivated in shake flasks under batch and fed-batch modes using the BalanCD medium, which yielded the highest cell density in shake flask batch cultures. Clone #11 was used in all the subsequent experiments in shake flask and bioreactor cultures. The resulting cell density profiles are shown in Figure 23 A for both the parental and PYC2-expressing cells. When cultivated in batch mode, the growth curves differed markedly between both cell lines. The PYC2 cell line reached a maximum cell concentration of about 1×10^7 cells/mL, a nearly two-fold increase compared with the parental cells. The maximum cell specific growth rates were also fairly different for the two cell lines (0.033 and 0.023 h^{-1} for the PYC2 and the parental clones, respectively) and the exponential phase of the PYC2 clone was extended by more than 24 hours. Upon reaching their maximum cell density on day 6, the PYC2 cells exhibited a sharp decrease in viable cell concentration thereafter (Figure 23 B). This sudden drop in cell viability was most likely due to a key nutrient depletion given the high cell density reached in these batch cultures. When grown in fed-batch, the PYC2 cells had a similar cell specific growth rate (0.032 h^{-1}), but the feeding strategy allowed to maintain high cell densities over a prolonged period of time, as the cell viability decreased below 85 % only after day 7.

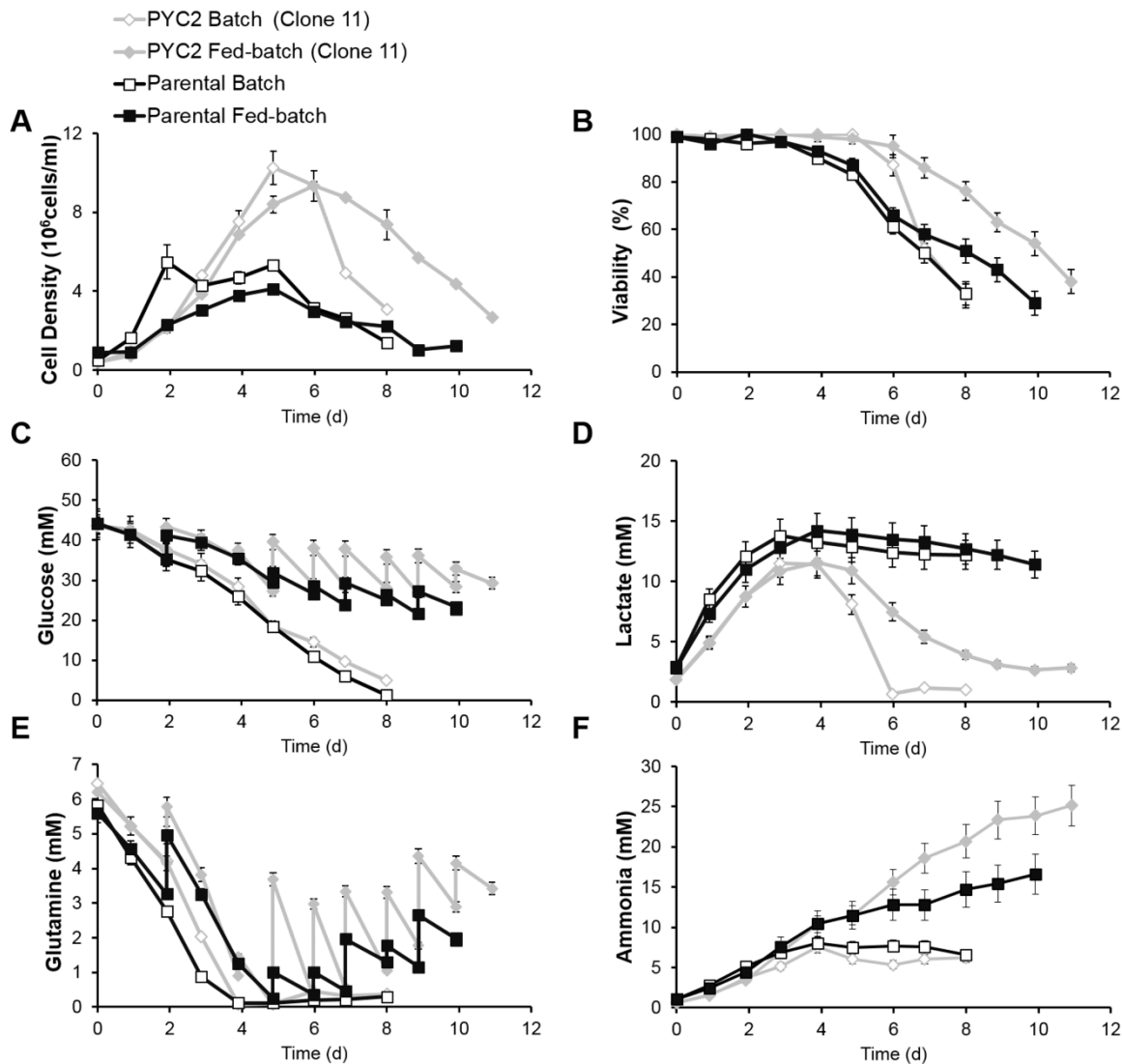


Figure 23: (A) Cell density, (B) cell viability, (C) glucose, (D) lactate, (E) glutamine and (F) ammonia concentration profiles during batch and fed-batch cultivations of parental and PYC2-expressing cells in shake-flask cultures. Error bars depict standard deviations of the measurements.

In contrast, the same feeding regime had only marginal impact on the growth and viability of the parental cells (Figures 23 A & B) compared with the batch mode. Batch cultures were characterized by a nearly total depletion of glucose by day 8 for both PYC2 and parental cells (Figure 23 C), while the fed-batch strategy allowed to maintain glucose around the target concentration of 35 mM. Noteworthy, despite those elevated glucose concentrations, the PYC2 clone exhibited the same altered lactate metabolism witnessed in batch (Figure 23 D). A

comparison of the main cell specific consumption and production rates evaluated during the exponential and the stationary phases is presented in Table 3. In batch and fed-batch cultures, only slight reduction in the glucose specific consumption rates were observed for PYC2 cells, but marked differences were noted for lactate as the specific production was reduced by 50% during the exponential phase. The differences were even greater during the stationary phase, as lactate was significantly consumed by PYC2 cells, unlike in the parental cell line (Table 3). As evident from the calculated lactate/glucose ratios, the PYC2 clone exhibited a much more efficient glucose utilization.

Table 3 : Cell specific consumption/production rates in shake flask cultures.

	Batch		Fed-batch	
	PYC2	Parental	PYC2	Parental
Exponential phase				
Q _{glucose} (pmol/cell.d)	1.00 ± 0.17	1.24 ± 0.21	1.18 ± 0.19	1.65 ± 0.30
Q _{glutamine} (pmol/cell.d)	0.35 ± 0.06	0.37 ± 0.07	0.47 ± 0.08	0.53 ± 0.09
Q _{lactate} (pmol/cell.d)	0.46 ± 0.06	0.98 ± 0.18	0.54 ± 0.09	1.18 ± 0.21
Q _{ammonia} (pmol/cell.d)	0.57 ± 0.10	0.86 ± 0.18	0.93 ± 0.20	1.31 ± 0.28
Lac/glu ratio	0.46	0.79	0.46	0.72
Amm/gln ratio	1.63	2.32	1.98	2.47
Stationary phase				
Q _{glucose} (pmol/cell.d)	0.69 ± 0.10	1.19 ± 0.21	1.42 ± 0.24	1.73 ± 0.29
Q _{glutamine} (pmol/cell.d)	---	---	0.27 ± 0.05	0.31 ± 0.05
Q _{lactate} (pmol/cell.d)	-0.36 ± 0.06	-0.05 ± 0.01	-0.15 ± 0.03	-0.03 ± 0.01
Q _{ammonia} (pmol/cell.d)	---	---	0.41 ± 0.09	0.36 ± 0.08
Lac/glu ratio	-0.52	-0.04	-0.11	-0.02
Amm/gln ratio	---	---	1.52	1.16

In batch cultures, glutamine depletion occurred rapidly (by day 4), but the average cell specific glutamine consumption rates were not significantly different for the two cell lines (Figure 23 E & Table 3). The supplementation of glutamine in fed-batch cultures led to an increased consumption rate and greater ammonia accumulation, particularly for the PYC2 clone due to the greater cell density and the prolonged culture. While the specific productions were

quite similar during the exponential phase, both cell lines showed a decreased production of ammonia per cell during the stationary phase (Table 3). Whether the cultures were performed in batch or fed-batch modes, the final product titer in cultures with PYC2-expressing cells was 35% greater compared to the parental cell line (Figure 25). This augmentation can be attributed to both the increased cell density and the prolonged culture longevity associated with PYC2 expression. The cell specific productivity of PYC2-expressing cells was comparable in batch and fed-batch modes (1.91 ± 0.40 and 2.02 ± 0.44 pg/cell d, respectively), while that of the parental clone increased from 1.69 ± 0.35 pg/cell d in batch to 2.69 ± 0.54 pg/cell d in fed-batch. Compared to the parental cell line, the slightly lower cell specific productivity of the PYC2 clone is largely compensated by the increased cell growth.

2.4.4. Fed-batch cultivation in bioreactor

The sharp and sudden viability decrease witnessed in shake flasks suggested that these uninstrumented culture conditions could not support the high cell densities reached by PYC2 cells (around 1×10^7 cells/mL). Cells were thus cultivated under fed-batch mode using fully controlled bioreactors so as to provide better regulated conditions in terms of pH and oxygen. The feeding strategy consisted in the daily addition of a concentrated solution (CHO CD EfficientFeed B) supplemented with 40 mM of glutamine. The resulting cell density profiles are shown in Figure 1.6A. The PYC2 cell line reached a maximum cell concentration of about 1.3×10^7 cells/mL, a more than 2-fold increase compared with the parental cells. The maximum cell specific growth rates were fairly similar for the two cell lines (0.023 and 0.024 h⁻¹ for the PYC2 and the parental clones, respectively), but the exponential growth phase was extended by 3 days in the case of the PYC2 clone. Upon reaching their maximum in concentration between days 9 and 12 (13×10^6 cells/mL), there was a sharp decrease in viable cell density, similar to the trend observed in small-scale cultures (Figure 24 B). Since the dissolved oxygen set-point was successfully maintained at around 50% throughout the culture, this was likely due to some other nutrient limitation.

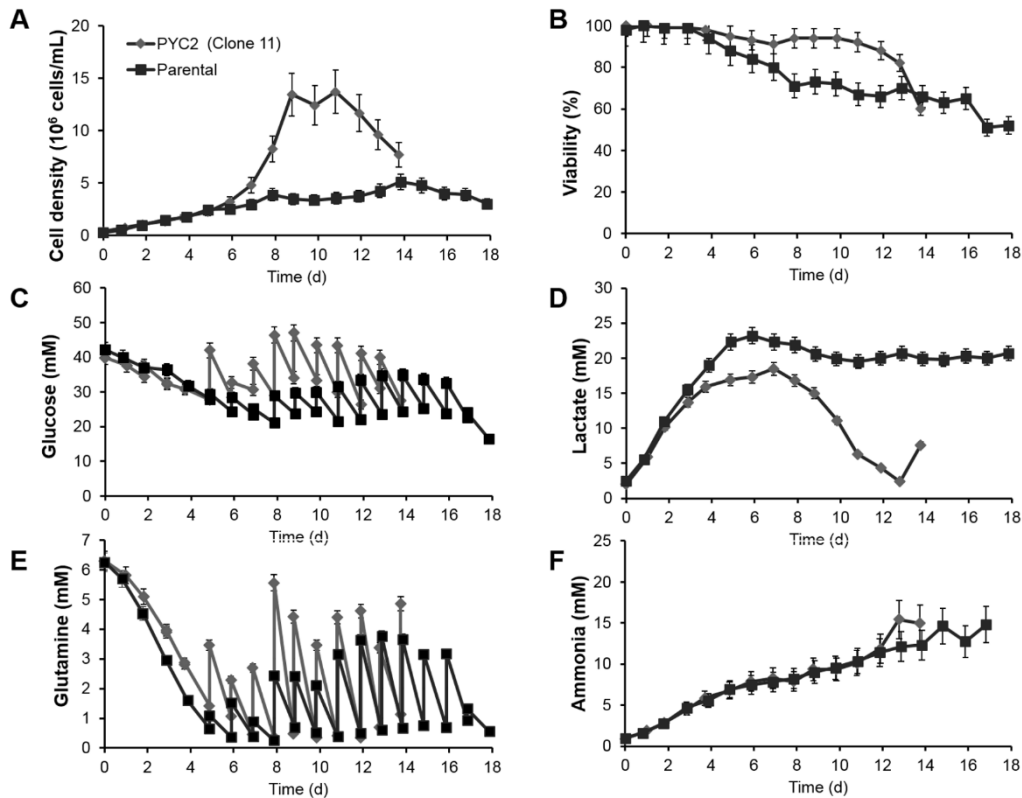


Figure 24: (A) Cell density, (B) cell viability, (C) glucose, (D) lactate (E) glutamine and (F) ammonia concentration profiles fed-batch cultivations of parental and PYC2 expressing clones in bioreactor cultures. Error bars depict standard deviations of the measurements.

As was observed in shake flask cultures, the expression of the PYC2 gene led to a significant alteration of the cell metabolism, with lactate being consumed after 7 days of cultivation despite elevated glucose concentration (Figure 24 C & 24 D). The greater nutrient utilization efficiency of the PYC2 cell line was even observed during the exponential phase, as the cell specific lactate production rate was reduced by 80 % for a comparable glucose uptake rate (Table 4). PYC2 expression did not significantly impact the glutamine metabolism, and, as a result, the cultures achieved similar final levels of ammonia (Figure 24 E & 24 F), although the specific ammonia production rate of the PYC2 clone was lower (Table 4).

Table 4 : Cell specific consumption/production rates in bioreactor cultures.

	Exponential phase		Stationary phase	
	PYC2	Parental	PYC2	Parental
Q _{glucose} (pmol/cell.d)	2.46 ± 0.42	2.49 ± 0.44	1.57 ± 0.27	2.06 ± 0.33
Q _{glutamine} (pmol/cell.d)	0.75 ± 0.12	1.18 ± 0.20	0.44 ± 0.08	0.56 ± 0.09
Q _{lactate} (pmol/cell.d)	0.43 ± 0.07	2.34 ± 0.41	-0.17 ± 0.03	0.24 ± 0.04
Q _{ammonia} (pmol/cell.d)	0.31 ± 0.05	1.11 ± 0.18	0.19 ± 0.03	0.24 ± 0.02
Lactate/glucose ratio	0.17	0.79	-0.11	0.11
Ammonia/glutamine ratio	0.41	0.94	0.43	0.82

Consistent with small-scale fed-batch results, the average cell specific antibody production rates were slightly lower for the PYC2 clone (2.21 ± 0.45 and 2.86 ± 0.58 pg/cell d for PYC2 and parental cells), but the final product titer was augmented by 28% due to the higher cell density achieved (Figure 25). Of interest, the maximum volumetric titer was reached 4 days earlier in cultures with the PYC2 cells. While the fed-batch strategy brought only a slight antibody volumetric productivity improvement in shake flasks, cultures in bioreactor improved by around 30 to 40% the volumetric production of PYC2 and parental cell lines, respectively.

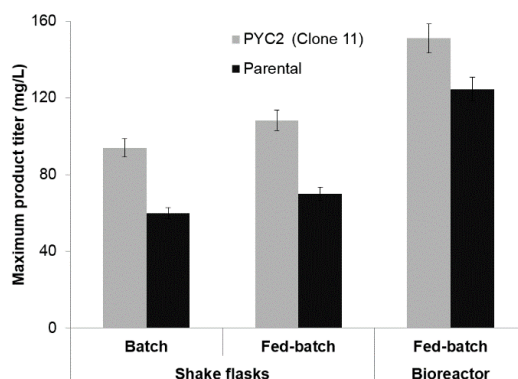


Figure 25 : Comparison of maximum antibody titers between parental and PYC2-expressing cells cultivated in shake flasks and bioreactors. Error bars depict standard deviations of the measurements.

2.5. Discussion

The aim of this work was to generate a PYC2-expressing CHO cell line with an improved metabolic efficiency and demonstrate its potential for the development of a fed-batch process for antibody production. In any metabolic engineering strategy, clonal variations should be considered when trying to assess the real impact of gene overexpression. Clone-based studies often fail to establish a relationship between transgene expression and the desired trait. In the specific case of lactate reduction strategies, a variety of other factors may cause differences in metabolic phenotypes, such as changes in the medium composition (Kishishita et al., 2015; Luo et al., 2012; Zagari et al., 2013a). In our study, we have initially compared the kinetics of growth and metabolite formation of 11 PYC2-positive, 4 PYC2-negative and the parental clones. The fact that all 11 PYC2-positive clones exhibited comparable phenotypes when tested in different media formulation provided strong evidence that the differences observed were due to PYC2 expression and not to clonal variations.

The PYC2 expressing CHO cells that were generated displayed a much more efficient metabolism characterized by a lower lactate/glucose ratio, especially in fed-batch cultures using an enriched nutrient solution. More importantly, the slightly lower cell specific antibody production of the PYC2 clone is largely compensated by the increase in maximum cell density, translating into a net gain in volumetric productivity. PYC2 expressing cells maintained their distinctive phenotype, even when exposed to high glucose levels during fed-batch cultures. In addition, the cell specific productivity is not significantly altered by the metabolic modification, as was previously observed when the same gene was overexpressed in HEK293 cells producing interferon in batch (Henry and Durocher, 2011) or fed-batch (Vallée et al., 2013) cultures. In contrast with our results, an apparent two fold increase in specific productivity was observed in PYC2 transfected BHK-21 cells producing recombinant EPO, although these cells were cultivated in perfusion mode under limiting glucose conditions (Irani et al., 2002). However, no positive impacts were observed in terms of maximum cell density and cell specific growth rate. Similarly, a 2-fold increase of specific hGM-CSF productivity was noted for CHO cells expressing PYC2 cultivated in batch and following a temperature switch (Fogolín et al., 2004). The cell specific growth rate and maximum cell density were reduced, but culture longevity was extended leading to a rise in final product titer. In an earlier study, HEK293 expressing PYC2

showed no significant increase in SEAP titer in spite of increase cell longevity and reduced waste production (Elias et al., 2003). Similarly, a decrease in the specific antibody productivity was found for CHO cells expressing PYC2, even though the cell growth rate and glucose/lactate ratio were improved (Wilkens and Gerdtzen, 2015). Taken together, these results indicate that the effects of PYC2 expression are dependent on the cell type and the culture conditions. In the present study, the greatest impact of PYC2 expression in CHO cells was on the maximum cell density attained during the cultures. Results from our shake flask and bioreactor cultures in fed-batch mode showed that the increase in cumulative viable cell concentration, combined with the maintenance of antibody specific productivity, resulted into a net increase in the final volumetric titer.

In the transition from small-scale to bioreactor, the metabolism and growth of the PYC2 clone remained mostly similar, but the product titer increased substantially. This titer improvement can likely be attributed, at least in part, to tightly regulated conditions in the bioreactor. In the case of PYC2 cells, regardless of the culture mode (batch or fed-batch) or culture device (shake flask or bioreactor), the lactate shift seemed to occur systematically 24 hours before reaching the maximal cell density, as the cells entered the deceleration phase. For the parental CHO cell line, the net accumulation of lactate ceased when cell growth stopped. In either of the two cell lines, these results suggest a link between a certain lactate level, growth rate reduction and lactate production shutdown. In the case of cells expressing PYC2, the enzyme could have an additive effect leading to a net lactate consumption due to the competition for pyruvate between this enzyme and lactate dehydrogenase (Irani et al., 1999). Lactate consumption has been reported to occur under low glucose concentrations (Altamirano et al., 2004; Cruz et al., 2000; Ozturk et al., 1992) or under non-limiting levels (Luo et al., 2012; Ma et al., 2009; Mulukutla et al., 2012; Ozturk et al., 1997; Pascoe et al., 2007). The co-consumption of lactate and glucose was identified as a highly desirable trait for industrial cell lines, since it is typically associated with increased culture longevity and greater product yields (Le et al., 2012). This phenomenon and its underlying physiological mechanisms are still not fully understood and, consequently, not yet well-controlled. Recently, some studies have suggested that the copper level in the culture medium could be a trigger of lactate consumption (Luo et al., 2012; Yuk et al., 2014), but other factors have also been associated to this metabolic shift,

including an increase in oxygen consumption, a reduction of glycolysis and glutaminolysis, as well as cell growth slowdown (Luo et al., 2012; Ma et al., 2009; Mulukutla et al., 2012; Pascoe et al., 2007).

Studies on BHK-21 expressing PYC2 have reported increases in oxygen uptake and intracellular ATP pool, pointing to an enhanced TCA activity resulting from this genetic modification (Irani et al., 1999). More recently, ¹³C metabolic flux analysis conducted on HEK293-PYC2 expressing cells confirmed an increase in the pyruvate flux to oxaloacetate (Henry and Durocher, 2011), although this intermediate metabolite can subsequently have multiple fates. First, in the cytosol, the latter can be accumulated or could be converted into malate through cytosolic malate dehydrogenase (MDH) with the concomitant release of NAD⁺. Then the malate can be recycled into pyruvate via cytosolic malic enzyme or enter the mitochondria via the malate/aspartate shuttle to be completely oxidized in the TCA. A previous study on CHO cells expressing mitochondrial MDH II reported enhanced glycolysis, reduced lactate secretion and elevated intracellular ATP/NADH levels along with antibody titer improvement (Chong et al., 2010). These findings suggest a critical role of the redox balance in the regulation of the glycolytic flux and the proportion of pyruvate entering the TCA. The capacity of the LDH reaction to regenerate NAD⁺ allows to maintain high glycolytic rates, decreasing the availability of cytosolic pyruvate as a substrate for the TCA cycle. The malate-aspartate shuttle plays a pivotal role in maintaining the redox balance by allowing the regeneration of NAD⁺ in the cytosol. In CHO cells, overexpression of aralar1, an aspartate/glutamate carrier and critical component of the malate-aspartate shuttle, was shown to promote a metabolic switch to lactate consumption without any reduction of the glycolytic rate (Zagari et al., 2013b). For PYC2 overexpression, it can be speculated that the reduction in the LDH flux is likely compensated by an increase in the malate dehydrogenase flux to maintain the redox balance.

The distinctive phenotype of PYC2-expressing CHO cells can provide additional benefits in the context of the development of a cell culture manufacturing process. First, it is well known that glycosylation pattern of glycoproteins can be negatively altered by elevated waste product accumulation (Andersen and Goochee, 1995; Gawlitzek et al., 2000; Yang and Butler, 2002). Since significant lactate/ammonia accumulation is likely to occur in standard high

cell density fed-batch cultures, the lower waste metabolite formation obtained in PYC2 cells could be expected to enhance final product quality and stability in the culture medium, but further work is required to assess the impact of PYC2 overexpression on product quality attributes. Furthermore, this phenotypic change eliminates the need to control glutamine/glucose at low levels, strategies which make process operation more complex and also have adverse effects on the glycosylation profile of the protein of interest (Liu et al., 2014). Second, it is generally recognized that small-scale studies performed in shake flasks during process development may not translate well to bioreactor during scale-up, particularly due to lactate accumulation. Given that the pH changes are damped with PYC2-expressing cells, this represents another significant advantage to streamline the optimization of culture conditions.

2.6. Conclusion

We have demonstrated that PYC2 expression in CHO cells can efficiently alter their metabolism and induce a desired shift towards lactate consumption that was shown to occur consistently in all culture modes and commercial media tested. Given the marked reduction in waste metabolite formation, the results presented here demonstrate that PYC2 cells are well suitable for fed-batch process employing concentrated feed solutions. Indeed, a simple feeding strategy based on glucose consumption was able to substantially increase culture growth and longevity and lead to a significant improvement of the volumetric titer. Since the cell specific productivity of PYC2 clones was marginally reduced compared to the parental cells, this enhancement was attributable to the significant increase in maximum cell density. Further improvement could potentially be achieved by screening key culture supplements or process conditions leading to increased culture longevity and/or stimulating the cell specific productivity (e.g. mild hypothermia conditions).

Acknowledgements

The authors would like to thank the following contributors: Louis Bisson for performing protein A analysis and Prof. Mario Jolicoeur (Canadian Research Chair on the development of metabolic engineering tools) for granting access to the bioreactors employed in this study. This work was supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) MabNet Strategic Network. This is NRC publication #NRC-HHT 53305.

Chapitre 2 : Le devenir du lactate métabolisé par les cellules CHO

1. Mise en contexte

L'étude précédente a mis en évidence le phénotype distinctif des cellules PYC2, qui se caractérise par une consommation de lactate pendant la phase stationnaire de croissance, associé à une augmentation significative du titre final en anticorps. Dans le but de déterminer les profils métaboliques liés à ce phénotype, nous avons réalisé une étude comparative des flux métaboliques intracellulaires s'opérant dans les cellules PYC2 et parentales en portant particulièrement notre intérêt sur le métabolisme du lactate. Les cellules PYC2 et parentales ont donc, été cultivées en présence de 3[¹³C] lactate et l'analyse de l'enrichissement isotopique de plusieurs métabolites a permis de déterminer le devenir du lactate métabolisé par ces cellules. Notre analyse de flux montre que dans les cellules parentales la glycolyse et la production de lactate sont relativement similaires entre la phase exponentielle et stationnaire de croissance, alors que les flux liés au cycle des acides tricarboxyliques diminuent. Par contre, les cellules PYC2, fortement productrice d'anticorps, montrent une l'activité glycolytique qui diminue au cours du temps associée à une augmentation des flux du cycle des acides tricarboxyliques et une consommation de lactate.

2. The fate of lactate metabolized by CHO cells

Cécile Toussaint ^{a,b}, Olivier Henry ^c, Yves Durocher ^{a,b,*}

^a Département de biochimie et médecine moléculaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

cecile.toussaint@umontreal.ca

^b Life Sciences, NRC Human Health Therapeutics Portfolio, Building Montreal-Royalmount, National Research Council Canada, Montreal, QC H4P 2R2, Canada

yves.durocher@nrc-cnrc.gc.ca

^c Département de Génie Chimique, École Polytechnique de Montréal, C.P. 6079, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3A7, Canada.

olivier.henry@polymtl.ca

Article in preparation

Keywords: CHO, ¹³C-MFA, pyruvate carboxylase, central carbon metabolism, lactate

2.1. Abstract

CHO cells constitute the prominent expression system for the large-scale manufacturing of recombinant proteins. In culture, mammalian cells can undergo significant metabolic changes as they transition from the growth to the stationary/production phase. Highly proliferating cells displaying a glycolytic phenotype at the beginning of a culture usually shift towards a more oxidative state as cell growth slows down. CHO cells will sometimes exhibit a net lactate consumption during the stationary phase, a metabolic behaviour often associated with high production yields. To shed more light on the intricate links between lactate metabolism, cellular growth and culture productivity, we have performed a comparative metabolic analysis of an antibody producing CHO cell line and a derivative clone stably expressing the PYC2 that displays a greatly enhanced nutrient utilization efficiency. In an effort to elucidate the contribution of lactate in the central carbon metabolism, both cell lines were grown in the presence of 3-^{[13}C] lactate and the intracellular fate of this metabolite was analyzed by

measuring the isotopic enrichment of several intracellular species by mass spectrometry. Our analysis revealed that, in parental cells, glycolytic fluxes and lactate production were relatively maintained during the exponential and stationary phases, while TCA fluxes were significantly decreased when cell proliferation stopped. In contrast, during the transition toward stationary phase, PYC2 cells displayed a reduced glycolytic activity, concomitant with a net lactate consumption and increased TCA fluxes. This distinct metabolic behaviour was correlated with an increase in final volumetric productivity.

2.2.Introduction

Over the past decades, CHO cells have been extensively used for the industrial production of therapeutic antibodies. Continuous efforts to improve fed-batch bioprocesses have led to antibody titers in excess of 5 – 10 g/L (Kunert and Reinhart, 2016). One of the major obstacles to ensure high product yield and quality in fed-batch cultures is related to the intrinsic characteristic of mammalian cells metabolism that causes the accumulation of metabolic by-products, mainly lactate and ammonia, in the culture environment. Several strategies have been developed to reduce lactate accumulation in CHO cells, such as nutrient substitution (Altamirano et al., 2006; Altamirano et al., 2000; Altamirano et al., 2004; Kurano et al., 1990), pH control (Gagnon et al., 2011) or applying dynamic feeding regime to maintain low substrate levels (Chee Fung Wong et al., 2005). Metabolic engineering approaches using siRNA against lactate dehydrogenase A enzyme was shown to greatly lower the production of lactate (Jeong et al., 2006; Kim and Lee, 2007a; Zhou et al., 2011). Our previous study showed that the expression of cytosolic pyruvate yeast carboxylase 2 (PYC2) in CHO cells systematically led to a net lactate consumption during the stationary phase (Toussaint et al., 2015). Interestingly, this metabolic behaviour is found in the majority of high-producing cell clones employed in industry for large-scale manufacturing (Le et al., 2012b). Although lactate consumption is abundantly reported in the literature, the physiological mechanisms regulating the occurrence of this phenomenon are still not well understood. Numerous factors have been associated with a shift in lactate metabolism in CHO cells, such as copper concentration in the culture medium (Luo et al., 2012; Xu et al., 2016; Yuk et al., 2014), glycolysis rate (Tsao et al., 2005), increased mitochondria oxidative activity (Zagari et al., 2013a), pH and temperature shifts (Zalai et al., 2015), medium composition (Ma et al., 2009; Zagari et al., 2013a) or amino acids feeding

(Kishishita et al., 2015). Taken together, these studies suggest that the shift to lactate consumption is closely related to the regulation of glycolysis. Among these studies, few observed an increase in antibody production concomitant with the lactate shift (Kishishita et al., 2015; Luo et al., 2012; Ma et al., 2009). Mulukutla et al., (2012, 2014, 2015) highlighted the relation between lactate consumption and AKT regulation on glycolysis enzymes such as phosphofruktokinase, pyruvate kinase and 6-phosphofruktose-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases. Briefly, these studies suggested that a lactate threshold could lead to glycolysis slowing down, even in the presence of high glucose concentration, allowing the transition from lactate production to lactate consumption when cell growth is reduced (Mulukutla et al., 2012; Mulukutla et al., 2014; Mulukutla et al., 2015). It should be emphasized that the aforementioned studies describing a metabolic shift were based on the observed lactate concentration profiles. From extracellular concentration measurements alone, it cannot be inferred if some lactate is consumed by the cells when a net production rate is observed.

Several studies have characterized the intracellular flux distribution in CHO cells during the lactate production and consumption phases using ^{13}C -metabolic flux analysis (Ahn and Antoniewicz, 2011, 2013; Dean and Reddy, 2013; Templeton et al., 2013; Templeton et al., 2014). These studies found that the exponential phase is typically characterized by a high glycolytic activity resulting in a strong production of lactate, associated to some relatively substantial fluxes through pyruvate carboxylase and malic enzyme, while the activity of the pentose phosphate pathway is generally weak. With the transition towards the stationary phase, the pentose phosphate fluxes are increased and the glycolysis, pyruvate carboxylase and malic enzyme fluxes are all reduced when lactate is being consumed. Of salient interest, the TCA was found to be more active during the stationary phase and was correlated with the peak in antibody production for CHO cells cultivated in suspension (Templeton et al., 2013). Given its impact on both cellular growth and productivity, getting a better understanding of the lactate metabolism is therefore critical for further improving cell culture processes.

In this work, we have specifically investigated the fate of the lactate metabolized by CHO cells. Using both enzymatic activity measurements and an isotopic tracer experiment, we performed a comparative metabolic study of a parental CHO cell line and a derivative PYC2-expressing clone, since the two cell lines exhibit greatly different lactate metabolism (Toussaint

et al., 2015). In contrast with previous isotopic tracer studies which were mostly performed using differently labeled glucose and/or glutamine (the two main nutrients of cell culture media), we have instead grown cells in presence of 3- ^{13}C lactate and measure the subsequent tracer distribution in different intracellular metabolites. We then performed a ^{13}C -metabolic analysis to further characterize the lactate metabolism during the exponential and stationary phases.

2.3. Materials and methods

2.3.1. Cell line

The parental CHO clone stably expressing a chimeric human-llama heavy chain monoclonal antibody (EG2) against the epidermal growth factor receptor (EGFR) (Bell et al., 2010) was established from the CHO-DUXB11 cell line (Agrawal et al., 2012). The CHO-PYC2 clone was obtained by transfection of the parental cell line with the pTT18 vector encoding the yeast pyruvate carboxylase 2 gene, as previously described (Toussaint et al., 2015).

2.3.2. Medium and culture conditions

PowerCHO chemically defined 2 medium (Lonza) supplemented with 8 mM glutamine, 0.1% kolliphore (Sigma) and 2% anti clumping agent (Gibco) was used as cultivation medium. Cultures were inoculated at a cell concentration of 0.2×10^6 cells/mL and were grown at 37 °C and 5% CO_2 under constant agitation (120 rpm).

2.3.3. Isotope labeling experiments

For conducting the isotopic tracer studies, the two cell lines were cultivated in 1 L shake flasks. On day 2 and day 5, 15 mL of each culture was harvested and transferred into a 125 mL shake flask containing 3- ^{13}C sodium lactate (Sigma Aldrich, cat# 490040) at 99% purity. For each condition tested, the amount of isotopic tracer was adjusted so that 50% of 3- ^{13}C lactate was initially present in the culture medium, the remaining fraction being the residual non-labeled lactate originating from the seed culture. Cultures without lactate addition were also performed as controls. Cultures were harvested after 6 h, 8 h, 12 h and 24 h for cell extraction to verify the attainment of isotopic pseudo-steady-state conditions (Appendix 1, Table S2).

2.3.4. Cell count and viability glucose, lactate, ammonium, glutamine quantification

Cell number and viability were assessed by trypan blue exclusion and counting on a hemocytometer. Samples were centrifuged and the supernatants were frozen at -80 °C for subsequent analysis. The glucose, lactate and glutamine concentrations in supernatants were measured with a YSI 2700 Select biochemistry analyzer (Yellow Spring, USA). Ammonia concentration was measured by the VITROS chemistry DT6 0II system (Orthoclinical Diagnostics, USA).

2.3.5. Antibody quantification

Antibody quantification in supernatants was determined by high performance liquid chromatography (WATERS Corporation, Milford, MA) using a protein A cartridge (POROS® A20 column, 2.1 mmD x 30 mmH, 104 µL, Invitrogen, Grand Island, NY, Part# 2-1001-00). Samples were filtered by centrifugation at 8000g-11000g for 3 minutes using NANOSEP MF GHP 0.45 µm centrifugal devices (PALL Life Sciences, Part# ODGHPC35) prior to being injected on the column at a flow rate of 2 mL/min (PBS) and elution was performed using 0.15 M NaCl at pH 2.0. UV detection was done at 280 nm.

2.3.6. Extracellular amino acids quantification

Amino acids were determined by HPLC using a modified version of the Waters AccQTag method. The column is a high-efficiency Nova-Pak TM (C18, 4 µm). A pre-column derivatization of the amino acids was done using AccQ.Fluor (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, or AQC), which is an N-hydroxysuccinimide-activated heterocyclic carbamate. The separated derivatives can be monitored by fluorescence detection. The standard error of the measurement using this method was routinely below 10%.

2.3.7. Determination of specific rates

The specific consumption/production rates of metabolites were obtained by dividing the cumulative amount of substrate/metabolite consumed/produced by the integral of viable cells (Adams et al., 2007). The specific antibody production rate was calculated in the same manner.

2.3.8. Intracellular metabolites extraction and LC-MS analysis

For extraction of intracellular metabolites, a minimum of 10×10^6 cells were harvested and washed with cold PBS. The cell pellets were incubated in 80% cold methanol for 30 min in dry ice. Samples were vortexed, sonicated and centrifuged at 20,000 g, 4°C for 7 min and the supernatants were collected. Pellets were then extracted a second time with 80% cold methanol and supernatants were combined with the first extraction. Samples were stored at 80°C prior to LC-MS analysis. The mass isotopomer distributions of intracellular lactate, alanine, aspartate and glutamate were measured by LC-MS. Chromatographic analysis was performed using a linear gradient on a Synergi Hydro in reverse phase Phenomenex column. The linear gradient consisted in 10 mM ammonium formate, 0.1 % formic acid (eluent A) and 90 % acetonitrile in water containing 0.1% formic acid (eluent B). The samples were resolved in 12 min. Mass spectrometry detection was performed on Synapt G2-SQTOF (Waters corporation) in negative electrospray mode without derivatization.

2.3.9. Metabolic network

The metabolic model was developed based on previously established networks for cultivated CHO cells, as well as from the information derived from the experimentally determined uptake/production rates and the mass isotopomer data. The metabolic network consisted in 46 reactions, including glycolysis, TCA cycles, main amino acids catabolism and anabolism, anaplerotic and cataplerotic reactions (Annexe 1). The cyclic pentose phosphate pathway was not considered in the model, since the tracer employed does not permit its evaluation and the main purpose of the study was to analyze the pyruvate branch point. Biomass and antibody synthesis were taken into account using overall reactions previously developed (Nolan and Lee, 2011; Quek et al., 2009) and assuming a dry cell weight of 350 pg/cell for CHO cells (Ahn and Antoniewicz, 2011; Altamirano et al., 2001). The model is

compartmentalized between mitochondria and cytosol. The reactions and the corresponding carbon atom transitions are listed in Table S1 (Annexe 1).

2.3.10. Metabolic flux analysis and statistical analysis

The ^{13}C -metabolic flux analysis was performed in Matlab using the elementary metabolite unit network decomposition method (Antoniewicz et al., 2007). The constrained nonlinear least-squares regression was performed using the built-in function “fmincon” to minimize the sum of weighted squared residuals (WSR) between measured and simulated variables. The minimization was repeated a minimum of 10 times with random feasible initial estimates of free fluxes to ensure the attainment of a global optimal solution. Validation of the fits was performed based on a standard chi-square goodness-of-fit. A sensitivity analysis was performed to determine the 95% confidence intervals of the optimized intracellular flux values (Antoniewicz et al., 2006). For statistical comparison between the intracellular fluxes calculated in the two cell lines, unpaired student t-tests were performed.

2.3.11. Enzymatic activity of pyruvate carboxylase

Pyruvate carboxylase enzymatic activity was assayed by monitoring the levels of oxaloacetate by its reaction in the presence of citrate synthase, added in excess, to form citrate and CoA. The free CoA released then reacted with 5,5'-dithiobis (acide 2-nitrobenzoic) (DTNB) to form a product which absorbs light at 412 nm. 10×10^6 cells were harvested from cultures with PYC2 and parental cells at different time points. Cells pellets were incubated in a lysis buffer containing 50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Thesit[®] (Roche), 0.5% Na Deoxycholate and 1x complete–protease inhibitor cocktail (Roche). Cell lysates were centrifuged for 20 min at 12,000 g at 4°C. Supernatants were added to a reaction buffer containing 50 mM NaHCO_3 , 5mM MgCl_2 , 0.1 mM Acetyl-CoA, 5 mM Pyruvate, 5 mM ATP, 0.2 mM DTNB and 0.2 U/mL Citrate Synthase (Sigma cat#C3260). Control were performed without pyruvate. Fluorescence was monitored with a VICTOR microplate Reader (Perkins Elmer).

2.4.Results

2.4.1. Batch cultures

PYC2 and parental cells were cultivated in batch mode in 1L shake flasks. As shown in Figure 26, the kinetics of growth, nutrient consumption and metabolite formation were initially relatively similar for the two cell lines, but changed significantly from day 4 onwards. Whereas lactate continued to accumulate in the parental clone culture, PYC2 cells started to consume lactate and grew for another 24 h to reach a maximum cell concentration of around 5×10^6 cells/mL, which was 40 % higher than the maximum cell density achieved with parental cells. Ammonia build-up was also more important in the case of parental cells. Consistent with the observed increase in biomass, the final antibody concentration was 35% higher in PYC2-expressing cells compared to the parental cell line. On day 2 and day 5, a fraction of each culture was harvested and used to seed a 125 mL shake flask containing 3- ^{13}C lactate. To allow reliable measurement of the mass isotopomer distributions, the quantity of isotopic tracer was adjusted so that the medium in each culture initially contained 50 % of labeled lactate, thereby effectively doubling the concentration of this metabolite at the beginning of the labeling experiment.

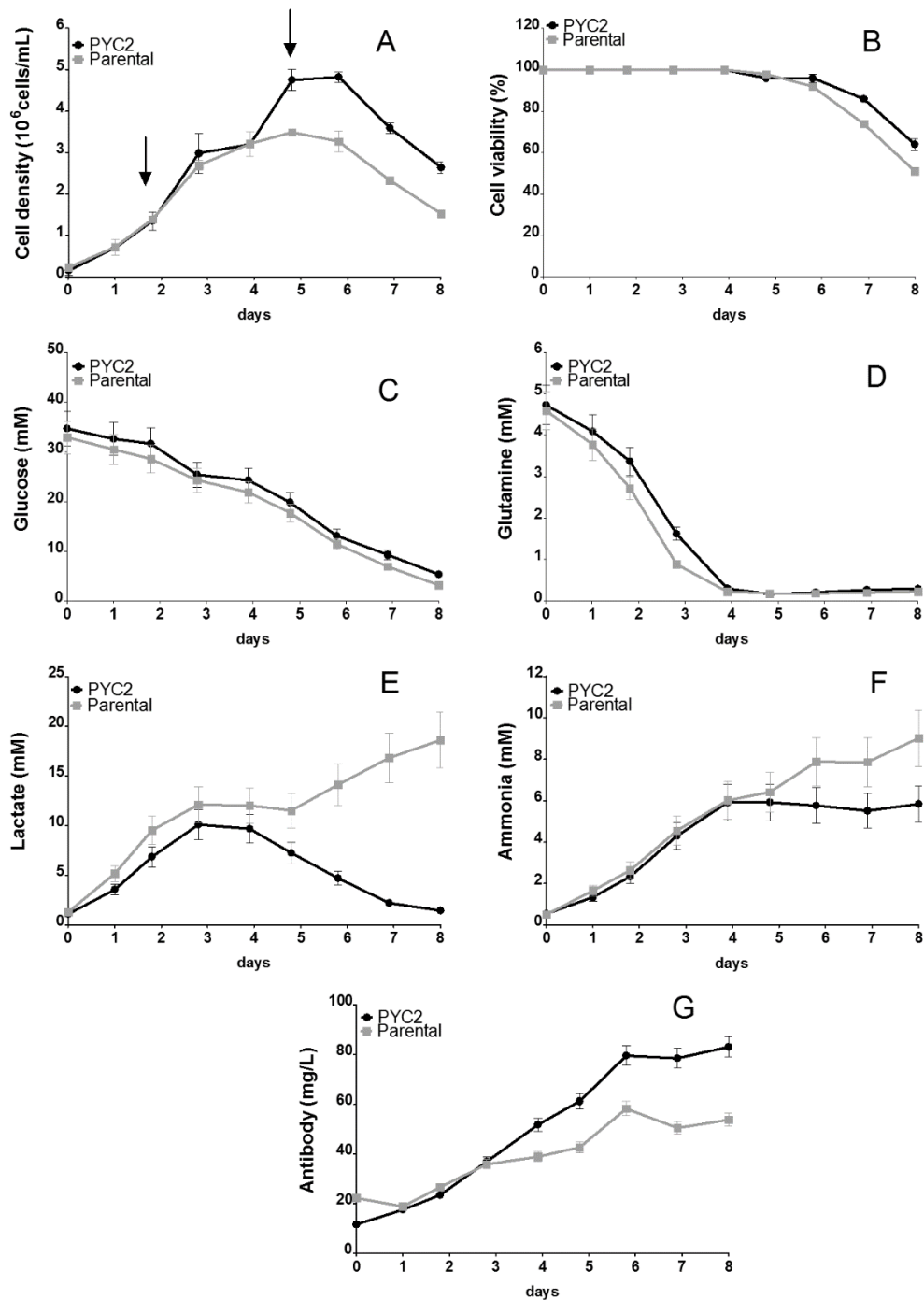


Figure 26: (A) Viable cell density, (B) cell viability, (C) glucose, (D) glutamine, (E) lactate, (F) ammonia and (G) antibody profiles of PYC2 and parental clones cultivated in shake flasks in batch mode. Arrows indicates the time at which some cells were harvested to be transferred into shake flasks containing 3-[¹³C] lactate for the labeling experiments. Error bars depict standard deviations of the measurements.

2.4.2. ¹³C-labeling experiment

During the labeling experiment, PYC2 and parental cells harvested from the exponential growth phase exhibited similar cell specific growth rates of 0.65 ± 0.13 and $0.61 \pm 0.12 \text{ day}^{-1}$, respectively. These values were not significantly different than the cellular growth rates evaluated in the 1L batch cultures at the time of harvest (0.78 ± 0.14 in PYC2 vs 0.74 ± 0.14 in parental cells). In contrast, only marginal growth was observed in labeled-containing cultures when the cells were harvested from the stationary phase (Figure 26). The measured cell specific growth rates were 0.12 ± 0.09 and $0.14 \pm 0.09 \text{ day}^{-1}$ for PYC2 and parental cells, respectively. Figure 27 presents the measured nutrient consumption and metabolite production rates of the cultures containing 3-¹³C lactate. During the exponential phase, glucose was consumed at a higher rate by PYC2 cells, which also produced slightly more lactate and ammonia compared to the parental cells. Nonetheless, PYC2 cells presented a slightly more efficient glucose utilization, as the molar ratio of lactate production over glucose consumption was lower. The glutamine uptake rates were however in the same range (Figure 27A). During the exponential phase, the parental cells were found to consume significantly more amino acids, whereas the production rates associated with secreted amino acids were generally greater in the case of PYC2 cells. As the cells entered the stationary phase, the cell metabolism was significantly modified in both cell lines (Figure 27B). The cell specific glucose consumption rate of PYC2 cells was reduced to reach a lower value to that of parental cells. Lactate and ammonia specific rates were however significantly different between the two cell lines; whereas parental cells continued to produce lactate, PYC2 cells exhibited a net lactate consumption rate. The consumption of amino acids was also drastically reduced in parental cells, as was the production of some amino acids by PYC2 cells (Figure 27B).

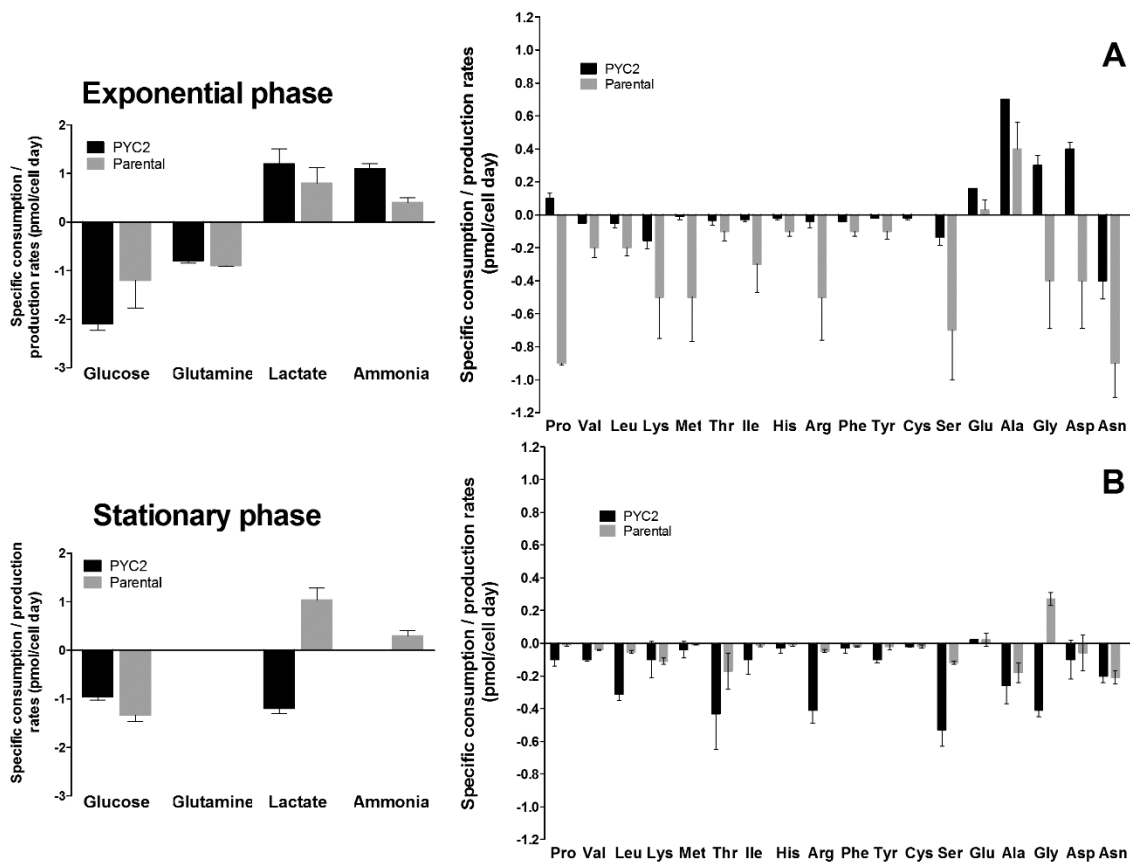


Figure 27 : Cells specific uptake of extracellular metabolites in PYC2 and Parental cell lines during (A) exponential and (B) stationary phase in cultures containing 3-[13C] lactate. Negative values indicate net consumption. Error bars depict standard deviations of the measurements.

2.4.3. Mass isotopomer distribution analysis

During the incubation of cells with 3-[¹³C] lactate, samples were collected and metabolite extraction was performed to measure the labeling pattern of intracellular lactate, alanine, aspartate and glutamate. Whether in PYC2 or parental cells, isotopic enrichment was detected in all the metabolites measured (Figure 28), even when cells were exponentially growing and a net lactate production was observed. The data provide evidence that both cell lines were metabolizing extracellular lactate, albeit at different rates. As cells approached the stationary phase, the balance is switched over to lactate consumption in PYC2 cells. A notable

labelling pattern difference was observed for alanine, as only the PYC2 clone displayed m+2 alanine (Figure 28). Alanine can be considered as an indicator of pyruvate anaplerosis, since this metabolite is produced from mitochondrial pyruvate. Pyruvate can be essentially derived from glucose, lactate or malate (via the malic enzyme). In this particular case, m+2 alanine is originating from m+3 malate, which can only be produced from m+2 oxaloacetate by the condensation of m+1 pyruvate with carbonic acid via the reaction catalyzed by the pyruvate carboxylase. Then, oxaloacetate can be condensed with m+1 acetyl CoA to enter the TCA cycle through PDH and produced m+3 malate causing the production of m+2 alanine (Buescher et al., 2015). The labeling data thus provide an early indication that the pyruvate carboxylase was more active in the PYC2 clone compared to the parental clone, both during the exponential and the stationary phases.

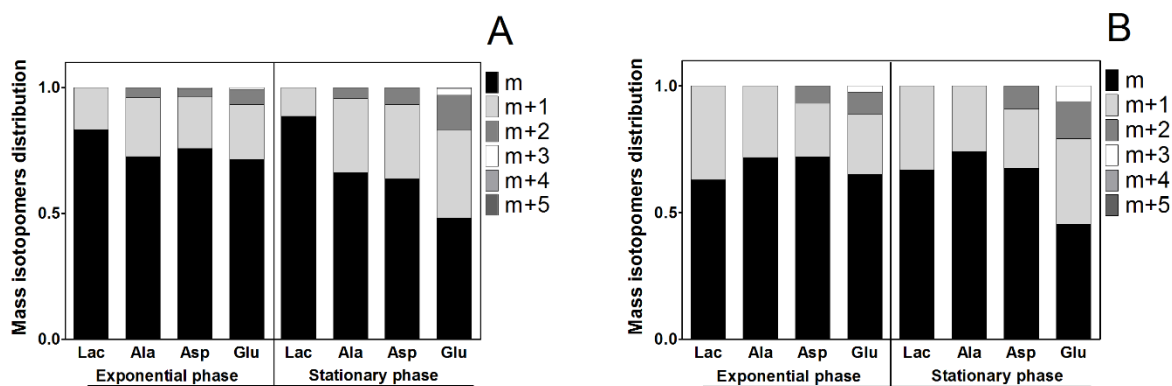


Figure 28 : Mass isotopomer distribution of intracellular metabolites measured in (A) PYC2 and (B) parental cells during the exponential and the stationary phases.

Lactate and alanine are both derived from pyruvate, but the labeling data show that these metabolites have slightly different mass isotopomer distributions. This discrepancy can be explained by the existence of two different pyruvate pools (Niklas et al., 2011), underlining the necessity to account for cell compartmentation. The labeling distribution of aspartate remained essentially constant in the parental cell line, whereas its isotopic enrichment was increased during the stationary phase in the case of PYC2 cells. The labeling of aspartate is derived from oxaloacetate and the observed differences are thus indicative of distinct TCA or pyruvate

anaplerosis activity. As various metabolites are involved in glutamate metabolism (α -ketoglutarate, proline, histidine, arginine, glutamine), differences in the mass isotopomer distributions of PYC2 and parental cells can be due to the differential contribution of each metabolic pools. The enrichment of glutamate nonetheless provides an indication of the extent of pyruvate incorporation into the TCA. Taken together, both the extracellular rates and the labeling data were indicative of significant metabolic differences between the two cell clones and between the growth and stationary phases. A ^{13}C -metabolic flux analysis was conducted in order to get a more quantitative description of these changes.

2.4.4. ^{13}C metabolic flux analysis

The measured mass distribution data from 3- ^{13}C lactate labeling experiments for both cell lines and for both growth conditions (exponential and stationary) were fitted with the same metabolic model of CHO cells. The resulting intracellular flux distribution maps are shown in Figure 29. The complete flux results at both metabolic phases are given in appendix 1 material (Tables S3 and S4), including 95% confidence intervals for all estimated fluxes.

2.4.4.1. Intracellular flux distribution during the exponential phase

During the exponential growth phase, PYC2 cells exhibited greater glycolytic fluxes compared to parental cells and pyruvate originated almost exclusively from glucose consumption in these cells. In contrast, malic enzyme and serine/glycine were found to contribute to around 30 % of the pyruvate pool in the parental clone. In line with the aforementioned distinct amino acid consumption patterns, the parental cells were characterized by greater anaplerotic fluxes, as the conversion of aspartate/asparagine into oxaloacetate and the partial oxidation of glutamine into ketoglutarate occurred at higher rates and contributed to an overall increase in TCA activity. Despite the higher glycolytic rate of PYC2 cells, a significant fraction of pyruvate was diverted to the formation of lactate and glycine/serine and consequently less pyruvate was channeled into the Krebs cycle via the pyruvate dehydrogenase. Interestingly, the pyruvate carboxylase flux was determined to be negligible in both the parental and the PYC2 cell lines during exponential growth. The conversion of pyruvate into alanine was also similar in both cell clones.

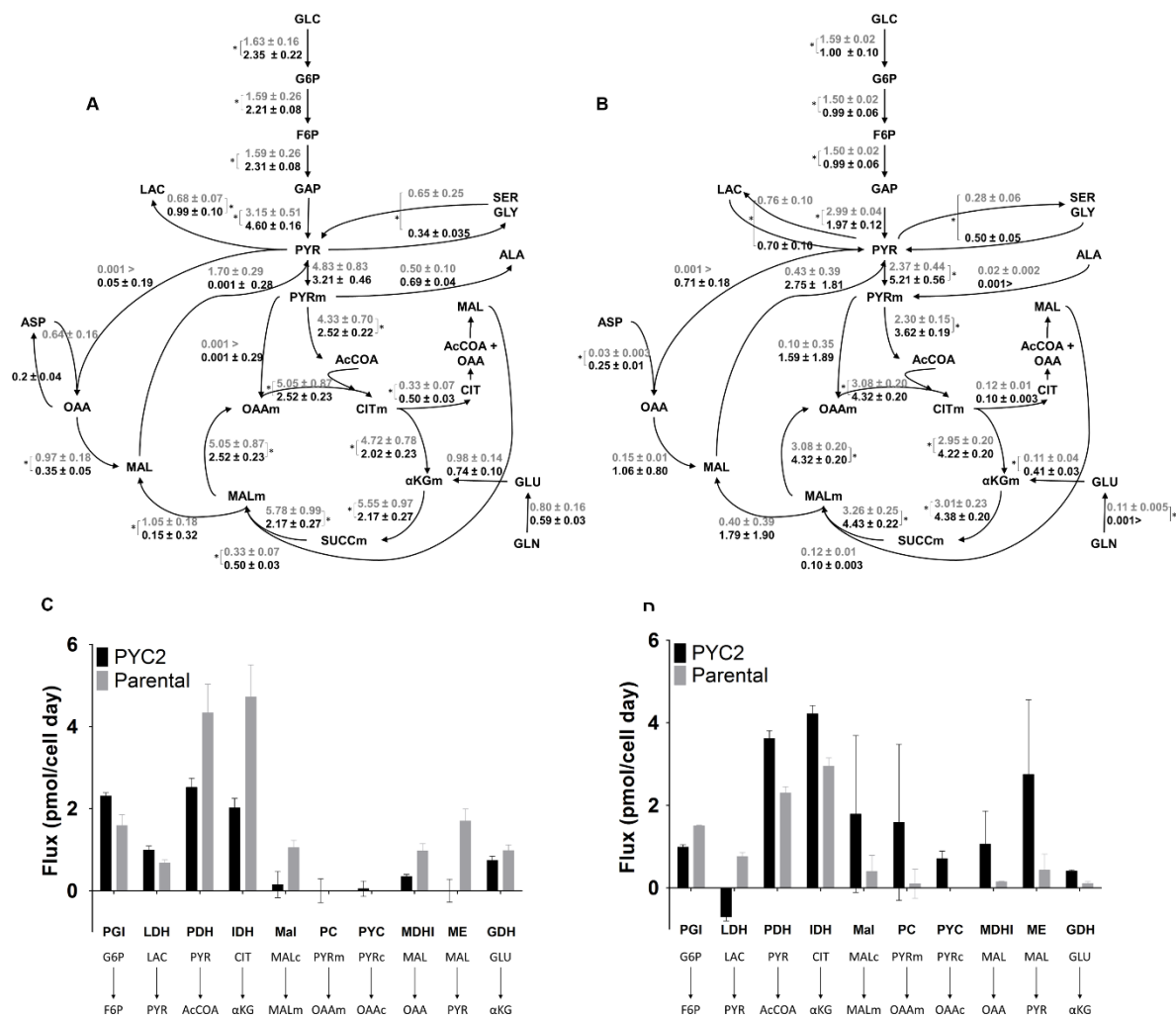


Figure 29 : Metabolic flux map of parental (grey values) and PYC2 (black values) cells line during (A) exponential growth phase and (B) stationary growth phase. Key intracellular fluxes in PYC2 and parental cell line during (C) exponential and (D) stationary phase. * indicates significance at $p < 0.05$.

2.4.4.2. Intracellular flux distribution during the stationary phase

Significant metabolic changes occurred in both cell lines when they transitioned to the stationary phase. Whereas the glycolytic rates were maintained in the parental clone, the glycolysis activity in PYC2 cells was considerably reduced. In parental cells, the flux via the malic enzyme could not be accurately determined, as evident from the large confidence interval,

but was nonetheless significantly decreased compared to the exponential phase (Figure 29). While the lactate production rate remained unchanged, the fraction of pyruvate diverted to lactate was slightly increased during the stationary phase. Amino acids (serine/glycine) that contributed to the pyruvate pool during the exponential phase were found to be produced during the stationary phase, leading to a reduced proportion of pyruvate entering the TCA. The catabolism of aspartate and glutamine also contributed comparatively less to the Krebs cycle and the flux through the pyruvate carboxylase was only marginally increased. In PYC2 cells, several outgoing fluxes observed at the pyruvate node during exponential growth were reversed during the stationary phase. Lactate and serine/glycine contributed respectively to an estimated 12 % and 8 % of the pyruvate formation. Concomitantly to the reversal of these reactions, a significant pyruvate carboxylase flux was observed, representing 10 % of all outgoing fluxes at the pyruvate branch point. As noted previously, fluxes involved in cytosolic pyruvate recycling (malic enzyme and malate transport out of the mitochondria) could not be accurately determined, but were likely more important than during the exponential phase. Since a greater proportion of pyruvate was channeled to supply the Krebs cycle, PYC2 cells exhibited an overall higher TCA activity compared to parental cells. Pyruvate dehydrogenase was found to be the preferential pathway for pyruvate incorporation into the TCA cycle, irrespective of the cell lines or the growth phases.

2.4.4.3. Pyruvate carboxylase activity measurement

Additional batch cultures were performed to measure the pyruvate carboxylase enzymatic activity over time in both cell lines (Figure 30). The measurements shown correspond to the total enzymatic activity, encompassing the cytosolic PYC2 and the mitochondrial endogenous pyruvate carboxylase. As expected, PYC2 cells displayed a higher enzymatic activity compared to the parental cell line. From the metabolic fluxes analysis, it was inferred that the flux through PYC2 was negligible during the exponential phase. However, a significant enzyme activity was nonetheless measured in the initial phase of the batch culture. This discrepancy is most likely due to the fact that enzymatic activities were measured *in vitro*, whereas the metabolic flux analysis allowed to quantify the *in vivo* reaction rates that are not only controlled by enzyme levels, but also subjected to different regulations by signalling pathways.

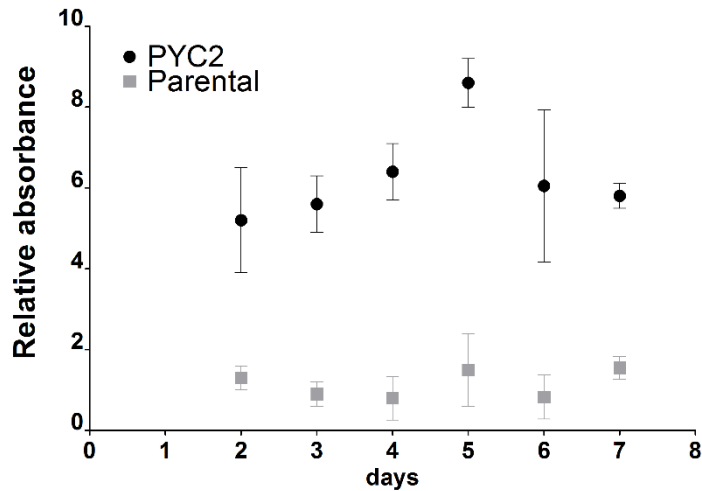


Figure 30 : Time-course of pyruvate carboxylase (mitochondrial and cytosolic) enzyme activity during batch cultures in PYC2 and parental cell.

2.5. Discussion

Lactate is one of the metabolite systematically monitored during a cell culture process. Lactate can be considered a metabolic by-product, with potentially harmful effects on cell growth and productivity, but can also serve as an alternative carbon source for the cells in culture. Lactate concentration measurements can be used as an overall indicator of the metabolic efficiency of the cells; a high molar ratio of lactate produced per glucose consumed reflects a high glycolytic rate associated with a small entry of pyruvate into the TCA cycle. In CHO cell cultures, it is common to observe a high rate of lactate production during the exponential phase, when nutrients are in excess. Lactate consumption is sometimes observed in late stage of cultivation, when cell growth decelerates. Le et al. (2012b) observed that this metabolic shift is a common trait of high-producer CHO clones and suggested that lactate consumption could be a useful indicator for clone selection. However, this metabolic shift is not systematic and the underlying mechanisms are not yet fully understood. Several groups have used ^{13}C -MFA to elucidate the distinctive intracellular flux changes that occurred when CHO cells are

transitioning from a high lactate producing state to a lactate consuming state. Most studies have reported reduced glycolytic and glutamate dehydrogenase fluxes when the cells' metabolism shift towards lactate consumption. However, there are some discrepancies related to the TCA cycle activity, which was either found to remain similar or to increase, depending on the study (Ahn and Antoniewicz, 2011, 2013; Dean and Reddy, 2013; Templeton et al., 2013). Of interest, it is often suggested that a high antibody productivity is correlated with a high TCA cycle activity during the stationary/production phase (Dean and Reddy, 2013; Templeton et al., 2013), presumably due to the increased energy requirements related to protein synthesis, folding and secretion.

In this work, we aimed to determine the metabolic contribution of the lactate consumed by CHO cells by analyzing its intracellular fate. To this end, we have characterized the fate of lactate metabolized by the cells during the exponential and stationary phases. We took advantage of the distinct phenotype displayed by PYC2-expressing CHO cells, that were shown to systematically consume lactate in many commonly used commercial media (Toussaint et al., 2015). Using 3- ^{13}C lactate as a tracer allowed us to directly analyze the contribution of this metabolite to the central carbon metabolism. The obtained mass isotopomer distributions revealed that extracellular lactate is consumed by CHO cells, even during the exponential phase when lactate is accumulating in the extracellular environment.

The obtained intracellular flux distributions indicated that, in parental cells, glycolysis and lactate dehydrogenase fluxes were relatively similar between the exponential and the stationary phases, while the TCA, malic enzyme and malate dehydrogenase I fluxes were all significantly decreased when cell proliferation stopped. In contrast, PYC2 cells exhibited high glycolytic fluxes concomitant with high lactate production and reduced fluxes in the TCA during the exponential phase. During the stationary phase, PYC2 cells were found to display a lower glycolysis activity along with lactate consumption and increase in TCA, malic enzyme and total pyruvate carboxylase fluxes. In the literature, malic enzyme and pyruvate carboxylase fluxes were reported to be generally more active in fast growing cells, and much smaller when cells are into their stationary phase. In PYC2 cells, these two fluxes were instead found to increase with the decreased in cell growth. The flux through PYC2 provides cytosolic oxaloacetate that is further converted into malate. Malate may be transported into the mitochondria to enter the

TCA cycle or converted directly in the cytosol into pyruvate via malic enzyme. Due to the choice of tracer and the available mass distribution data, some of these fluxes could not be identified properly and the resulting estimates were associated with large confidence intervals, but malic enzyme, malate dehydrogenase I and pyruvate carboxylase all seem to be increased compared to the exponential phase.

Moreover, the addition of glutamine and glucose tracers commonly used for ^{13}C -MFA do not seem to interfere with the culture parameters contrary to the addition of exogenous lactate, that could impair cell culture condition. Li et al. (2012) reported that the repeated addition of sodium lactate during cultivation caused increased osmolality and pCO_2 , which may have some inhibitory effects on cell growth. Moreover, as suggested by Mulukutla et al. (2015), it is plausible that a certain lactate threshold could induce a sudden shift in cell metabolism. While the extracellular lactate concentrations were suddenly increased by 2-fold from tracer addition in our labeling experiments, the main cell kinetics (cell specific growth rate, cell specific antibody, as well as glucose, lactate, glutamine and ammonia consumption/production rates) were not found to be significantly different in the mother 1L batch cultures (i.e. without labeled lactate addition) and the obtained flux distributions are therefore likely not significantly biased by the labeled lactate addition.

Irrespective of the cell line and growth state, our results suggest a malate efflux from the mitochondria. Chong et al. (2010) noted an accumulation of malate in the culture medium and concluded that malate dehydrogenase II could be a bottleneck in the TCA (Chong et al., 2010). The overexpression of malate dehydrogenase II led to an increase in integral viable cell density along with a decrease in malate and lactate secretion. Others have reported a net reversed flux through the malate dehydrogenase I and II during the exponential phase (Templeton et al., 2013). Recently, malate dehydrogenase II overexpression in CHO cells resulted in a higher metabolic efficiency and an lower NAD^+/NADH intracellular ratio, although cell density and antibody production were reduced compared to the control cells (Wilkins and Gerdtzen, 2015). It was suggested that an increased TCA activity would diminish the availability of acetyl-coA for other pathways, such as fatty acid synthesis, causing a cell growth reduction. In our study, the malate efflux was also found to be increased with a greater TCA activity. Moreover, malate dehydrogenase I and II are part of the malate-aspartate shuttle, which plays an important role in

the maintenance of the redox balance. This shuttle is responsible for the regeneration of cytosolic NAD⁺, which is consumed at a high rate when the rate of glycolysis is high, in fast growing cells. In the mitochondrial matrix, the shuttle allows the regeneration of NADH. The overexpression of Aralar 1, a component of the malate-aspartate shuttle, was found to favor lactate consumption in CHO cell, without altering the glycolytic fluxes (Zalai et al., 2015). The increased malate dehydrogenase I flux observed in PYC2 cells during the lactate consumption phase could be to compensate for the reversed lactate dehydrogenase flux in order to maintain the redox balance.

Enzyme activity measurements confirmed the pyruvate carboxylase-2 overexpression in the engineered cells. Surprisingly, significant PYC enzymatic activity was measured during exponential growth, whereas the labeling experiments indicated that the flux catalyzed by PYC2 was only significantly detected during the stationary phase. Wahrheit et al. (2014) also reported *in vitro* enzymatic activities that were not correlated to metabolic fluxes. In fact, *in vitro* enzyme activities most likely reflect the maximal reaction rates and, for most enzymes assayed in their study, activities were found to be higher than the *in vivo* fluxes.

2.6. Conclusion

The comparative metabolic study conducted in this work enabled us to assess the impact of the expression of PYC2 on the main intracellular flux and analyze the metabolic changes that are correlated with significant increases in antibody production and biomass. While the mechanisms underlying the shift to lactate consumption remain unclear, the redox balance is likely to play a pivotal role, as well as the different signalling pathways regulating glycolysis when cellular growth is slowed down or ceased. Further understanding of the cells response to changes in process/environmental conditions will enable the rational development of improved medium formulations and feeding protocols.

Acknowledgment

The authors would like to thank Louis Bisson and Rosa Tran for performing protein A and amino acids analysis, as well as Marie-Christine Tang and Dr. Alexandra Furtos from the chemistry department of Université de Montréal for conducting the LC-MS analysis.

Chapitre 3: Évaluation de l'impact du procédé et du génie cellulaire sur le rendement et la qualité du produit final

1. Mise en contexte

Les travaux précédents ont mis en évidence l'impact de l'expression de PYC2 sur la croissance cellulaire et la production d'anticorps. Cependant, il est essentiel que l'amélioration des rendements de production ne se fasse pas au détriment de la qualité du produit final. Au cours de ce travail, nous avons évalué l'impact relatif du procédé de culture et de l'expression de PYC2 sur le rendement et la qualité de l'anticorps. Deux types de milieux d'alimentation ont été utilisés pour la culture en mode *fed-batch* des cellules parentales et PYC2. Ces deux milieux d'alimentation ont été supplémentés ou non avec du manganèse et du galactose, deux composés connus pour leurs effets sur la glycosylation des anticorps. Les profils de glycosylation obtenus par HILIC montrent qu'entre les deux lignées cellulaires, il existe seulement des variations mineures dans le degré de galactosylation des anticorps. De plus, étant donné que les cellules PYC2 présentent un maximum de production d'anticorps plus élevé, qui est atteint plus rapidement, la récolte du produit final pourrait donc s'opérer plus précocement et potentiellement prévenir les effets délétères du temps de culture, sur la glycosylation. Notre étude montre également que le manganèse et le galactose participent à atténuer l'impact négatif de la longévité de la culture sur la glycosylation de l'anticorps.

2. Combined assessment of process and CHO cell engineering on antibody yield and quality

Cécile Toussaint ^{a,b}, Denis Brochu^c, Michel Gilbert^c, Olivier Henry^d, Yves Durocher ^{a,b}

^a Département de Biochimie et médecine moléculaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

cecile.toussaint@umontreal.ca

^b Life Sciences, NRC Human Health Therapeutics Portfolio, National Research Council Canada, Building Montreal-Royalmount, Montreal, QC H4P 2R2, Canada

yves.durocher@nrc-cnrc.gc.ca

^c Human Health Therapeutics Portfolio; National Research Council of Canada, 100 promenade Sussex, Ottawa, K1N 5A2, Canada

^d Département de Génie Chimique, École Polytechnique de Montréal, C.P. 6079, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3A7, Canada.

olivier.henry@polymtl.ca

Article en préparation

Keywords : CHO cells, pyruvate carboxylase, fed-batch, antibody, glycosylation, manganese, galactose

2.1. Abstract

To meet the needs of the growing antibody market, it is crucial to develop effective fed-batch cell culture processes that can ensure high product yield and quality. In the present study, we have assessed the relative impact of both process and cellular engineering strategies on the production yield and quality of a recombinant antibody. To this end, a PYC2-expressing cell line exhibiting an altered lactate metabolism and its parental clone were cultivated in fed-batch cultures performed using two different concentrated feed solutions, and with or without the addition of supplements known to affect product glycosylation. A comparative study of the

resulting glycan distribution profiles revealed that, despite exhibiting greatly different lactate metabolism, only minor variations in the degree of galactosylation were observed between the two cell lines. However, the faster production kinetic of PYC2-expressing cells enables an early harvest that can circumvent the adverse effects of increased culture duration on antibody glycosylation. Our study also shows that galactose and manganese supplementation can also help to mitigate the negative impact of culture longevity on antibody glycosylation.

2.2.Introduction

Since the 80s, significant advances in animal cell technologies have led to great upstream productivity improvements and manufacturing processes that can now routinely reach volumetric antibody titers in excess of 5 to 10 g/L. The biomanufacturing industry is now putting a greater emphasis on improving product quality and reduce batch-to-batch variability. Among the different critical quality attributes, glycosylation is arguably one of the most important given its impact on Fc effector functions, including antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), complement dependent cytotoxicity (CDC) and antibody dependent cellular phagocytosis (ADCP). Continuous research efforts have been undertaken to identify the main factors influencing antibody quality with the goal to better control product glycosylation during cell culture processes. Glycosylation is a complex post-translational modification involving various substrates and glycosyltransferases compartmentalized in different sub-cellular compartments. As the antibody progresses through the secretory pathway, sugars are sequentially trimmed or added to the glycan linked to the asparagine 297 on the Fc domain of the antibody. In the Golgi apparatus, glycosylation is not always fully complete and generate glycan structure-heterogeneity. In humans, the structure of IgG glycans consists for the most part in complex-type bi-antennary core-fucosylated (F) structure harboring various degrees of galactose (G) and sialic acid (S). Anumula (2012) reported that 95 % of the Fc glycans are fucosylated with the prevalent glycan structure bearing one galactose (G1F). Core-fucosylated IgG glycans displaying no or two galactoses (G0F and G2F) represent respectively 20 % and 18 % while the amount of antibody with sialylated Fc glycan is around 15 % (G2FS1 for the most part). Numerous studies have focused on the impact of IgG Fc glycosylation on their effector functions. Enhanced ADCC were reported when core-fucose residues were absent from the Fc glycans, as a result of an increased affinity for the Fc γ receptor IIIA displayed on the surface of

natural killer cells (NK) (Chung et al., 2012; Houde et al., 2010; Niwa et al., 2005; Shields et al., 2002; Yamane-Ohnuki et al., 2004). Increased galactosylation was also found to increase CDC with no impact on ADCC (Hodoniczky et al., 2005; Shinkawa et al., 2003). However, more recent studies reported that increased galactosylation improves Fc γ RIIIA binding and consequently ADCC (Houde et al., 2010; Thomann et al., 2015). The impact of sialylation on antibody functions is not fully elucidated. While increasing the sialic acid content of glycoproteins like IFN- γ and EPO was shown to improve the half-life of these proteins, it seems that is not the case for antibodies. Increasing the sialic acid content was found to have no or negative impact on ADCC (Scallon et al., 2007; Thomann et al., 2015). Several studies suggested anti-inflammatory properties of sialylated antibodies (Kaneko et al., 2006; Nimmerjahn and Ravetch, 2007) while other groups found no effect (Campbell et al., 2014; Yu et al., 2013).

The glycosylation pattern of IgG is influenced by various factors, including the cell line host, the growth medium formulation and culture conditions. The pH set-point (Borys et al., 1993) (Rivinoja et al., 2009), metabolic waste accumulation (Ha et al., 2015) and nutrient limitations (Villacres et al., 2015) were also shown to negatively impact the glycosylation state. Two major approaches have been evaluated for improving antibodies glycosylation in cell culture processes. At the process level, the impact of the addition of carbohydrate precursors (e.g. galactose, glucosamine), precursors for nucleotide-sugar donors (e.g. uridine, cytidine) or cofactors of glycosyltransferase enzymes (e.g. manganese) were extensively evaluated (Blondeel et al., 2015; Grainger and James, 2013; Gramer et al., 2011; Kildegaard et al., 2016; Villiger et al., 2016). According to these studies, the combined addition of manganese, galactose and uridine can enhance the glycosylation of IgG. While uridine supplementation can be employed to modulate protein glycosylation, it was also reported to have inhibitory effects on cell growth and antibody production (Grainger and James, 2013). Genetic engineering strategies targeting genes involved in glycosylation processes can be another effective mean to modulate antibodies quality. The knockout of FUT8 gene resulted in the generation of afucosylated antibodies. Various researches assessed the impact of α -2,6 sialyltransferase and/or β -1,4 galactosyltransferase 1 overexpression in CHO cells and reported increase in antibody galactosylation and sialylation (Onitsuka et al., 2012; Raymond et al., 2015; Weikert et al., 1999).

In this work, we have investigated the combined effect of both process and metabolic engineering strategies on the N-glycosylation state of an antibody. To this end, we have used two CHO cell clones exhibiting distinct phenotypes and performed fed-batch cultures employing two concentrated feed formulations, allowing us to infer the relative impact of these changes on the resulting antibody yield and quality. The comparative study was done with a parental CHO cell line and one clonal derivative stably expressing the PYC2 gene that is characterized by a significantly altered lactate metabolism. We have also assessed these strategies in combination with or without manganese and galactose addition, two culture supplements which are commonly employed to modulate the antibody glycosylation profile.

2.3. Materials and Methods

2.3.1. Cell lines and maintenance

The parental CHO clone stably expressing a chimeric human-llama heavy chain monoclonal antibody (EG2-hFc) against epidermal growth factor receptor (EGFR) (Bell et al., 2010) was established from the CHO-DUXB11 cell line (Agrawal et al., 2012). The CHO-PYC2 clone was obtained by transfection of the parental cell line with the pTT18 vector encoding the yeast pyruvate carboxylase 2 gene (Toussaint et al., 2015). For maintenance, cultures were inoculated at a cell concentration of 0.2×10^6 cells/mL and were grown at 37 °C and 5% CO₂ under constant agitation (120 rpm) in PowerCHO2 chemically defined medium (Lonza), supplemented with 8 mM glutamine, 0.1% Kolliphor (Sigma) and 2% anti clumping agent (Gibco).

2.3.2. Fed-batch cultures in 2L shake flasks

Cells were seeded at an initial cell concentration of 0.5×10^6 cells/mL in 185 mL culture medium. BalanCD Growth A (Irvine Scientific) chemically defined medium supplemented with 4 mM glutamine (G8540, Sigma-Aldrich), 0.1% Kolliphor P188 and 1/500 anti-clumping was used as the basal medium formulation. For fed-batch cultures, daily addition of CHO CD EfficientFeed™ B (Gibco) or BalanCD CHO Feed 12.7 (Irvine Scientific) were performed. The daily feeding volume was calculated according to the cell specific consumption of glucose to maintain a target concentration of 30 mM. During the first four days, glutamine was added up

to 1.3 mM / 10⁶ viable cells. From day 5 to the end of the culture, glutamine was added to 0.5 mM / 10⁶ viable cells. Starting from day 4, cultures were supplemented with 4 mM galactose (G5388, Sigma) and 0.3 uM manganese chloride (M5005, Sigma) on a daily basis.

2.3.3. Cell count and metabolite quantification

Samples were taken on a daily basis to measure cell density and glucose concentrations. Cell number and viability were assessed by trypan blue exclusion and counting on a Cedex automated cell counter (Innovatis). Samples were centrifuged and the supernatants were analysed for glucose concentration before freezing at -80°C for further analysis. Glutamine concentrations in supernatants were measured with YSI 2700 Select biochemistry analyzer (Yellow Spring, USA). Glucose, lactate and ammonia concentrations were measured by the VITROS 350 (Orthoclinical Diagnostics, USA)

2.3.4. Antibody quantification

Cell suspension samples were centrifuged at 3000g for 20 min and filtered using Millipore Steriflip-GP, 0.22 µm filter (Millipore). Samples were stored at -80°C for subsequent purification. MabSelect™ SuRe™ resin (GE healthcare) was first equilibrated in PBS and was added to the supernatant according to the binding capacity of 30 mg/ mL resin. Samples were incubated for 30 min at room temperature under reversal agitation, then were centrifuged at 500g for 5 min. Resin was washed twice in PBS. Antibodies were eluted with 100 mM citrate buffer at pH 3.0 and the buffer was exchanged against water using amicon ultra 4, 10K device (Millipore). Purified antibodies were quantified by absorbance at 280 nm using the antibody specific extinction coefficient and stored at -80 °C for subsequent analysis.

2.3.5. Antibody purification

Cell suspension samples were centrifuged at 3000g for 20 min and filtered using Millipore Steriflip-GP, 0.22 µm filter (Millipore). Samples were stored at -80°C for subsequent purification. MabSelect™ SuRe™ resin (GE healthcare) was first equilibrated in PBS and was added to the supernatant according to the binding capacity of 30 mg/ mL resin. Samples were incubated for 30 min at room temperature under reversal agitation, then were centrifuged at 500g for 5 min. Resin was washed twice in PBS. Antibodies were eluted with 100 mM citrate

buffer at pH 3.0 and the buffer was exchanged against water using amicon ultra 4, 10K device (Millipore). Purified antibodies were quantified by absorbance at 280 nm using the antibody specific extinction coefficient and stored at -80 °C for subsequent analysis.

2.3.6. Lectin blot

Biotinylated *Erythrina Cristagalli agglutinin* lectin (ECL) (Vectors Laboratories, cat # B-1145) was used to evaluate the terminal β -1,4 galactosylation. Purified samples containing DTT were heated at 70 °C for 10 min. Samples (1 μ g per well) were resolved on denaturing TGX polyacrylamide gel electrophoresis (BioRad) and transferred onto nitrocellulose membranes using Trans-Blot Turbo transfer system (BioRad). Ponceau-S red staining was used to control the protein load. Membrane were probed with ECL (10 ug /mL) for 2 h and then for 1 h with streptavidin-FluoDyLight650 conjugated (1/5000). Signals were recorded with a Chemidoc MP Imaging System (BioRad).

2.3.7. Glycan analysis by HILIC

Glycans were released using PNGase F at 37 °C for 24 h. Then, samples were labelled with 2-aminobenzamide (2-AB) prior to being injected on the TSKgel Amide-80 column at a flow rate of 0.50 mL/min. Glycan were eluted using 100 mM ammonium formate at pH 4.5 (solvent A) and 100% acetonitrile (solvent B). Peaks were calibrated with 2-AB dextran ladder and compared to GU value in glycobase.NIBRT.ie. The relative abundance of the glycans were calculated according to the peak areas present on the chromatograms.

Galactosylation index (GI) was determined based on the abundance of terminal galactose residues present on the antibody according the following equation (Liu et al., 2015; Villacres et al., 2015):

$$GI = \frac{G2 + 0.5 \times G1}{G0 + G1 + G2}$$

Where G0, G1 and G2 represents the relative proportion of the non-galactosylated, monogalactosylated, and fully-galactosylated antibody.

Sialylation index (SI) was determined in the same manner, where S0, S1 and S2 represents the proportional areas of all non-sialylated, mono-sialylated and fully-sialylated glycan structure.

$$SI = \frac{S2 + 0.5 \times S1}{S0 + S1 + S2}$$

2.4. Results and discussion

2.4.1. Cell growth and antibody production

The parental and the PYC2 cell lines were grown using the same basal medium (BalanCD), but with two distinct concentrated feed formulations (EfficientFeed B and Feed12.7). Bolus feed additions were performed on a daily basis starting on day 2. For each case, cultures were performed with and without manganese and galactose supplementation from day 4 onwards.

As shown in Figure 31, the maximum cell density reached by PYC2 cells was twice that of the parental cell line when cultivated with the EfficientFeed B (13.5×10^6 vs 7.5×10^6 cells/mL, respectively). On the other hand, when cultures were supplemented with Feed12.7, both cell lines displayed more similar growth curves, attaining peak cell densities of about 16×10^6 cells/mL and 14×10^6 cells/mL for PYC2 and parental cells respectively. With EfficientFeedB, the cell viability was maintained above 90 % for an additional 24 h in the case of PYC2 cells. Cell viability was shown to rapidly declines after the cell density peak for both cell lines. With Feed12.7, the corresponding drops were not as pronounced. The final antibody titers were found to be relatively similar with the use of EfficientFeed B, reaching 70-80 mg/L and 60 mg/L for PYC2 and parental cell, respectively. However, the production kinetics were quite distinct; the maximal concentration was reached on day 10 for the PYC2 cells compared to day 12 in the cultures with parental cells. The higher antibody titers achieved in cultures with PYC2 cells can be related in part to the increased integral viable cell density. With Feed12.7, despite the similar cell density profiles, the final antibody concentrations were increased by 40 % with PYC2 cells (~95 mg/mL) compared to parental cells (~54 mg/mL). By comparing both concentrated feed solutions, Feed12.7 yielded a slight increase in antibody titer compared to EfficientFeed B for PYC2 cells, while the final antibody titer remained similar for the parental cell line, despite the cell growth improvement noted with Feed12.7. As shown in Figure 31, no significant differences in viable cell density and cell viability were observed when manganese and galactose were both added to the cultures. These supplements also did not significantly impact antibody production, with only a minor decrease observed when the PYC2 cell line was supplemented with Feed12.7.

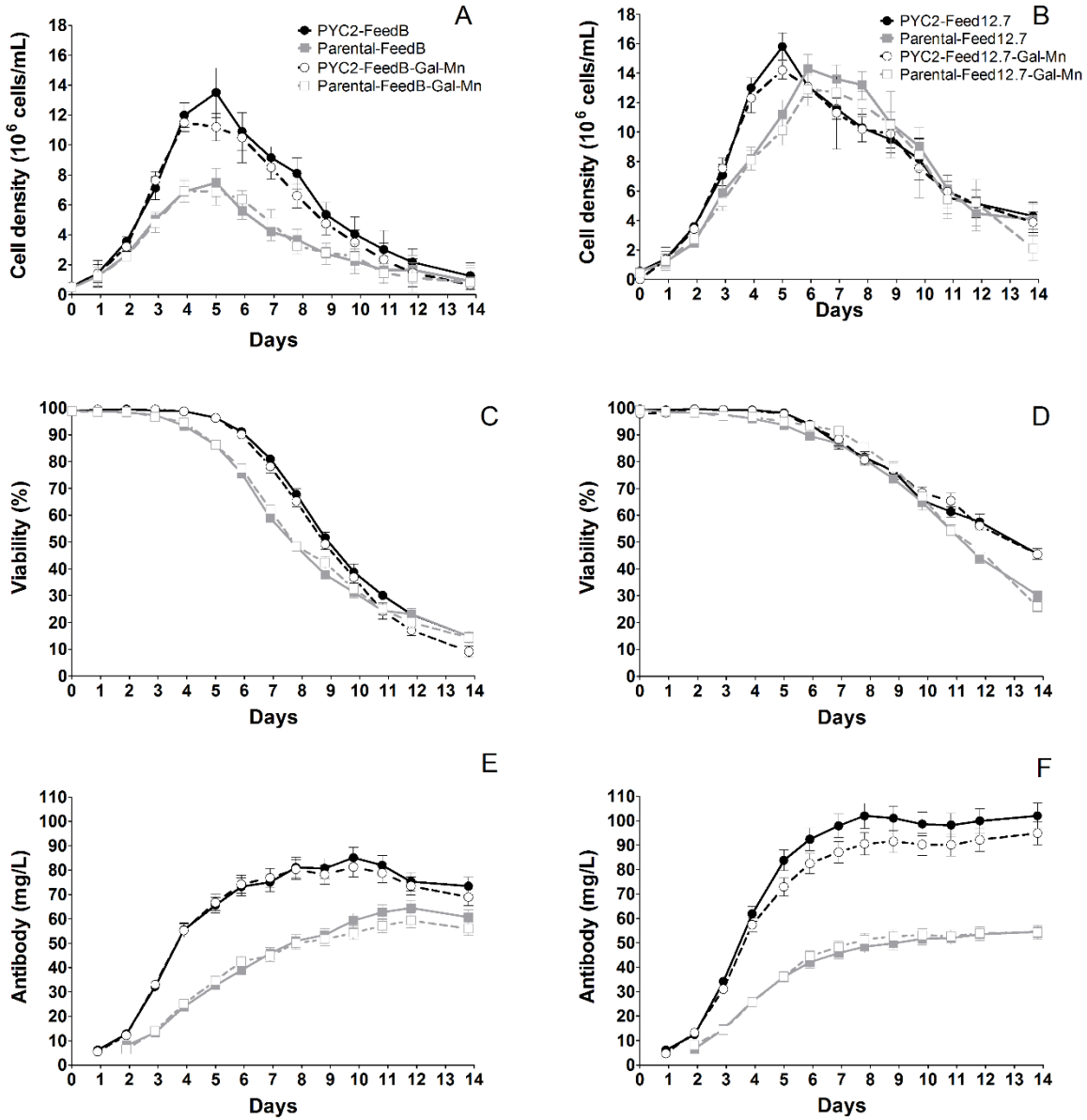


Figure 31 : (A, B) Cell density, (C, D) cell viability, (E, F) antibody concentration profiles of parental and PYC2-expressing cells cultivated with EfficientFeed B (left panels) and Feed12.7 (right panels). Error bars depict standard deviations of the measurements.

2.4.2. Nutrient uptake and waste metabolite production

Figure 32 shows the corresponding nutrient and waste metabolite profiles. The feeding regime allowed maintaining relatively constant glucose concentration throughout the cultures (Figures 2A, 2B). Glutamine concentrations were maintained around 2 mM during the first three days and then increased to around 5 mM for the following days of cultivation (Figures 32C, 32D). As expected, the most striking differences between the PYC2 and the parental cell lines were observed in the lactate concentration profiles. Both cell lines initially accumulated lactate during the exponential growth phase, but only PYC2 cells displayed a shift toward lactate consumption immediately following the peak in cell density. With EfficientFeed B, when the viability of PYC2 cells dropped below 50 %, the cells started to produce lactate again. All the cultures reached similar final ammonia concentrations, irrespective of the cell type or the feeding solutions used.

During the exponential phase, the cell specific glucose uptake rates were relatively similar in all the cultures, but lactate production was 2 to 3 fold higher in parental cells with EfficientFeed B (Table 5). As evident from the lower molar ratio of lactate produced per glucose consumed, PYC2 cells had a greater nutrient utilization efficiency. However, with the other feed solution (Feed12.7), differences were less marked. The cell specific glutamine/ammonia consumption/production rates also remained relatively similar across all the different culture conditions.

After the cell density peak, the cell specific glucose and glutamine consumption rates were all found to significantly decrease, concomitantly with the drop in cell viability. Parental cells continued to produce lactate during the early decline phase, but at lower rates compared to the exponential phase. The lactate/glucose ratios were markedly decreased in PYC2 cells, again reflecting their increased metabolic efficiency in terms of substrate utilization (Table 5).

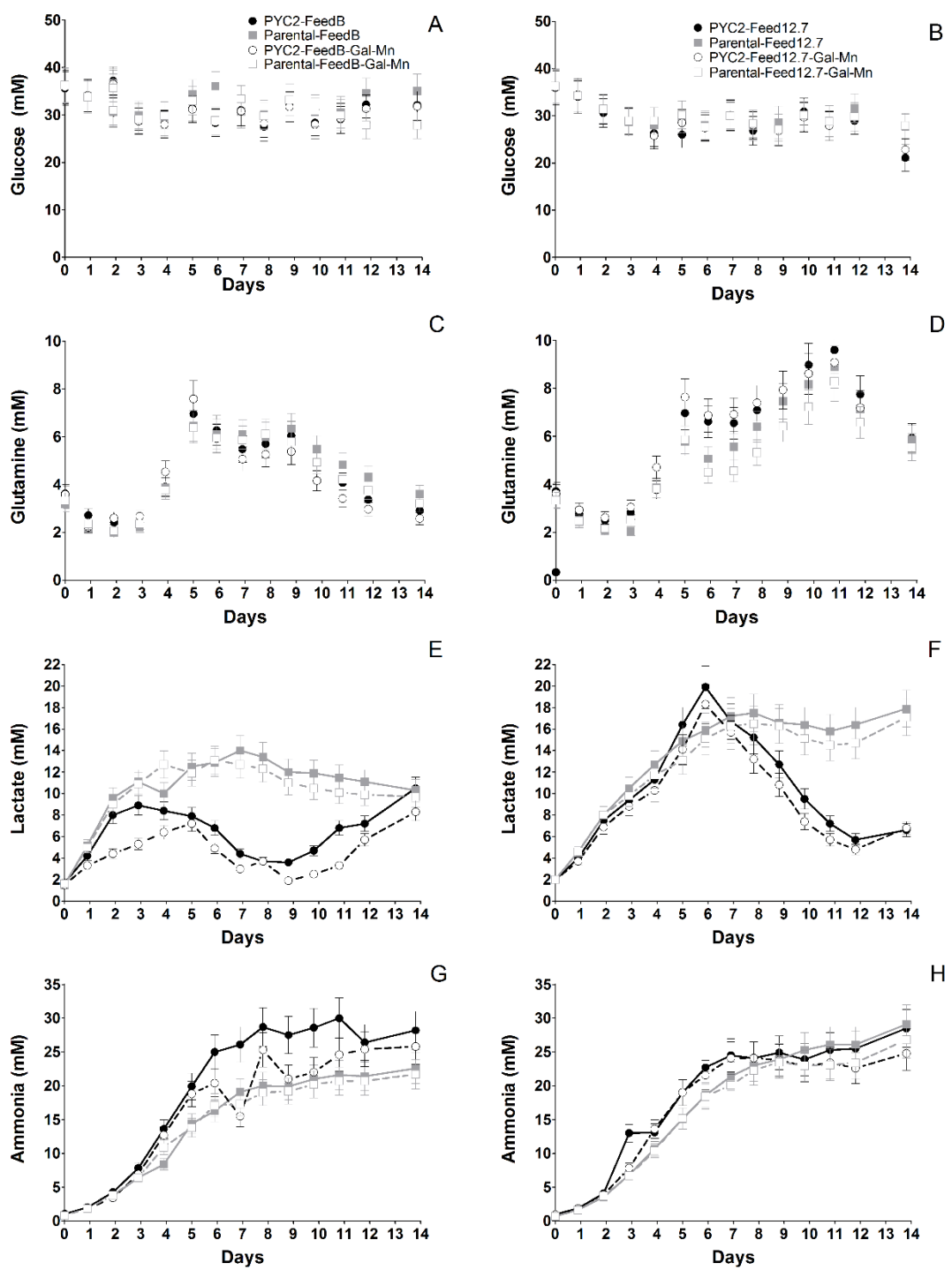


Figure 32 : (A, B) glucose, (C, D) glutamine, (E, F) lactate and (G, H) ammonia concentration profiles for parental and PYC2-expressing cells cultivated with (left panels) Efficient Feed B and (right panels) Feed12.7. Error bars depict standard deviations of the measurements.

The cell specific ammonia production rates were all significantly reduced during the early decline phase (Table 6). Cultures supplemented with manganese and galactose did not exhibit any significant differences in terms of glucose and glutamine utilization (Figure 32). Some minor differences were observed in the lactate and ammonium profiles for PYC2 cells fed with EfficientFeed B, but given the similarity of the corresponding growth curves, the discrepancies are likely due to the inherent variability of cell cultures and measurement errors.

Table 5 : Specific rates of glucose/lactate consumption/production in PYC2 and parental cell lines during exponential and early decline phase (in pmol/cells days)

Exponential phase								
	EfficientFeed B				Feed12.7			
	PYC2	Parental	PYC2 Mn+Gal	Parental Mn+Gal	PYC2	Parental	PYC2 Mn+Gal	Parental Mn+Gal
q glc	1.67 ± 0.16	1.91 ± 0.23	1.72 ± 0.14	1.83 ± 0.25	1.99 ± 0.05	1.71 ± 0.09	1.96 ± 0.04	1.70 ± 0.09
q lac	0.21 ± 0.09	0.45 ± 0.09	0.17 ± 0.07	0.70 ± 0.15	0.32 ± 0.06	0.29 ± 0.08	0.27 ± 0.06	0.28 ± 0.07
Ratio lac/glc	0.12	0.24	0.10	0.38	0.16	0.17	0.14	0.16
Early decline phase								
q glc	0.90 ± 0.06	0.88 ± 0.20	0.88 ± 0.09	0.77 ± 0.20	1.31 ± 0.05	1.15 ± 0.10	1.24 ± 0.06	1.13 ± 0.06
q lac	-0.17 ± 0.01	0.34 ± 0.10	-0.17 ± 0.05	0.18 ± 0.04	-0.34 ± 0.02	-0.05 ± 0.03	-0.36 ± 0.01	-0.10 ± 0.02
Ratio lac/glc	-0.19	0.39	-0.19	0.23	-0.26	-0.10	-0.29	-0.12

Table 6 : Specific rates of glutamine/ammonia consumption/production in PYC2 and parental cell lines during exponential and early decline phase (in pmol/cells days)

Exponential phase								
	EfficientFeed B				Feed12.7			
	PYC2	Parental	PYC2 Mn+Gal	Parental Mn+Gal	PYC2	Parental	PYC2 Mn+Gal	Parental Mn+Gal
q gln	1.42 ± 0.03	0.90 ± 0.04	0.91 ± 0.02	0.92 ± 0.04	1.05 ± 0.03	0.91 ± 0.03	1.04 ± 0.03	0.88 ± 0.03
q NH3	0.63 ± 0.04	0.54 ± 0.09	0.59 ± 0.02	0.77 ± 0.05	0.45 ± 0.10	0.48 ± 0.05	0.51 ± 0.04	0.51 ± 0.05
Ratio NH3/gln	0.44	0.60	0.65	0.85	0.43	0.53	0.49	0.58
Early decline phase								
q gln	1.35 ± 0.16	0.45 ± 0.08	0.64 ± 0.03	0.54 ± 0.05	0.54 ± 0.03	0.53 ± 0.02	0.57 ± 0.02	0.52 ± 0.02
q NH3	0.40 ± 0.02	0.78 ± 0.36	0.26 ± 0.08	0.48 ± 0.01	-0.04 ± 0.03	0.002 ± 0.07	-0.12 ± 0.04	-0.03 ± 0.02
Ratio NH3/gln	0.28	1.73	0.41	0.89	0.13	0	0.18	0.06

2.4.3. Glycosylation analysis

For each culture condition, samples were collected at different time points and the terminal β -1,4 galactosylation of the AB was assessed by lectin blot. Samples collected on day 6 and day 14 were further characterized by HILIC to obtain the glycan distribution.

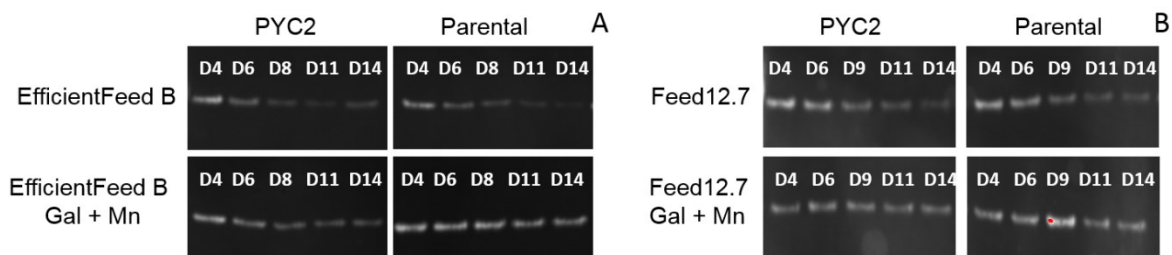


Figure 33 : Lectin-blot analysis of antibody galactosylation during fed-batch cultures with PYC2 and parental cells fed with (A) EfficientFeed B and (B) Feed12.7. Samples were purified prior to analysis and loaded at 1 μ g per well

2.4.3.1. Effect of culture duration

The lectin blot analysis indicates that the degree of galactosylation decreased over time, irrespective of the cell line and the concentrated feed employed (Figure 33). However, as revealed by the enhanced signals on the lectin blot, this decrease was greatly reduced with the combined supplementation of manganese and galactose to the fed-batch cultures.

Consistent with the lectin blot assay, the glycan distributions obtained via HILIC analysis (Figure 34) revealed that, in fed-batch cultures performed without substrate/precursor supplementation, mono and di-galactosylated structures (G1, G2) and sialylated forms were reduced over time, in favour of the G0 forms (Table 7 A). While increasing culture longevity is generally desirable to increase the final product concentration in fed-batch processes, it may also have adverse effects on product glycosylation. The changes in culture environmental conditions occurring over time (e.g. availability of nutrients, accumulation of waste, etc.) are likely to alter the cellular physiology and may directly or indirectly impact product quality.

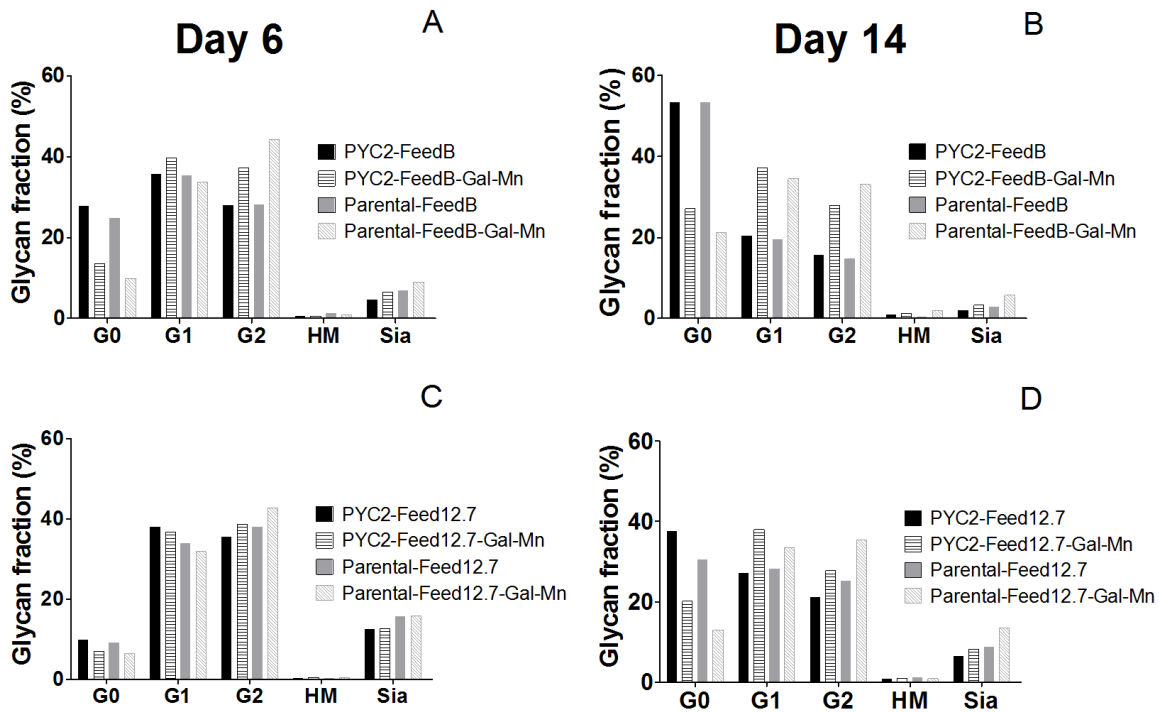


Figure 34 : Glycan distribution of antibody produced in (A, B) EfficientFeedB and in (C, D) Feed12.7. Antibody were sample at (left panels) day 6 and at (right panels) day 14

For instance, numerous studies have reported that ammonia accumulation in the culture environment and its resulting effect on the intracellular pH can significantly alter the glycosyltransferase activity or its subcellular localization, thereby impairing the glycosylation process (Axelsson et al., 2001; Gawlitzek et al., 2000; Rivinoja et al., 2009). Moreover, extracellular enzymes secreted by CHO cells or released by cell lysis may cause significant degradation of the glycans (Butler, 2006; Costa et al., 2014). The exposure time to these enzymes is one of the critical factor determining the extent of glycan degradation. With PYC2 cells, the maximum in antibody concentration is reached 2 to 6 days (with EfficientFeed B and Feed12.7, respectively) earlier than with the parental cells. This not only implies an improved productivity, but the capacity to harvest earlier can ensure to obtain a product with more homogeneous and complete glycosylation profile (Butler, 2006; Lipscomb et al., 2005).

Table 7 : Effects of (A) culture duration, (B) addition of supplements, (C) concentrated feed solution and (D) cell line on the galactosylation and sialylation index

↑↑↑↑/↓↓↓ indicate variation in GI and SI in the range of 45-60 %,

↑↑↑/↓/↓↓ indicate variation in GI and SI in the range of 30-45 %,

↑↑/↓/↓ indicate positive/negative variation in GI and SI in the range of 15-30 %,

↑/↓ indicate positive/negative variation in GI and SI in the range of 5-15 %,

≈ indicate marginal variation below 5%

A. Effect of culture duration (day 14 relative to day 6)

Medium	Suppl	Cells	GI	SI
EfficientFeedB	x	PYC2	↓↓↓	↓↓↓
		Parental	↓↓↓	↓↓
	Mn + Gal	PYC2	↓↓	↓↓↓
		Parental	↓↓	↓
Feed12.7	x	PYC2	↓↓↓	↓↓
		Parental	↓↓↓	↓↓
	Mn + Gal	PYC2	↓↓	↓↓
		Parental	↓	↓

B. Manganese and galactose addition (relative to cultures without supplementations)

Medium	Cells	Days	GI	SI
EfficientFeedB	PYC2	D6	↑↑	≈
		D14	↑↑↑	≈
	Parental	D6	↑↑	↓↓
		D14	↑↑↑↑	≈
Feed12.7	PYC2	D6	↑	↓
		D14	↑↑	≈
	Parental	D6	↑	↓
		D14	↑↑	↓↓

C. Effect of the medium change (relative to cultures performed with Efficient Feed B)

Suppl.	Cells	Days	GI	SI
x	PYC2	D6	↑↑	↑↑↑↑
		D14	↑↑	↑↑↑↑
	Parental	D6	↑↑	↑↑↑
		D14	↑↑↑	↑↑↑
Mn ↑ Gal	PYC2	D6	≈	↑↑↑↑
		D14	↑	↑↑↑↑
	Parental	D6	≈	↑↑↑↑
		D14	↑	↑↑↑↑

D. Effect of the cell line (relative to the parental clone)				
Medium	Suppl.	Days	GI	SI
	x	D6	≈	↓↓↓
		D14	≈	↓↓↓
FeedB	Mn + Gal	D6	≈	↓
		D14	↓	↓↓↓
	x	D6	≈	↓
		D14	↓↓	↓
Feed12	Mn + Gal	D6	≈	↓
		D14	↓↓	↓↓

2.4.3.2. Effect of manganese and galactose supplementation

Our results show that supplementing manganese and galactose allowed to significantly increase antibody galactosylation for both cell lines and with both concentrated feed solutions (Table 7 B). The effect of the supplementation was more pronounced in cultures fed with EfficientFeedB. Manganese and galactose additions could only partially attenuate the decrease in galactosylation occurring over time during the cultures (Figure 34). The amount of supplements added and the feeding regime were however not optimized in our cultures. Nonetheless, our results are in agreement with previous studies demonstrating a positive impact on antibody glycosylation upon addition of galactose and manganese in cell cultures. St Amand et al. (2014) reported that galactose addition led to increase the relative proportions of G1 and G2 forms, and additional manganese was required to decrease the relative proportion of G0 while maintaining galactosylation (Figure 34 & Table 7 B).

2.4.3.3. Effect of concentrated feed solution

The use of two different concentrated feed solutions led to significantly different glycan distribution profiles, particularly with respect to the relative proportions of G0 and sialylated forms (Figure 34). When cultures were performed with Feed12.7, we observed an increase in galactosylation and sialylation index (Table 7C). When galactose and manganese were added to the fed-batch cultures, the impact of the change in feed solution on the relative proportion of galactosylated residues was greatly diminished and the differences with respect to sialylation

were maintained. Globally, Feed12.7 seems to favor the formation of more fully glycosylated structures. It is notable that cell viability at day 14 was much lower when using EfficientFeed B compared to Feed12.7. As mentioned above, low cell viability can be associated with conditions that can adversely affect product sialylation due to the release of sialidase upon cell lysis. Kaneko et al. (2010) observed that such reduction in antibody galactosylation was correlated to cell death.

2.4.3.4. Effect of the cell line

The aforementioned differences observed in the main cell kinetics between the two cell lines, particularly related to lactate metabolism, were reflected in the glycan distribution of the product. The most notable differences were in the degree of sialylation, which was consistently reduced in PYC2 cells compared to parental cells, irrespective of the concentrated feed solutions, the supplements or the culture time (Table 7D). Table 7C shows that PYC2 expressing cells exhibited a more reduced sialylation in the range of 30 to 40 % in the EfficientFeedB. It should however be pointed out that the degree of sialylation was already very low on day 6 (below 6 % in all the tested conditions). The relative proportion of galactosylated and non-galactosylated forms was relatively similar between the two cell lines. Interestingly, in PYC2, supplements addition did not allow to increase the galactosylation level to parental cell line, indicating that parental cells are more sensitive to the addition of these compounds. However, it should be emphasized that similar amounts of manganese and galactose were supplemented in all the cultures. Feeding these compounds on a per cell basis would presumably reduce the observed differences among the two cell lines.

2.5. Conclusion

Our comparative study of fed-batch cultures using two different cell lines and two concentrated feeding solutions, supplemented or not with galactose and manganese, allowed us to infer the relative impact of these changes on product glycosylation. Our study revealed that the culture duration has the most significant impact on the antibody glycosylation state. Despite having greatly different lactate metabolism, only minor glycosylation variations were noted between the parental and the PYC2 cell lines. Nonetheless, the maximum product titer is reached earlier with PYC2-expressing cells, allowing harvesting the cultures earlier and thus yielding antibody

with better galactosylation levels. Galactose and manganese supplementation was also shown to improve antibody galactosylation, but further investigation is required in order to determine the optimal levels at which they must be supplied to the cultures.

Acknowledgment

The authors would like to thank Louis Bisson for performing protein A analysis.

Discussion générale

L'ensemble des travaux de cette thèse porte sur l'amélioration du métabolisme des cellules CHO dans le but d'accroître la performance des procédés de culture en termes de rendement et de qualité du produit final.

Au cours de ces travaux, une lignée cellulaire CHO produisant un anticorps a été génétiquement modifiée grâce à l'insertion du gène de la PYC2. Après les étapes de transfection et de sélection, les clones émergents ont été criblés par immuno-buvardage d'après leur niveau d'expression de l'enzyme PYC2. Onze clones exprimant PYC2 ont été identifiés et mis en culture. Qu'ils aient été cultivés en mode cuvée ou cuvée alimentée, ces 11 clones ont tous présenté un même phénotype très distinctif, caractérisé par une phase de consommation du lactate corrélée au ralentissement ou à l'arrêt de la croissance. Le clone parental, ainsi que les clones transfectés n'exprimant pas PYC2, ne présentaient pas ce type de profil singulier. Ainsi le phénotype distinctif observé dans les cellules PYC2 n'est pas le fait de simples variations clonales, mais semble bien le fruit de l'expression de PYC2.

Les cinétiques de croissance cellulaire et de consommation/production de nutriments montrent que le changement de métabolisme vers la consommation de lactate s'opère quelque soient le milieu et le mode de culture employés. Il est intéressant de noter que ce changement de métabolisme est également observé lorsque les cellules PYC2 sont soumises à de fortes concentrations en glucose (> 30 mM) lesquelles ont généralement tendance à favoriser la production de lactate dans les cultures de cellules animales. Le métabolisme des cellules parentales semble plus sensible au changement de milieu, plus particulièrement au milieu d'alimentation. Que ce soit pendant la phase exponentielle de croissance ou pendant la phase stationnaire, les cellules parentales présentent généralement un ratio molaire de lactate/glucose largement supérieur à celui des cellules PYC2 lorsque que celles-ci sont cultivées dans des milieux de culture commerciaux (p ex : PowerCHO2, BalanCD), avec ou sans ajout d'une solution concentrée en nutriments (EfficientFeedB). Ainsi, dans ces milieux de culture, les cellules parentales présentent un métabolisme du glucose bien moins efficace que celui des cellules PYC2. Par contre, lorsque les cellules parentales sont alimentées avec le milieu d'alimentation concentré Feed12.7 pendant la phase exponentielle de croissance, le ratio molaire de lactate/glucose se rapproche de celui des cellules PYC2. De plus, avec ce même milieu, pendant la phase stationnaire, les cellules parentales sont capables de re-

consommer le lactate, mais dans des proportions largement inférieures par rapport à la lignée PYC2. Des études similaires opérées en mode cuvée, montrent que l'expression de PYC2 dans les cellules CHO permet d'augmenter la croissance cellulaire ou la production finale, mais pas les deux. De plus l'amélioration d'un paramètre semble se faire au détriment de l'autre (Fogolín et al., 2004; Wilkens and Gerdtzen, 2015). Dans notre étude les cellules PYC2 présentent systématiquement un rendement de production d'anticorps supérieur à celui obtenu dans les cellules parentales, associé à une augmentation de la croissance cellulaire, quelles que soient les conditions de culture.

De nombreux groupes de recherche ont observé, dans les cultures de cellules CHO, une forte production de lactate pendant la phase exponentielle de croissance et une consommation de lactate quand la prolifération cellulaire ralentit. Les facteurs déclenchant ce changement métabolique vers la re-métabolisation du lactate ne sont pas encore clairement identifiés. La composition du milieu (Ma et al., 2009; Zagari et al., 2013a), la concentration en cuivre dans le milieu de culture (Luo et al., 2012; Xu et al., 2016; Yuk et al., 2014), le niveau extracellulaire de lactate, le taux de croissance des cellules et les régulations enzymatiques (Mulukutla et al., 2012; Mulukutla et al., 2014; Mulukutla et al., 2015) sont autant de facteurs qui semblent impliqués dans ce changement métabolique. De nombreuses études se sont attachées à élucider les régulations sous-jacentes à ce phénomène, car il semblerait que la capacité des cellules à re-consommer le lactate soit associée à une augmentation des rendements de production (Dean and Reddy, 2013; Le et al., 2012b; Templeton et al., 2013).

De nombreux groupes de recherche sont parvenus à quantifier les flux métaboliques s'opérant dans les cellules CHO grâce à l'utilisation de l'AFM-¹³C (Ahn and Antoniewicz, 2011, 2013; Dean and Reddy, 2013; Templeton et al., 2013; Templeton et al., 2014). Dans la plupart de ces études, du glucose et/ou de la glutamine marqués au carbone 13 au niveau de différents carbones sont utilisés comme traceurs isotopiques. Ces différents travaux ont révélé que la phase exponentielle de croissance est caractérisée par une glycolyse élevée à l'origine d'une forte production de lactate. Ces études montrent également que le flux anaplerotique de la pyruvate carboxylase contribue de façon non négligeable à l'alimentation du TCA, et semble associé au flux de l'enzyme malique. Pendant cette période, le cycle des pentoses phosphates semble assez faible, bien que ce dernier constitue en principe une importante source d'agent réducteur (NADPH) pour entretenir les réactions de biosynthèse

(synthèse des lipides, des acides nucléiques, etc.). A mesure que la prolifération cellulaire ralentit, le cycle des pentoses phosphates devient plus actif, tandis que les flux de la glycolyse, pyruvate carboxylase et enzyme malique diminuent alors que le lactate est consommé. Dépendamment des études, le cycle des ATC est retrouvé similaire ou augmenté pendant la phase de consommation du lactate. Dans notre étude, nous nous sommes attachés plus particulièrement au devenir du lactate métabolisé par les cellules. Ainsi, contrairement aux études précitées, les cultures cellulaires ont été réalisées en présence du traceur 3-[¹³C] lactate. L'utilisation de ce traceur garantit que le marquage mesuré dans d'autres métabolites résulte directement de la consommation de lactate. Avec les traceurs usuels tels que le glucose et la glutamine, il est plus difficile d'évaluer la contribution réelle du lactate puisque les milieux de culture contiennent plusieurs autres sources de carbone (e.g. acides aminés). L'analyse des données de distribution de marquage dans différents métabolites a révélé que les deux lignées cellulaires consomment du lactate, et ce, même pendant la phase exponentielle de croissance durant laquelle on observe une production nette de lactate qui se traduit par une accumulation dans l'environnement extracellulaire. Ainsi, le sens de réaction semble être en faveur de la consommation de lactate dans les cellules PYC2 qui entrent en phase stationnaire de croissance. Il est intéressant de noter qu'il existe plusieurs types de lactate déshydrogénase (1-5) dont le sens de réaction varie en fonction des sous-unités qui la composent. Le calcul des flux métaboliques montre que dans la lignée parentale, les flux de la glycolyse et de la lactate déshydrogénase demeurent plutôt similaires entre les deux phases de croissance, tandis que les flux du cycle de Krebs, de l'enzyme malique et de la malate déshydrogénase I diminuent lors de l'arrêt de la prolifération. Comparées aux cellules parentales, les cellules PYC2 présentent un flux glycolytique et une production de lactate plus importants et une activité du cycle des ATC plus faible durant la phase exponentielle. Par contre, lors de la transition vers la phase stationnaire de croissance, la glycolyse est fortement réduite et devient inférieure à celle de la lignée parentale. Le lactate est consommé, et les flux au niveau des ATC, de l'enzyme malique, de la pyruvate carboxylase et PYC2 sont tous augmentés. Les mesures d'activité enzymatique de la pyruvate carboxylase (PC endogène et PYC2) montrent un niveau d'activité supérieur dans le cas des cellules exprimant PYC2. Alors que l'activité enzymatique mesurée dans les cellules PYC2, ne semble pas présenter de différences notoires au cours du temps, le flux catalysé par cette enzyme semble principalement actif durant la phase stationnaire. Ces données suggèrent l'existence de différents niveaux de régulation. Contrairement aux données présentées dans

la littérature, (Ahn and Antoniewicz, 2011, 2013; Templeton et al., 2013; Templeton et al., 2014) les flux au niveau de PYC2 et de l'enzyme malique sont retrouvés augmentés lors de l'arrêt de la croissance, dans les cellules PYC2. Il est intéressant de noter qu'un flux de malate vers le cytosol est observé dans les deux lignées cellulaires pendant les deux phases de croissance. Il est ainsi possible que l'augmentation du flux au niveau de l'enzyme malique permette de compenser la fuite de malate en réalimentant le cycle de Krebs avec du pyruvate. Chong et al. (2010) ont également observé un flux de malate associé à une accumulation de lactate dans le milieu extracellulaire dans le cas de cellules CHO, concluant à une limitation au niveau de l'enzyme malate déshydrogénase II. La surexpression de cette enzyme a permis d'améliorer à la fois la biomasse et la production d'anticorps, tout en diminuant l'excrétion de malate et de lactate. Les enzymes malate déshydrogénase I et II constituent des éléments importants de la navette malate/aspartate, impliquée dans le maintien du potentiel oxydo-réducteur des cellules. Une étude a montré que la surexpression de aralar 1, un des composés de cette navette, a permis de favoriser la consommation de lactate sans altérer la glycolyse (Zagari et al., 2013b). Dans les cellules exprimant PYC2, une augmentation des flux au niveau de la malate déshydrogénase I et de PYC2 est observée lors du passage vers la phase stationnaire. Il est donc possible que l'augmentation du flux de la malate déshydrogénase I, grâce à la génération d'oxaloacétate par la PYC2, soit une réponse à la consommation de lactate pour maintenir l'équilibre oxydo-réducteur. Les incertitudes assez grandes retrouvées au niveau de l'estimation de certains flux (au niveau de l'enzyme malique, malate déshydrogénase I et pyruvate carboxylase) proviennent du type de traceurs utilisés ainsi que du nombre assez limité de mesures de distribution de masse disponibles (Crown et al., 2012; Metallo et al., 2009). Dans notre étude, si les mesures de marquage obtenues n'ont pas permis d'estimer avec confiance tous les flux, il est cependant clair que pendant la phase stationnaire de croissance, les cellules PYC2 présentent une consommation de lactate associée à une diminution de la glycolyse et une augmentation de l'activité du cycle des ATC. De plus, le rendement de production d'anticorps de ces cellules est retrouvé également augmenté. Deux études d'AFM-¹³C portant sur les cellules CHO montrent que la production d'anticorps semble associée à l'augmentation de l'activité du cycle de Krebs (Dean and Reddy, 2013; Templeton et al., 2013). Il est probable que cette augmentation soit liée à une hausse des besoins énergétiques dû à la synthèse, au repliement et à la sécrétion des protéines. Le métabolisme du lactate semble également être un indicateur important pour la sélection des clones fortement producteurs (Le et al., 2012b).

Augmenter les capacités de production d'anticorps des procédés de culture tout en veillant au maintien de la qualité du produit final est un des défis majeurs des compagnies biopharmaceutiques. Notre étude comparative du profil de glycosylation de l'anticorps produit dans les cellules PYC2 et parentales montre que le temps de culture est le paramètre qui semble altérer le plus la glycosylation des anticorps. En effet, pour les deux lignées cellulaires, la sialylation et la galactosylation diminuent au cours du temps alors que la proportion relative de formes non-galactosylées augmente drastiquement. L'accumulation d'ammoniaque au cours de la culture est connue pour altérer la sialylation des protéines recombinantes (Gawlitzeck et al., 1997; Ryll et al., 1994). Or, les mesures d'ammoniaque montrent des concentrations relativement élevées (25-30 mM) au terme des cultures *fed-batch*. De plus, la sécrétion ou le relargage de glucosidases par les cellules CHO, notamment si la lyse cellulaire est importante, est également un facteur susceptible d'altérer la glycosylation des anticorps (Butler, 2006; Costa et al., 2014). Ainsi, le temps d'exposition du glycan à ces enzymes ainsi que la viabilité et la densité cellulaires sont autant de paramètres affectant la dégradation du glycan. Les profils de concentrations d'anticorps montrent une production plus importante et plus rapide dans les cellules PYC2 que dans les cellules parentales. Ainsi, une récolte du produit final s'opérant beaucoup plus tôt permettrait, sans trop compromettre le rendement d'obtenir des anticorps présentant une glycosylation plus complète.

De nombreux travaux ont montré les effets positifs associés à l'ajout de galactose et de manganèse au niveau de la glycosylation des anticorps (Gramer et al., 2011; St Amand et al., 2014; Villiger et al., 2016). Dans notre étude, l'ajout de ces deux composés au cours de la culture a également permis d'augmenter les niveaux de galactosylation, tout en diminuant la proportion relative de glycans non galactosylés. L'addition de ces suppléments semble également ralentir l'altération de la glycosylation au cours du temps et ce, pour les deux lignées cellulaires. La composition du milieu d'alimentation semble également avoir un impact sur la glycosylation des anticorps produits. Mais l'ajout de manganèse et galactose semble atténuer les différences causées par le changement de milieu d'alimentation. Finalement, le type cellulaire semble avoir le moins d'effet sur le profil de glycosylation des anticorps, puisque les distributions de glycans (G1+G2 et G0) étaient relativement similaires entre les cellules PYC2 et parentales. Par contre, le taux de sialylation s'avère plus grand dans la lignée parentale. Il est également intéressant de noter que les différences tendent à s'accroître lorsque du manganèse et du galactose sont ajoutés aux cultures. Ces données

suggèrent que les cellules parentales répondent plus favorablement à l'ajout de ces suppléments que les cellules PYC2. Cependant, étant donné que les cellules PYC2 ont produit jusqu'à presque 2 fois plus d'anticorps que les cellules parentales, et que les ajouts de manganèse et galactose consistaient en des ajouts quotidiens de concentrations fixes, il est possible que les concentrations appliquées à ces cellules soient sous-optimales comparées aux cellules parentales.

Conclusions et recommandations

Le but général de cette thèse de doctorat consistait à caractériser et évaluer l'impact de la modification du métabolisme central de cellules CHO sur les rendements de production et sur la glycosylation du produit final. Au cours de ces travaux de recherche, une lignée cellulaire CHO sur-exprimant le gène de la PYC2 a été générée. Dans les cellules CHO, c'est la première fois que l'expression de PYC2 a permis un changement de métabolisme aussi marqué associé à une amélioration de la croissance et de la production d'anticorps. Dans un second temps, une étude comparative des flux métaboliques intracellulaires s'opérant dans les deux lignées a été réalisée grâce à l'utilisation d'un traceur isotopique. Cette étude est la première à s'intéresser directement au devenir du lactate dans les cellule CHO, grâce à l'utilisation inédite de 3-[¹³C] lactate. Cette étude a permis de valider l'existence d'un flux métabolique au niveau de PYC2 lors de la phase stationnaire et a montré que les flux de la glycolyse et du cycle de Krebs évoluent au cours du temps de manière différente dans les deux lignées cellulaires. Contrairement aux cellules parentales, les cellules PYC2 présentent une diminution de la glycolyse et une augmentation de l'activité du cycle des ATC, associée à une consommation de lactate. Alors que les études de glycosylation des protéines recombinantes sont traditionnellement focalisées sur l'évaluation de l'impact du procédé ou de la surexpression/répression de gènes directement impliqués dans le processus de glycosylation. Notre étude s'est attachée à étudier non seulement l'impact d'une stratégie d'ingénierie métabolique mais également les effets de suppléments et de changement de milieu sur la qualité du produit final. L'analyse comparative des profils de glycosylation obtenus dans les deux lignées montre que la glycosylation de l'anticorps varie en fonction du temps, de l'ajout de suppléments, et du milieu de culture. Les lignées cellulaires semblent être à l'origine de variations de glycosylation plus marginales. Ainsi l'insertion du gène de la PYC2 dans les cellules CHO a permis d'améliorer l'efficacité du métabolisme des cellules tout en améliorant le titre d'anticorps produit sans altérer significativement la qualité du produit.

Ainsi l'expression de PYC2 semble être une cible intéressante pour des approches d'ingénieries cellulaires ayant pour objectif l'amélioration de l'efficacité du métabolisme cellulaire. Les données de cultures présentées au cours de cette étude montrent une accumulation d'ammoniaque au cours du temps relativement importante. Ainsi, des substitutions de la

glutamine par le pyruvate ou le glutamate dans des cultures cellulaires de PYC2 pourrait contribuer à diminuer l'accumulation d'ammoniaque dans le milieu de culture. Il serait également intéressant d'étudier l'impact de l'expression de PYC2 dans les cellules sur-exprimant la glutamine synthétase ce qui permettrait potentiellement d'améliorer simultanément la glycolyse et la glutaminolyse des cellules.

L'analyse des flux métaboliques a permis de mettre en évidence les différences de distribution de flux qui existent au début de la phase exponentielle de croissance et au début de phase stationnaire. L'utilisation de méthodes d'analyse de flux métabolique dynamique permettrait de caractériser le métabolisme cellulaire à tout moment de la culture. Cependant, l'application d'une telle technique nécessite une quantification précise des métabolites intracellulaires et donc le développement de protocoles d'extraction de métabolites efficace. La régulation du métabolisme cellulaire recouvre plusieurs niveaux de régulation, post-transcriptionnelle, et post-traductionnelle. Ainsi l'utilisation d'approches complémentaires de transcriptomique et protéomique permettraient de fournir des informations importantes concernant les régulations impliquées dans le métabolisme cellulaire. Par exemple, étudier l'évolution des ratios entre l'expression du gène de la lactate déshydrogénase-A et de la lactate déshydrogénase-B au cours du temps pourrait fournir des informations importantes quant au rôle de la lactate déshydrogénase dans le changement métabolique des cellules lors de l'entrée en phase stationnaire.

L'étude comparative de la glycosylation entre les deux lignées cellulaires a montré que la durée de la culture avait un impact important sur l'altération de la glycosylation de l'anticorps. Ainsi, le développement de méthodes analytiques simples, rapides et à haut débit permettant le suivi de la glycosylation tout au long du procédé de culture est primordiale. Au cours de notre étude, il a été montré que l'ajout de concentrations fixes de manganèse et galactose permettait d'améliorer la galactosylation des anticorps, dans des proportions différentes en fonction de la lignée cellulaire employée. L'effet de l'ajout de ces deux suppléments requière une étude plus approfondie. Ainsi il serait important de mieux définir la courbe de réponse du manganèse et du galactose vis-à-vis de la glycosylation, en fonction de différents paramètres de culture, telles que la croissance et la production d'anticorps. Notre étude a également montré que la lignée cellulaire était à l'origine de variations de glycosylation plus marginales, comparé à l'effet du

temps et de l'ajout de suppléments. Ainsi, l'ingénierie cellulaire au niveau des enzymes clés (β -1,4galactosyltransférase I, α -2,6 sialyltransférase 1, fucosyltransférase 8) du processus de glycosylation combinée à l'expression de PYC2 qui permet une amélioration du métabolisme, de la croissance et de la production d'anticorps, pourrait s'avérer être une option prometteuse.

Peu d'études ont examiné directement l'impact de la réorientation du métabolisme du glucose et de la glutamine sur la disponibilité en nucléotides-sucres nécessaire à la biosynthèse des glycanes (Burleigh et al., 2011). Ainsi combiner les études de marquage isotopique pour l'étude des flux métaboliques intracellulaires avec les études de glycosylation permettrait d'avoir une indication sur la distribution des flux de carbone au sein des précurseurs de la biosynthèse des glycanes.

Bibliographie

- Aboud-Pirak, E., Hurwitz, E., Pirak, M.E., Bellot, F., Schlessinger, J., and Sela, M. (1988). Efficacy of antibodies to epidermal growth factor receptor against KB carcinoma in vitro and in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* *80*, 1605-1611.
- Adams, D., Korke, R., and Hu, W.S. (2007). Application of Stoichiometric and Kinetic Analyses to Characterize Cell Growth and Product Formation. In *Methods in Biotechnology*. R. Pörtner, ed. (Totowa, NJ: Humana Press Inc).
- Agrawal, V., Slivac, I., Perret, S., Bisson, L., St-Laurent, G., Murad, Y., Zhang, J., and Durocher, Y. (2012). Stable expression of chimeric heavy chain antibodies in CHO cells. *Methods in Molecular Biology* *911*, 287-303.
- Ahn, W.S., and Antoniewicz, M.R. (2011). Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metab Eng* *13*, 598-609.
- Ahn, W.S., and Antoniewicz, M.R. (2012). Towards dynamic metabolic flux analysis in CHO cell cultures. *Biotechnol J* *7*, 61-74.
- Ahn, W.S., and Antoniewicz, M.R. (2013). Parallel labeling experiments with [1,2-(13)C]glucose and [U-(13)C]glutamine provide new insights into CHO cell metabolism. *Metab Eng* *15*, 34-47.
- Albanesi, M., and Daëron, M. (2012). The interactions of therapeutic antibodies with Fc receptors. *Immunology Letters* *143*, 20-27.
- Altamirano, C., Illanes, A., Becerra, S., Cairo, J.J., and Godia, F. (2006). Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *J Biotechnol* *125*, 547-556.
- Altamirano, C., Illanes, A., Casablancas, A., Gàmez, X., Cairo, J.J., and Godia, C. (2001). Analysis of CHO cells metabolic redistribution in a glutamate-based defined medium in continuous culture. *Biotechnol Progress* *17*, 1032-1041.
- Altamirano, C., Paredes, C., Cairó, J., and Godia, F. (2000). Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnology progress* *16*, 69-75.
- Altamirano, C., Paredes, C., Illanes, A., Cairo, J.J., and Godia, F. (2004). Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. *J Biotechnol* *110*, 171-179.
- Andersen, D., and Goochee, C. (1995). The Effect of Ammonia on the O-Linked Glycosylation of Granulocyte Colony-Stimulating Factor Produced by Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnology and bioengineering* *47(1)*, 96-105.

- Antoniewicz, M.R., Kelleher, J.K., and Stephanopoulos, G. (2006). Determination of confidence intervals of metabolic fluxes estimated from stable isotope measurements. *Metab Eng* 8, 324-337.
- Antoniewicz, M.R., Kelleher, J.K., and Stephanopoulos, G. (2007). Elementary metabolite units (EMU): A novel framework for modeling isotopic distributions. *Metabolic Engineering* 9, 68-86.
- Anumula, K.R. (2012). Quantitative glycan profiling of normal human plasma derived immunoglobulin and its fragments Fab and Fc. *J Immunol Methods* 382, 167-176.
- Axelsson, M.A.B., Karlsson, L.G., Steel, D.M., Ouwendijk, J., Nilsson, T., and Hansson, G.C. (2001). Neutralization of pH in the Golgi apparatus causes redistribution of glycosyltransferases and changes in the O-glycosylation of mucins. *Glycobiology* 11, 633-644.
- Baenke, F., Peck, B., Miess, H., and Schulze, A. (2013). Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis Model Mech* 6, 1353-1363.
- Beck, A., and Reichert, J.M. (2011). Therapeutic Fc-fusion proteins and peptides as successful alternatives to antibodies. *MAbs* 3, 415-416.
- Bell, A., Wang, Z.J., Arbabi-Ghahroudi, M., Chang, T.a., Durocher, Y., Trojahn, U., Baardsnes, J., Jaramillo, M.L., Li, S., Baral, T.N., et al. (2010). Differential tumor-targeting abilities of three single-domain antibody formats. *Cancer letters* 289, 81-90.
- Bhutia, Y.D., Babu, E., Ramachandran, S., and Ganapathy, V. (2015). Amino Acid transporters in cancer and their relevance to "glutamine addiction": novel targets for the design of a new class of anticancer drugs. *Cancer Res* 75, 1782-1788.
- Bibila, T., and Robinson, D. (1995). In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production. *Biotechnology Progress* 11, 1-13.
- Blondeel, E.J., Braasch, K., McGill, T., Chang, D., Engel, C., Spearman, M., Butler, M., and Aucoin, M.G. (2015). Tuning a MAb glycan profile in cell culture: Supplementing N-acetylglucosamine to favour G0 glycans without compromising productivity and cell growth. *J Biotechnol* 214, 105-112.
- Borys, M., Linzer, D., and Papoutsakis, E. (1994). Ammonia affects the glycosylation patterns of recombinant mouse placental lactogen-I by chinese hamster ovary cells in a pH-dependent manner. *Biotechnology and bioengineering* 43, 505-514.
- Borys, M.C., Linzer, D.I.H., and Papoutsakis, E.T. (1993). Culture pH affects expression range and glycosylation of recombinant placental lactogen protein by CHO. *Nature biotechnology* 11, 720-724.

- Boyd, P.N., Lines, A.C., and Patel, A.K. (1995). The effect of the removal of sialic acid, galactose, and total carbohydrate on functional activity of CAMPATH-1 H. *Molecular Immunology* 32, 1311-1318.
- Buescher, J.M., Antoniewicz, M.R., Boros, L.G., Burgess, S.C., Brunengraber, H., Clish, C.B., DeBerardinis, R.J., Feron, O., Frezza, C., Ghesquiere, B., et al. (2015). A roadmap for interpreting (13)C metabolite labeling patterns from cells. *Curr Opin Biotechnol* 34, 189-201.
- Burleigh, S.C., van de Laar, T., Stroop, C.J., van Grunsven, W.M., O'Donoghue, N., Rudd, P.M., and Davey, G.P. (2011). Synergizing metabolic flux analysis and nucleotide sugar metabolism to understand the control of glycosylation of recombinant protein in CHO cells. *BMC Biotechnol* 11, 95.
- Butler, M. (2006). Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by Mammalian cell systems. *Cytotechnology* 50, 57-76.
- Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11, 85-95.
- Campbell, I.K., Miescher, S., Branch, D.R., Mott, P.J., Lazarus, A.H., Han, D., Maraskovsky, E., Zuercher, A.W., Neschadim, A., Leontyev, D., et al. (2014). Therapeutic effect of IVIG on inflammatory arthritis in mice is dependent on the Fc portion and independent of sialylation or basophils. *J Immunol* 192, 5031-5038.
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., and Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol* 157, 220-233.
- Chee Fung Wong, D., Tin Kam Wong, K., Tang Goh, L., Kiat Heng, C., and Gek Sim Yap, M. (2005). Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnology and bioengineering* 89, 164-177.
- Chen, K., Liu, Q., Xie, L., Sharp, P.a., and Wang, D.I. (2001). Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnology and bioengineering* 72, 55-61.
- Chen, P., and Harcum, S.W. (2005). Effects of amino acid additions on ammonium stressed CHO cells. *J Biotechnol* 117, 277-286.
- Chen, P., and Harcum, S.W. (2006). Effects of elevated ammonium on glycosylation gene expression in CHO cells. *Metabolic engineering* 8, 123-132.
- Chong, W.P.K., Reddy, S.G., Yusufi, F.N.K., Lee, D.-Y., Wong, N.S.C., Heng, C.K., Yap, M.G.S., and Ho, Y.S. (2010). Metabolomics-driven approach for the improvement of Chinese hamster ovary cell growth: overexpression of malate dehydrogenase II. *Journal of biotechnology* 147, 116-121.

- Christie, A., and Butler, M. (1999). The Adaptation of BHK Cells to a Non-Ammoniogenic Glutamate-Based Culture Medium. *Biotechnol Bioeng* 64, 298-309.
- Chung, S., Quarmby, V., Gao, X., Ying, Y., Lin, L., Reed, C., Fong, C., Lau, W., Qiu, Z.J., Shen, A., et al. (2012). Quantitative evaluation of fucose reducing effects in a humanized antibody on Fc γ receptor binding and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activities. *MAbs* 4, 326-340.
- Costa, A.R., Rodrigues, M.E., Henriques, M., Azeredo, J., and Oliveira, R. (2010). Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. *Eur J Pharm Biopharm* 74, 127-138.
- Costa, A.R., Rodrigues, M.E., Henriques, M., Oliveira, R., and Azeredo, J. (2014). Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production. *Crit Rev Biotechnol* 34, 281-299.
- Crowell, C.K., Grampp, G.E., Rogers, G.N., Miller, J., and Scheinman, R.I. (2007). Amino acid and manganese supplementation modulates the glycosylation state of erythropoietin in a CHO culture system. *Biotechnol Bioeng* 96, 538-549.
- Crown, S.B., Ahn, W.S., and Antoniewicz, M.R. (2012). Rational design of ^{13}C labeling experiment for metabolic flux analysis. *BMC Systems Biology* 6, 2-14.
- Cruz, H.J., C.M Freitas, C.M., Alves, P.M., Moreira, J.L., and Carrondo, M.J.T. (2000). Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme and microbial technology* 27, 43-52.
- Cruz, H.J., Moreira, J.L., and Carrondo, M.J.T. (1999). Metabolic Shifts by Nutrient Manipulation in Continuous Cultures of BHK Cells.
- Danno, S., Nishiyama, H., Higashitsuji, H., Yokoi, H., Xue, J.H., Itoh, K., Matsuda, T., and Fujita, J. (1997). Increased Transcript Level of RBM3, a Member of the Glycine-Rich RNA-Binding Protein Family, in Human Cells in Response to Cold Stress. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* 236, 804-807.
- Dean, J., and Reddy, P. (2013). Metabolic analysis of antibody producing CHO cells in fed-batch production. *Biotechnol Bioeng* 110, 1735-1747.
- DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7, 11-20.
- Dell'Antone, P. (2012). Energy metabolism in cancer cells: how to explain the Warburg and Crabtree effects? *Med Hypotheses* 79, 388-392.
- Dinnis, D.M., and James, D.C. (2005). Engineering mammalian cell factories for improved recombinant monoclonal antibody production: lessons from nature? *Biotechnol Bioeng* 91, 180-189.

- Dorai, H., Kyung, Y.S., Ellis, D., Kinney, C., Lin, C., Jan, D., Moore, G., and Betenbaugh, M.J. (2009). Expression of anti-apoptosis genes alters lactate metabolism of Chinese Hamster Ovary cells in culture. *Biotechnology and bioengineering* *103*, 592-608.
- Ecker, D.M., Jones, S.D., and Levine, H.L. (2015). The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs* *7*, 9-14.
- Elias, C.B., Carpentier, E., Durocher, Y., Bisson, L., Wagner, R., and Kamen, A. (2003). Improving glucose and glutamine metabolism of human HEK 293 and *Trichoplusia ni* insect cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme. *Biotechnology progress* *19*, 90-97.
- Elvin, J.G., Couston, R.G., and van der Walle, C.F. (2013). Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *Int J Pharm* *440*, 83-98.
- Fan, Y., Jimenez, D.V., I, Müller, C., Wagtberg Sen, J., Rasmussen, S., Kontoravdi, C., Weilguny, D., and Andersen, M. (2015). Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation. *biotechnology and bioengineering* *112*, 521-535.
- Ferrara, C., Brunker, P., Suter, T., Moser, S., Puntener, U., and Umana, P. (2006). Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous beta1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi alpha-mannosidase II. *Biotechnol Bioeng* *93*, 851-861.
- Fitzpatrick, L., Jenkins, H.A., and Butler, M. (1993). Glucose and glutamine metabolism of a murine B-lymphocyte hybridoma grown in batch culture. *Appl Biochem Biotechnol.* *43*.
- Fogolín, M.B., Wagner, R., Etcheverrigaray, M., and Kratje, R. (2004). Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *Journal of biotechnology* *109*, 179-191.
- Fox, S.R., Tan, H.K., Tan, M.C., Wong, S.C.N.C., Yap, M.G.S., and Wang, D.I.C. (2005). A detailed understanding of the enhanced hypothermic productivity of interferon- γ by Chinese-hamster ovary cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.* *41*, 255-264.
- Gagnon, M., Hiller, G., Luan, Y.T., Kittredge, A., DeFelice, J., and Drapeau, D. (2011). High-end pH-controlled delivery of glucose effectively suppresses lactate accumulation in CHO fed-batch cultures. *Biotechnol Bioeng* *108*, 1328-1337.
- Gawlitzeck, M., Ryll, T., Lofgren, J., and Sliwkowski, M. (2000). Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: degradative versus biosynthetic mechanisms. *Biotechnology and bioengineering* *68*, 637-646.

- Gawlitzeck, M., Valley, U., and Wagner, R. (1997). Ammonium Ion and Glucosamine Dependent Increases of Oligosaccharide Complexity in Recombinant. *Biotechnol Bioeng* 57.
- Genzel, Y., Ritter, J., König, S., Alt, R., and Reichl, U. (2005). Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. *Biotechnology progress* 21, 58-69.
- Godia, F., and Cairo, J.J. (2006). Cell Metabolism. In *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell- Based Therapies*. S.S. Ozturk, and W.-S. Hu, eds. (Taylor and Francis group).
- Goudar, C., Biener, R., Boisart, C., Heidemann, R., Piret, J., de Graaf, A., and Konstantinov, K. (2010). Metabolic flux analysis of CHO cells in perfusion culture by metabolite balancing and 2D [¹³C, ¹H] COSY NMR spectroscopy. *Metab Eng* 12, 138-149.
- Grainger, R.K., and James, D.C. (2013). CHO cell line specific prediction and control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation. *Biotechnol Bioeng* 110, 2970-2983.
- Gramer, M.J., Eckblad, J.J., Donahue, R., Brown, J., Shultz, C., Vickerman, K., Priem, P., van den Bremer, E.T., Gerritsen, J., and van Berkel, P.H. (2011). Modulation of antibody galactosylation through feeding of uridine, manganese chloride, and galactose. *Biotechnol Bioeng* 108, 1591-1602.
- Grammatikos, S.I., Valley, U., Nimtz, M., Conradt, H.S., and Wagner, R. (1998). Intracellular UDP-N-Acetylhexosamine Pool Affects N-Glycan Complexity: A Mechanism of Ammonium Action on Protein Glycosylation. *Biotechnol. Prog.* 14, 410-419.
- Ha, T.K., Kim, Y.G., and Lee, G.M. (2015). Understanding of altered N-glycosylation-related gene expression in recombinant Chinese hamster ovary cells subjected to elevated ammonium concentration by digital mRNA counting. *Biotechnol Bioeng* 112, 1583-1593.
- Halestrap, A.P. (2012). The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB Life* 64, 1-9.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Bajyana Songa, E., Bandahman, N., and Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Letters to Nature* 363, 446-448.
- Hassel, I.T., and Butler, M. (1990). Adaptation to non-ammoniogenic medium and selective substrate feeding lead to enhanced yields in animal cell cultures. *Journal of cell science* 96, 501-508.
- Hayter, P.M., Curling, E.M.A., Baines, A.J., Jenkins, N., Salmon, I., Strange, P.G., Tong, J.M., and Bull, A.T. (1992). Glucose-Limited Chemostat Culture of Chinese Hamster Ovary Cells Producing. *Biotechnology and bioengineering* 39, 327-335.
- Heath, C., and Kiss, R. (2007). *Cell Culture Process Development: Advances in Process Engineering*. *Biotechnol Prog* 23, 46-51.

- Henry, O., and Durocher, Y. (2011). Enhanced glycoprotein production in HEK-293 cells expressing pyruvate carboxylase. *Metabolic engineering* 13, 499-507.
- Hodoniczky, J., Zhi Zheng, Y., and James, D.C. (2005). Control of Recombinant Monoclonal Antibody Effector Functions by Fc N-Glycan Remodeling in Vitro. *Biotechnol Prog* 21, 1644-1652.
- Holliger, P., and Hudson, P.J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature biotechnology* 23, 1126-1136.
- Houde, D., Peng, Y., Berkowitz, S.A., and Engen, J.R. (2010). Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *Mol Cell Proteomics* 9, 1716-1728.
- Imai-Nishiya, H., Mori, K., Inoue, M., Wakitani, M., Iida, S., Shitara, K., and Satoh, M. (2007). Double knockdown of alpha1,6-fucosyltransferase (FUT8) and GDP-mannose 4,6-dehydratase (GMD) in antibody-producing cells: a new strategy for generating fully non-fucosylated therapeutic antibodies with enhanced ADCC. *BMC Biotechnol* 7, 84.
- Irani, N., Beccaria, A.J., and Wagner, R. (2002). Expression of recombinant cytoplasmic yeast pyruvate carboxylase for the improvement of the production of human erythropoietin by recombinant BHK-21 cells. *Journal of biotechnology* 93, 269-282.
- Irani, N., Wirth, M., van Den Heuvel, J., and Wagner, R. (1999). Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnology and bioengineering* 66, 238-246.
- Jefferis, R. (2009). Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 8, 226-234.
- Jeong, D.-w., Cho, I.T., Kim, T.S., Bae, G.W., Kim, I.-H., and Kim, I.Y. (2006). Effects of lactate dehydrogenase suppression and glycerol-3-phosphate dehydrogenase overexpression on cellular metabolism. *Molecular and cellular biochemistry* 284, 1-8.
- Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., and Ravtech, J.V. (2006). Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Sciences* 213, 670-673.
- Kaneko, Y., Sato, R., and Aoyagi, H. (2010). Changes in the quality of antibodies produced by Chinese hamster ovary cells during the death phase of cell culture. *Journal of bioscience and bioengineering* 109, 281-287.
- Karst, D.J., Steinebach, F., Soos, M., and Morbidelli, M. (2016). Process performance and product quality in an integrated continuous antibody production process. *Biotechnol Bioeng*.
- Kawamoto, T., Denry Sato, J., Le, A., Pollikof, J., Sato, G.H., and Mendelsohn, J. (1983). Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: Identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1337-1341.

- Khoo, S.H., and Al-Rubeai, M. (2009). Metabolic characterization of a hyper-productive state in an antibody producing NS0 myeloma cell line. *Metab Eng 11*, 199-211.
- Kildegaard, H.F., Fan, Y., Sen, J.W., Larsen, B., and Andersen, M.R. (2016). Glycoprofiling effects of media additives on IgG produced by CHO cells in fed-batch bioreactors. *Biotechnol Bioeng 113*, 359-366.
- Kim, S.H., and Lee, G.M. (2007a). Down-regulation of lactate dehydrogenase-A by siRNAs for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Applied microbiology and biotechnology 74*, 152-159.
- Kim, S.H., and Lee, G.M. (2007b). Functional expression of human pyruvate carboxylase for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells (DG44). *Applied microbiology and biotechnology 76*, 659-665.
- Kishishita, S., Katayama, S., Kodaira, K., Takagi, Y., Matsuda, H., Okamoto, H., Takuma, S., Hirashima, C., and Aoyagi, H. (2015). Optimization of chemically defined feed media for monoclonal antibody production in Chinese hamster ovary cells. *Journal of bioscience and bioengineering 120*, 78-84
- Korke, R., Gatti, M.D.L., Lau, A.L.Y., Lim, J.W.E., Seow, T.K., Chung, M.C.M., and Hu, W.-S. (2004). Large scale gene expression profiling of metabolic shift of mammalian cells in culture. *Journal of Biotechnology 107*, 1-17.
- Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Gatter, K.C., Trarbach, T., Folprecht, G., Shi, M.M., Lebowitz, D., Jalava, T., Laurent, D., et al. (2011). Prognostic and predictive role of lactate dehydrogenase 5 expression in colorectal cancer patients treated with PTK787/ZK 222584 (vatalanib) antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res 17*, 4892-4900.
- Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Winter, S., Leek, R., Sivridis, E., and Harris, A.L. (2009). Lactate dehydrogenase 5 expression in squamous cell head and neck cancer relates to prognosis following radical or postoperative radiotherapy. *Oncology 77*, 285-292.
- Kumar, N., Gammell, P., and Clynes, M. (2007). Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture : A summary of recent methods employed and the effects of proliferation control in product secreting CHO cell lines. *Cytotechnology 53*, 33-46.
- Kunert, R., and Reinhart, D. (2016). Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl Microbiol Biotechnol 100*, 3451-3461.
- Kurano, N., Leist, C., Messi, F., Kurano, S., and Fiechter, a. (1990). Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor. 2. Effects of medium components and waste products. *Journal of biotechnology 15*, 113-128.

- Kuwae, S., Ohda, T., Tamashima, H., Miki, H., and Kobayashi, K. (2005). Development of a fed-batch culture process for enhanced production of recombinant human antithrombin by Chinese hamster ovary cells. *Journal of bioscience and bioengineering* *100*, 502-510.
- Lao, M.-S., and Toth, D. (1997). Effects of Ammonium and Lactate on Growth and Metabolism of a Recombinant Chinese Hamster Ovary Cell Culture. *Biotechnology Progress* *13*, 688-691.
- Le, A., Lane, A.N., Hamaker, M., Bose, S., Gouw, A., Barbi, J., Tsukamoto, T., Rojas, C.J., Slusher, B.S., Zhang, H., et al. (2012a). Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metab* *15*, 110-121.
- Le, H., Kabbur, S., Pollastrini, L., Sun, Z., Mills, K., Johnson, K., Karypis, G., and Hu, W.S. (2012b). Multivariate analysis of cell culture bioprocess data--lactate consumption as process indicator. *J Biotechnol* *162*, 210-223.
- Lipscomb, M.L., Palomares, L.A., Hernandez, V., Ramirez, O.T., and Kompala, D.S. (2005). Effect of Production Method and Gene Amplification on the Glycosylation Pattern of a Secreted Reporter Protein in CHO Cells. *Biotechnol Prog* *21*, 40-49.
- Liste-Calleja, L., Lecina, M., Lopez-Repullo, J., Albiol, J., Sola, C., and Cairo, J.J. (2015). Lactate and glucose concomitant consumption as a self-regulated pH detoxification mechanism in HEK293 cell cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* *99*, 9951-9960.
- Liu, B., Spearman, M., Doering, J., Lattová, E., Perreault, H., and Butler, M. (2014). The availability of glucose to CHO cells affects the intracellular lipid-linked oligosaccharide distribution, site occupancy and the N-glycosylation profile of a monoclonal antibody. *Journal of Biotechnology* *170*, 17-27.
- Liu, J., Wang, J., Fan, L., Chen, X., Hu, D., Deng, X., Poon, H.F., Wang, H., Liu, X., and Tan, W.-S. (2015). Galactose supplementation enhance sialylation of recombinant Fc-fusion protein in CHO cell: an insight into the role of galactosylation in sialylation. *World J Microbiol Biotechnol* *31*, 1147-1156.
- Lu, F., Toh, P.C., Burnett, I., Li, F., Hudson, T., Amanullah, A., and Li, J. (2013). Automated dynamic fed-batch process and media optimization for high productivity cell culture process development. *Biotechnology and bioengineering* *110*, 191-205.
- Luo, J., Vijayasankaran, N., Autsen, J., Santuray, R., Hudson, T., Amanullah, A., and Li, F. (2012). Comparative metabolite analysis to understand lactate metabolism shift in Chinese hamster ovary cell culture process. *Biotechnology and bioengineering* *109*, 146-156.
- Ma, N., Ellet, J., Okediadi, C., Hermes, P., McCormick, E., and Casnocha, S. (2009). A single nutrient feed supports both chemically defined NS0 and CHO fed-batch processes: Improved productivity and lactate metabolism. *Biotechnology progress* *25*, 1353-1363.
- Malphettes, L., Freyvert, Y., Chang, J., Liu, P.Q., Chan, E., Miller, J.C., Zhou, Z., Nguyen, T., Tsai, C., Snowden, A.W., et al. (2010). Highly efficient deletion of FUT8 in CHO cell lines using

zinc-finger nucleases yields cells that produce completely nonfucosylated antibodies. *Biotechnol Bioeng* *106*, 774-783.

- Mancuso, A., Sharfstein, S.T., Tucker, S.N., Clark, D.S., and Blanch, H.W. (1994). Examination of Primary Metabolic Pathways in a Murine Hybridoma with Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biotechnol Bioeng* *44*, 563-585.
- Maranga, L., and Goochee, C.F. (2006). Metabolism of PER.C6 cells cultivated under fed-batch conditions at low glucose and glutamine levels. *Biotechnol Bioeng* *94*, 139-150.
- Martínez, V.S., Dietmair, S., Quek, L.-E., Hodson, M.P., Gray, P., and Nielsen, L.K. (2013). Flux balance analysis of CHO cells before and after a metabolic switch from lactate production to consumption. *Biotechnology and bioengineering* *110*, 660-666.
- Mathupala, S.P., Ko, Y.H., and Pedersen, P.L. (2006). Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene* *25*, 4777-4786.
- McCracken, N.A., Kowle, R., and Ouyang, A. (2014). Control of galactosylated glycoforms distribution in cell culture system. *Biotechnol Prog* *30*, 547-553.
- Metallo, C.M., Gameiro, P.A., Bell, E.L., Mattaini, K.R., Yang, J., Hiller, K., Jewell, C.M., Johnson, Z.R., Irvine, D.J., Guarente, L., et al. (2011). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* *481*, 380-384.
- Metallo, C.M., Walther, J.L., and Stephanopoulos, G. (2009). Evaluation of 13C isotopic tracers for metabolic flux analysis in mammalian cells. *J Biotechnol* *144*, 167-174.
- Mimura, Y., Sondermann, P., Ghirlando, R., Lund, J., Young, S.P., Goodall, M., and Jefferis, R. (2001). Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in Fc gamma RIIb binding. *J Biol Chem* *276*, 45539-45547.
- Minchinton, A.I., and Tannock, I.F. (2006). Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* *6*, 583-592.
- Mori, K., Kuni-Kamochi, R., Yamane-Ohnuki, N., Wakitani, M., Yamano, K., Imai, H., Kanda, Y., Niwa, R., Iida, S., Uchida, K., et al. (2004). Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize effector function of produced antibodies using FUT8 siRNA. *Biotechnol Bioeng* *88*, 901-908.
- Mueckler, M., and Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med* *34*, 121-138.
- Mulukutla, B.C., Gramer, M., and Hu, W.-S. (2012). On metabolic shift to lactate consumption in fed-batch culture of mammalian cells. *Metabolic engineering* *14*, 138-149.

- Mulukutla, B.C., Khan, S., Lange, A., and Hu, W.S. (2010). Glucose metabolism in mammalian cell culture: new insights for tweaking vintage pathways. *Trends Biotechnol* 28, 476-484.
- Mulukutla, B.C., Yongky, A., Daoutidis, P., and Hu, W.S. (2014). Bistability in glycolysis pathway as a physiological switch in energy metabolism. *PloS one* 9, e98756.
- Mulukutla, B.C., Yongky, A., Grimm, S., Daoutidis, P., and Hu, W.S. (2015). Multiplicity of steady states in glycolysis and shift of metabolic state in cultured mammalian cells. *PloS one* 10, e0121561.
- Muthing, J., Kemminer, S.E., Conradt, H.S., Sagi, D., Nimtz, M., Karst, U., and Peter-Katalinic, J. (2003). Effects of buffering conditions and culture pH on production rates and glycosylation of clinical phase I anti-melanoma mouse IgG3 monoclonal antibody R24. *Biotechnol Bioeng* 83, 321-334.
- Nadeau, I., Sabatie, J., Koehl, M., Perrier, M., and Kamen, A. (2000). Human 293 cell metabolism in low glutamine-supplied culture: interpretation of metabolic changes through metabolic flux analysis. *Metab Eng* 2, 277-292.
- Neermann, J., and Wagner, R. (1996). Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *Journal of Cellular Physiology* 166, 152-169.
- Niklas, J., Melnyk, A., Yuan, Y., and Heinzle, E. (2011). Selective permeabilization for the high-throughput measurement of compartmented enzyme activities in mammalian cells. *Analytical biochemistry* 416, 218-227.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2007). The antiinflammatory activity of IgG: the intravenous IgG paradox. *J Exp Med* 204, 11-15.
- Niwa, R., Sakurada, M., Kobayashi, Y., Uehara, A., Matsushima, K., and Shitara, K. (2005). Enhanced Natural Killer Cell Binding and Activation by Low-Fucose IgG1 Antibody Results in Potent Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Induction at Lower Antigen Density. *Clinical Cancer Research* 11, 2327-2336.
- Noh, K., and Wiechert, W. (2006). Experimental design principles for isotopically instationary ¹³C labeling experiments. *Biotechnol Bioeng* 94, 234-251.
- Nolan, R.P., and Lee, K. (2011). Dynamic model of CHO cell metabolism. *Metab Eng* 13, 108-124.
- Nyberg, G.B., Barcarcel, R.R., Follstad, B.D., Stephanopoulos, G., and Wang, D.I.C. (1998). Metabolic Effects on Recombinant Interferon- γ Glycosylation in Continuous Culture of Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnol Bioeng* 62, 336-347.
- Oguchi, S., Saito, H., Tsukahara, M., and Tsumura, H. (2006). pH Condition in temperature shift cultivation enhances cell longevity and specific hMab productivity in CHO culture. *Cytotechnology* 52, 199-207.

- Omasa, T., Higashiyama, K., Shioya, S., and Suga, K. (1991). Effects of Lactate Concentration on Hybridoma Culture in Lactate-Controlled Fed-Batch Operation. *Biotechnology and bioengineering* 39, 556-564.
- Omasa, T., Ishimoto, M., Higashiyama, K.-i., Shioya, S., and Suga, K.-i. (1992). The enhancement of specific antibody production rate in glucose- and glutamine-controlled fed-batch culture. *Cytotechnology* 8, 75-84.
- Omidfar, K., and Shirvani, Z. (2012). Single domain antibodies: a new concept for epidermal growth factor receptor and EGFRvIII targeting. *DNA and cell biology* 31, 1015-1026.
- Onitsuka, M., Kim, W.D., Ozaki, H., Kawaguchi, A., Honda, K., Kajiura, H., Fujiyama, K., Asano, R., Kumagai, I., Ohtake, H., et al. (2012). Enhancement of sialylation on humanized IgG-like bispecific antibody by overexpression of alpha2,6-sialyltransferase derived from Chinese hamster ovary cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 94, 69-80.
- Ozturk, S., Riley, M., and Palsson, B. (1992). Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnology and bioengineering* 39, 418-431.
- Paredes, C., Prats, E., Cairó, J., Azorín, F., Cornudella, L., and F, G. (1999). Modification of glucose and glutamine metabolism in hybridoma cells through metabolic engineering. *Cytotechnology* 30, 85-93.
- Pascoe, D.E., Arnott, D., Papoutsakis, E.T., Miller, W.M., and Andersen, D.C. (2007). Proteome analysis of antibody-producing CHO cell lines with different metabolic profiles. *Biotechnol Bioeng* 98, 391-410.
- Pavlou, A.K., and Reichert, J.M. (2004). Recombinant protein therapeutics—success rates, market trends and values to 2010. *Nature biotechnology* 22, 1513-1519.
- Pochini, L., Scalise, M., Galluccio, M., and Indiveri, C. (2014). Membrane transporters for the special amino acid glutamine: structure/function relationships and relevance to human health. *Front Chem* 2, 61.
- Porporato, P.E., Dhup, S., Dadhich, R.K., Copetti, T., and Sonveaux, P. (2011). Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol* 2, 49.
- Quek, L.E., Dietmair, S., Kromer, J.O., and Nielsen, L.K. (2009). Metabolic flux analysis in mammalian cell culture. *Metab Eng* 12, 161-171.
- Raymond, C., Robotham, A., Spearman, M., Butler, M., Kelly, J., and Durocher, Y. (2015). Production of alpha2,6-sialylated IgG1 in CHO cells. *MAbs* 7, 571-583.
- Rearick, J.I., Chapmann, A., and Kornfeld, S. (1981). Glucose Starvation Alters Lipid-linked Oligosaccharide Biosynthesis in Chinese Hamster Ovary Cells. *J Biol Chem* 256, 6255-6261.
- Reichert, J.M. (2012). Marketed therapeutic antibodies compendium. *MAbs* 4, 413-415.

- Rivinoja, A., Hassinen, A., Kokkonen, N., Kauppila, A., and Kellokumpu, S. (2009). Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases. *J Cell Physiol* 220, 144-154.
- Ryll, T., Valley, U., and Wagner, R. (1994). Biochemistry of Growth Inhibition by Ammonium Ions in Mammalian Cells. *Biotechnol Bioeng* 44, 184-193.
- Sanfeliu, A., Paredes, C., Cairo, J.J., and Gbdia, F. (1997). Identification of key patterns in the metabolism of hybridoma cells in culture. *Enzyme Microb. Technol.* 11, 420-428.
- Sato, J.D., Kawamoto, T., Le, A.D., Mendelsohn, J., Polikoff, J., and Sato, G.H. (1988). Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors. *Mol. Biol. Med.* 1, 511-529.
- Scallon, B.J., Tam, S.H., McCarthy, S.G., Cai, A.N., and Raju, T.S. (2007). Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Mol Immunol* 44, 1524-1534.
- Sengupta, N., Rose, S.T., and Morgan, J.A. (2011). Metabolic flux analysis of CHO cell metabolism in the late non-growth phase. *Biotechnology and Bioengineering* 108, 82-92.
- Sharfstein, S.T., Tucker, S.N., Mancuso, A., Blanch, H.W., and Clark, D.S. (1994). Quantitative In Vivo Nuclear Magnetic Resonance Studies of Hybridoma Metabolism. *Biotechnol Bioeng* 43, 1059-1074.
- Shields, R.L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L.Y., Hong, K., Meng, Y.G., Weikert, S.H., and Presta, L.G. (2002). Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 277, 26733-26740.
- Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M., et al. (2003). The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* 278, 3466-3473.
- St Amand, M.M., Radhakrishnan, D., Robinson, A.S., and Ogunnaike, B.A. (2014). Identification of manipulated variables for a glycosylation control strategy. *Biotechnol Bioeng* 111, 1957-1970.
- Sun, T., Li, C., Han, L., Jiang, H., Xie, Y., Zhang, B., Qian, X., Lu, H., and Zhu, J. (2015). Functional knockout of FUT8 in Chinese hamster ovary cells using CRISPR/Cas9 to produce a defucosylated antibody. *Engineering in Life Sciences* 15, 660-666.
- Surve, T., and Gadgil, M. (2015). Manganese increases high mannose glycoform on monoclonal antibody expressed in CHO when glucose is absent or limiting: Implications for use of alternate sugars. *Biotechnol Prog* 31, 460-467.

- Suzuki, E., Niwa, R., Saji, S., Muta, M., Hirose, M., Iida, S., Shiotsu, Y., Satoh, M., Shitara, K., Kondo, M., et al. (2007). A nonfucosylated anti-HER2 antibody augments antibody-dependent cellular cytotoxicity in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* *13*, 1875-1882.
- Templeton, N., Dean, J., Reddy, P., and Young, J.D. (2013). Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture. *Biotechnol Bioeng* *110*, 2013-2024.
- Templeton, N., Lewis, A., Dorai, H., Qian, E.A., Campbell, M.P., Smith, K.D., Lang, S.E., Betenbaugh, M.J., and Young, J.D. (2014). The impact of anti-apoptotic gene Bcl-2 expression on CHO central metabolism. *Metab Eng* *25*, 92-102.
- Thangaraju, M., Gopal, E., Martin, P.M., Ananth, S., Smith, S.B., Prasad, P.D., Sterneck, E., and Ganapathy, V. (2006). SLC5A8 triggers tumor cell apoptosis through pyruvate-dependent inhibition of histone deacetylases. *Cancer Res* *66*, 11560-11564.
- Thomann, M., Schlothauer, T., Dashivets, T., Malik, S., Avenal, C., Bulau, P., Ruger, P., and Reusch, D. (2015). In vitro glycoengineering of IgG1 and its effect on Fc receptor binding and ADCC activity. *PloS one* *10*, e0134949.
- Toussaint, C., Henry, O., and Durocher, Y. (2015). Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology* *10*, 122-131.
- Tsao, Y.S., Cardoso, A.G., Condon, R.G., Voloch, M., Lio, P., Lagos, J.C., Kearns, B.G., and Liu, Z. (2005). Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism. *J Biotechnol* *118*, 316-327.
- Umanà, P., Jean-Mairet, J., Moudry, R., Amstutz, H., and Bailey, J.E. (1998). Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibodydependent cellular cytotoxic activity. *Nature biotechnology* *17*, 176-180.
- Vallée, C., Durocher, Y., and Henry, O. (2013). Exploiting the metabolism of PYC expressing HEK293 cells in fed-batch cultures. *Journal of biotechnology* *169*, 63-70.
- van der Linden, R.H., Frenken, L.G., de Geus, B., Harmsen, M.M., Ruuls, R.C., Stok, W., de Ron, L., Wilson, S., Davis, P., and Verrips, C.T. (1999). Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochimica et biophysica acta* *1431*, 37-46.
- Vergara, M., Becerra, S., Berrios, J., Osses, N., Reyes, J., Rodriguez-Moya, M., Gonzalez, R., and Altamirano, C. (2014). Differential effect of culture temperature and specific growth rate on CHO cell behavior in chemostat culture. *PloS one* *9*, e93865.
- Vijayasankaran, N., Li, J., Shawley, R., Chen, A., Shiratori, M., Gawlitek, M., Li, F., Kiss, R., and Amanullah, A. (2010). Animal cell culture media. In *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. M.C. Flickinger, ed.

- Villacres, C., Tayi, V.S., Lattova, E., Perreault, H., and Butler, M. (2015). Low glucose depletes glycan precursors, reduces site occupancy and galactosylation of a monoclonal antibody in CHO cell culture. *Biotechnol J* *10*, 1051-1066.
- Villiger, T.K., Steinhoff, R.F., Ivarsson, M., Solacroup, T., Stettler, M., Broly, H., Krismer, J., Pabst, M., Zenobi, R., Morbidelli, M., et al. (2016). High-throughput profiling of nucleotides and nucleotide sugars to evaluate their impact on antibody N-glycosylation. *J Biotechnol* *229*, 3-12.
- Wahrheit, J., Niklas, J., and Heinzle, E. (2014). Metabolic control at the cytosol-mitochondria interface in different growth phases of CHO cells. *Metab Eng* *23*, 9-21.
- Walsh, G. (2014). biopharmaceutical benchmark 2014. *Nature biotechnology* *32*, 992-1000.
- Wang, W., Wang, E.Q., and Balthasar, J.P. (2008). Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* *84*, 548-558.
- Weikert, S.H., Papac, D., Briggs, J., Cowfer, D., Tom, S., Gawlitek, M., Lofgren, J., Mehta, S., Christholm, V., Modi, N., et al. (1999). Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize sialic acid content of recombinant glycoproteins. *Nature biotechnology* *17*, 1116-1121.
- Wiechert, W. (2001). ¹³C metabolic flux analysis. *Metab Eng* *3*, 195-206.
- Wilkins, C.A., and Gerdtzen, Z.P. (2015). Comparative metabolic analysis of CHO cell clones obtained through cell engineering, for IgG productivity, growth and cell longevity. *PloS one* *10*, e0119053.
- Wilson, R.H., and Bebbington, C.R. (1992). Method for dominant selection in eucaryotic cells. (Google Patents).
- Wlaschin, K.F., and Hu, W.-S. (2006). Fedbatch Culture and Dynamic Nutrient Feeding. *101*, 43-74.
- Wlaschin, K.F., and Hu, W.-S. (2007). Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport. *Journal of biotechnology* *131*, 168-176.
- Wong, N., De Melo, J., and Tang, D. (2013). PKM2, a Central Point of Regulation in Cancer Metabolism. *Int J Cell Biol* *2013*, 242513.
- Wurm, F.M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* *22*, 1393-1398.
- Xie, L., Nyberg, G., Gu, X., Li, H., Möllborn, F., and Wang, D.I. (1997). Gamma-interferon production and quality in stoichiometric fed-batch cultures of Chinese hamster ovary (CHO) cells under serum-free conditions. *Biotechnology and bioengineering* *56*, 577-582.
- Xie, L., and Wang, D.I.C. (1993). Stoichiometric Analysis of Animal Cell Growth and Its Application in Medium Design. *Biotechnol Bioeng* *43*, 1164-1174.

- Xu, S., Hoshan, L., and Chen, H. (2016). Improving lactate metabolism in an intensified CHO culture process: productivity and product quality considerations. *Bioprocess Biosyst Eng* 39, 689–1702.
- Yalcin, A., Telang, S., Clem, B., and Chesney, J. (2009). Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer. *Exp Mol Pathol* 86, 174-179.
- Yamane-Ohnuki, N., Kinoshita, S., Inoue-Urakubo, M., Kusunoki, M., Iida, S., Nakano, R., Wakitani, M., Niwa, R., Sakurada, M., Uchida, K., et al. (2004). Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnol Bioeng* 87, 614-622.
- Yang, M., and Butler, M. (1999). Effects of Ammonia on CHO Cell Growth, Erythropoietin Production, and Glycosylation. *Biotechnol Bioeng* 68, 370-380.
- Yang, M., and Butler, M. (2002). Effects of ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms. *Biotechnology progress* 18, 129-138.
- Yip, S.M.S., Snedecor, B., Zhou, M., Shen, A., Joly, J., and Crawford, Y. (2014). Complete Knockout of the Lactate Dehydrogenase A Gene is Lethal in Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1, 2, 3 Down-Regulated CHO Cells. *Mol Biotechnol* 56, 833-836.
- Yoon, S.K., Choi, S.L., Song, J.Y., and Lee, G.M. (2005). Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese hamster ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0 degrees C. *Biotechnol Bioeng* 89, 345-356.
- Yoon, S.K., Hong, J.K., Choo, S.H., Song, J.Y., Park, H.W., and Lee, G.M. (2006). Adaptation of Chinese hamster ovary cells to low culture temperature: cell growth and recombinant protein production. *Journal of biotechnology* 122, 463-472.
- Yoon, S.K., Song, J.Y., and Lee, G.M. (2003). Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 82, 289-298.
- Yu, X., Vasiljevic, S., Mitchell, D.A., Crispin, M., and Scanlan, C.N. (2013). Dissecting the molecular mechanism of IVIg therapy: the interaction between serum IgG and DC-SIGN is independent of antibody glycoform or Fc domain. *J Mol Biol* 425, 1253-1258.
- Yuk, I.H., Russell, S., Tang, Y., Hsu, W.-t., Mauger, J.B., Aulakh, R.P.S., Jun, L., Gawlitzek, M., and Joly, J.C. (2014). Effects of Copper on CHO Cells : Cellular Requirements and Product Quality Considerations. *Biotechnology progress*, 1-13.
- Zagari, F., Jordan, M., Stettler, M., Broly, H., and Wurm, F.M. (2013a). Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. *New biotechnology* 30, 238-245.
- Zagari, F., Stettler, M., Baldi, L., Broly, H., Wurm, F., and Jordan, M. (2013b). High expression of aspartate glutamate carrier aralar1 favors lactate consumption in CHO cell culture. *Pharmaceut Bioprocessing* 1, 19-27.

- Zalai, D., Koczka, K., Parta, L., Wechselberger, P., Klein, T., and Herwig, C. (2015). Combining mechanistic and data-driven approaches to gain process knowledge on the control of the metabolic shift to lactate uptake in a fed-batch CHO process. *Biotechnol Prog* *31*, 1657-1668.
- Zhang, F., Sun, X., Yi, X., and Zhang, Y. (2006). Metabolic characteristics of recombinant Chinese hamster ovary cells expressing glutamine synthetase in presence and absence of glutamine. *Cytotechnology* *51*, 21-28.
- Zhao, F., and Keating, A.F. (2007). Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. *Current Genomics* *8*, 113-128.
- Zhou, M., Crawford, Y., Ng, D., Tung, J., Pynn, A.F.J., Meier, A., Yuk, I.H., Vijayasankaran, N., Leach, K., Joly, J., et al. (2011). Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. *Journal of biotechnology* *153*, 27-34.
- Zhou, W., Rehm, J., and Hu, W. (1995). High viable cell concentration fed-batch cultures of hybridoma cells through on-line nutrient feeding. *Biotechnology and bioengineering* *46*, 579-587.

Annexe 1 : Données supplémentaires relatives au chapitre 2

Table S1: Network reaction and carbon atom transitions

Reactions	Carbone transition
Glycolysis	
GLC → G6P	abcdef → abcdef
G6P → F6P	abcdef → abcdef
F6P → GAP + GAP	abcdef → cba + def
GAP → PYR	abc → abc
PYR ↔ LAC	abc ↔ abc
PYR → PYRm	abc → abc
TCA cycle	
PYRm → AcCOAm + CO	abc → bc + a
AcCOAm + MALm → CIT m	ab + cdef → fedbac
CITm → αKGm + CO	abcdef → abcde + f
αKGm → SUCm + CO	abcde → bcde + a
SUCm ↔ ½ MALm + ½ MALm	abcd ↔ ½ abcd + ½ dcba
CITm + MAL → CIT + MALm	abcdef + ghij → abcdef + ghij
Anaplerosis/cataplerosis	
PYRm + COin → OAA	abc + d → abcd
PYR + COin → OAA	abc + d → abcd
MALm ↔ MAL	abcd ↔ abcd
OAA ↔ MAL	abcd ↔ abcd
MAL → PYR + CO	abcd → abc + d
GLU → αKGm	abcde → abcde
CIT → AcCOAc + OAA	abcdef → ed + fcba
Fatty acids metabolism	
AcCOAc → FA	ab → ab
GAP → GLP	abc → abc
Amino Acids reactions	
ASP + αKGm ↔ OAA + GLU	abcd + efghi → abcd + efghi
PYRm + GLU ↔ ALA + αKGm	abc → abc
GLN → GLU	abcde → abcde
ASN → ASP	abcd → abcd
SER, GLY ↔ PYR	abc ↔ abc
VAL, MET, ILE → SUCm	abcd → abcd
LEU, LYS, ILE, Phe, TYR, THR → AcCOAm	ab → ab
HIS, ARG, PRO → GLU	abcde → abcde
Biomass and product biosynthesis	
0.912 PROTEIN + 0.0315 P5P +	
0.0379 G6P + 0.317 AcCOA +	
0.0151 GAP → BIOMASS	
0.0585 ALA + 0.0226 ARG +	
0.0449 ASN + 0.0365 ASP +	
0.0252 CYS + 0.0400 GLN +	
0.0518 GLU + 0.0660 GLY +	
0.0229 HIS + 0.0329 ILE +	
0.0630 LEU + 0.0608 LYS +	
0.0128 MET + 0.0415 PHE +	
0.0717 PRO + 0.0106 SER +	
0.1056 THR + 0.0224 TRP +	
0.0288TYR + 0.0857 VAL →	
ANTIBODY	

Table S2: Mass isotopomer distribution of intracellular metabolites for ³-¹³C lactate

		Exponential phase				Stationary phase			
		Parental		PYC2		Parental		PYC2	
		12h	24h	12h	24h	12h	24h	12h	24h
Lactate	m	0.63	0.67	0.83	0.80	0.67	0.71	0.89	0.84
	m+1	0.37	0.33	0.17	0.20	0.33	0.28	0.11	0.16
	m+2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
	m+3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Alanine	m	0.72	0.72	0.73	0.77	0.74	0.74	0.66	0.77
	m+1	0.28	0.22	0.24	0.20	0.26	0.26	0.30	0.23
	m+2	0.00	0.06	0.04	0.03	0.00	0.00	0.04	0.00
	m+3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Aspartate	m	0.72	0.73	0.76	0.76	0.67	0.68	0.64	0.75
	m+1	0.21	0.20	0.20	0.20	0.23	0.22	0.30	0.21
	m+2	0.07	0.05	0.03	0.03	0.09	0.10	0.07	0.04
	m+3	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
	m+4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Glutamate	m	0.65	0.59	0.71	0.71	0.45	0.51	0.48	0.57
	m+1	0.24	0.28	0.22	0.23	0.34	0.32	0.35	0.31
	m+2	0.09	0.10	0.06	0.06	0.15	0.11	0.14	0.09
	m+3	0.02	0.03	0.01	0.01	0.06	0.06	0.03	0.02
	m+4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	m+5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Table S3: Calculated fluxes (in pmol/cell.d) and associated confidence intervals for parental and PYC2 cell line during exponential phase.

	Biochemical reactions	Parental		PYC2	
		Flux	Confidence 95 %	Flux	Confidence 95 %
v1	GLC → G6P	1.63	[1.44 , 1.76]	2.36	[1.98 , 2.42]
v2	G6P → TC	0.04	[0.03 , 0.05]	0.05	[0.04 , 0.06]
v3	AcCOAc → FA	0.33	[0.30 , 0.36]	0.50	[0.45 , 0.55]
v4	GAP → GLP	0.01	[0.01 , 0.03]	0.02	[0.01 , 0.03]
v5	GLN _{ext} → GLN	0.80	[0.72 , 0.88]	0.59	[0.54 , 0.66]
v6	HIS, ARG, PRO → GLU	0.20	[0.18 , 0.22]	0.30	[0.27 , 0.33]
v7	GLU → GLU _{ex}	0.17	[0.15 , 0.18]	0.15	[0.14 , 0.17]
v8	ALA → ALA _{ex}	0.49	[0.45 , 0.55]	0.69	[0.63 , 0.77]
v9	ASP _{ex} → ASP	0.06	[0.00 , 0.20]	-0.50	[-0.55 , -0.45]
v10	ASN _{ex} → ASP	0.59	[0.54 , 0.66]	0.30	[0.27 , 0.33]
v11	VAL, MET, ILE → SUC _m	0.22	[0.15 , 0.35]	0.00	[0.00 , 0.01]
v12	LEU, LYS, ILE, Phe, TYR, THR → AcCOAm	0.72	[0.65 , 0.85]	0.00	[0.00 , 0.01]
v13	SER, GLY → PYR	0.65	[0.25 , 0.75]	-0.35	[-0.39 , -0.32]
v14	G6P → F6P	1.59	[1.30 , 1.63]	2.31	[2.07 , 2.38]
v15	F6P → GAP + GAP	1.59	[1.30 , 1.63]	2.31	[2.07 , 2.38]
v16	GAP → PYR	3.15	[2.58 , 3.25]	4.60	[4.11 , 4.75]
v17	PYR ↔ LAC	0.68	[0.49 , 0.87]	0.99	[0.80 , 1.18]
v18	LAC ↔ LAC _{ex}	0.68	[0.49 , 0.87]	0.98	[0.79 , 1.18]
v19	PYR → PYR _m	4.83	[4.04 , 5.37]	3.21	[2.72 , 4.53]
v20	PYR _m → AcCOAm + CO	4.33	[3.54 , 4.89]	2.52	[2.02 , 2.89]
v21	AcCOAm + MAL _m → CIT _m	5.05	[4.23 , 5.66]	2.52	[2.02 , 2.92]
v22	CIT _m → aKG _m + CO	4.72	[3.90 , 5.33]	2.02	[1.53 , 2.43]
v23	aKG _m → SUC _m + CO	5.55	[4.68 , 6.24]	2.17	[1.62 , 2.67]
v24	SUC _m ↔ 0.5 MAL _m + 0.5 MAL _m	5.78	[4.83 , 6.56]	2.17	[1.62 , 2.67]
v25	CIT _m + MAL → CIT + MAL _m	0.33	[0.30 , 0.36]	0.50	[0.45 , 0.55]
v26	MAL _m ↔ MAL	1.05	[0.87 , 1.25]	0.15	[0.05 , 1.31]
v27	PYR _m + CO _{in} → MAL _m	0.00	[0.00 , 0.00]	0.00	[0.00 , 0.15]
v28	PYR + CO _{in} → OAA	0.00	[0.00 , 0.93]	0.05	[0.00 , 0.75]
v29	CIT → AcCOAc + OAA	0.33	[0.30 , 0.36]	0.5	[0.45 , 0.55]
v30	OAA ↔ MAL	0.97	[0.84 , 1.89]	0.35	[0.17 , 0.35]
v31	MAL → PYR + CO	1.70	[1.41 , 2.68]		[0.00 , 1.09]
v32	GLN → GLU	0.80	[0.72 , 0.88]	0.59	[0.54 , 0.66]
v33	GLU → aKG _m	0.98	[0.77 , 1.22]	0.74	[0.55 , 0.95]
v34	PYR _m + GLU ↔ ALA + aKG _m	0.50	[0.45 , 0.55]	0.69	[0.63 , 0.77]
v35	ASP + aKG _m ↔ OAA + GLU	0.64	[0.64 , 0.83]	-0.20	[-0.28 , -0.12]

Table S4: Calculated fluxes (in pmol/cell.d) and associated confidence intervals for parental and PYC2 cell line during stationary phase.

	Biochemical reactions	Parental		PYC2	
		Flux	Confidence 95 %	Flux	Confidence 95 %
v1	GLC → G6P	1.52	[1.50 , 1.54]	1.00	[0.90 , 1.10]
v2	G6P → TC	0.02	[0.01 , 0.03]	0.01	[0.00 , 0.02]
v3	AcCOAc → FA	0.12	[0.10 , 0.14]	0.10	[0.09 , 0.11]
v4	GAP → GLP	0.01	[0.00 , 0.02]	0.01	[0.00 , 0.02]
v5	GLN _{ext} → GLN	0.08	[0.05 , 0.10]	0.00	[0.00 , 0.01]
v6	GLU → HIS, ARG, PRO	-0.05	[-0.10 , 0.00]	0.20	[0.18 , 0.22]
v7	GLU → GLU _{ex}	0	[0.05 , 0.05]	0.04	[0.03 , 0.05]
v8	ALA → ALA _{ex}	0.05	[0.03 , 0.05]	0	[-0.01 , 0.01]
v9	ASP → ASP _{ex}	0.01	[0.00 , 0.02]	0.10	[0.09 , 0.11]
v10	ASN _{ex} → ASP	0.08	[0.03 , 0.13]	0.15	[0.14 , 0.17]
v11	VAL, MET, ILE → SUC _m	0.25	[0.20 , 0.30]	0.04	[0.03 , 0.05]
v12	LEU, LYS, ILE, Phe, TYR, THR → AcCOAm	0.75	[0.60 , 0.90]	0.70	[0.63 , 0.77]
v13	SER, GLY → PYR	-0.29	[-0.34 , -0.23]	0.50	[0.45 , 0.55]
v14	G6P → F6P	1.50	[1.47 , 1.53]	0.99	[0.88 , 1.10]
v15	F6P → GAP + GAP	1.50	[1.47 , 1.53]	0.99	[0.88 , 1.10]
v16	GAP → PYR	2.99	[2.92 , 3.06]	1.97	[1.74 , 2.20]
v17	PYR ↔ LAC	0.76	[0.56 , 0.96]	-0.70	[-0.89 , -0.51]
v18	LAC ↔ LAC _{ex}	0.76	[0.56 , 0.95]	-0.70	[-0.90 , -0.51]
v19	PYR → PYR _m	2.37	[1.98 , 3.72]	5.21	[3.23 , 5.42]
v20	PYR _m → AcCOAm + CO	2.30	[2.00 , 2.58]	3.62	[3.23 , 3.96]
v21	AcCOAm + MAL _m → CIT _m	3.08	[2.66 , 3.45]	4.32	[3.89 , 4.67]
v22	CIT _m → aKG _m + CO	2.95	[2.54 , 3.34]	4.22	[3.79 , 4.58]
v23	aKG _m → SUC _m + CO	3.01	[2.54 , 3.43]	4.38	[3.94 , 4.74]
v24	SUC _m ↔ 0.5 MAL _m + 0.5 MAL _m	3.26	[2.76 , 3.72]	4.43	[3.98 , 4.84]
v25	CIT _m + MAL → CIT + MAL _m	0.12	[0.10 , 0.14]	0.10	[0.10 , 0.11]
v26	MAL _m ↔ MAL	0.40	[0.15 , 1.68]	1.79	[0.16 , 7.61]
v27	PYR _m + CO _{in} → MAL _m	0.10	[0.00 , 1.36]	1.59	[0.00 , 7.40]
v28	PYR + CO _{in} → OAA	0.00	[0.00 , 0.00]	0.71	[0.00 , 0.71]
v29	CIT → AcCOAc + OAA	0.12	[0.10 , 0.14]	0.10	[0.10 , 0.11]
v30	OAA ↔ MAL	0.15	[0.13 , 0.18]	1.06	[1.06 , 4.21]
v31	MAL → PYR + CO	0.43	[0.18 , 1.71]	2.75	[0.77 , 7.87]
v32	GLN → GLU	0.11	[0.09 , 0.11]	0.00	[0.00 , 0.00]
v33	GLU → aKG _m	0.11	[0.00 , 0.16]	0.41	[0.41 , 0.47]
v34	PYR _m + GLU ↔ ALA + aKG _m	-0.02	[-0.03 , -0.02]	0.00	[-0.01 , 0.00]
v35	OAA + GLU ↔ ASP + aKG _m	0.03	[0.03 , 0.04]	0.25	[0.25 , 0.28]