

**ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS**  
**UNIVERSITÉ DE TOURS**

FACULTE DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »

Année 2023

N°2...

**THÈSE D'EXERCICE**  
**pour le**  
**DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Par

ALEXANDRE BRADIER

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 23 JANVIER 2023

**PRODUCTION DES PROTEINES RECOMBINANTES :**  
**UN FOCUS SUR LA GLYCOSYLATION**

**JURY**

Président : Marc CLASTRE ; Professeur des Universités, Tours

Membres :

Laurence DOUZIECH-EYROLLES ; Pharmacien, MCU, Tours

Emilie LEFEBVRE ; Pharmacien, GSK Saint Amand-Les-Eaux

Yoann BERLOT SCHMITT ; Pharmacien, Merck Group Aubonne (Suisse)

**ANNEE : 2022 - 2023**

**Directeur : Pr Denys BRAND**

**Directeur Adjoint : M. Matthieu JUSTE**

**Assesseurs : M. Gildas PRIE, Mme Mélanie BOUVIN PLEY, Mme Emilie ALLARD-VANNIER, M. Bruno GIRAUDAU, Mme Claire POUPLARD**

### ENSEIGNANTS

#### **12 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ**

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
BOUDESOCQUE-DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
MUNNIER	Émilie	PHARMACIE GALENIQUE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

#### **6 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ ET PRATICIENS HOSPITALIERS**

ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
GIRAUDAU	Bruno	SANTÉ PUBLIQUE, BIOSTATISTIQUES & ÉPIDÉMIOLOGIE
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE

#### **2 PROFESSEURS ÉMERITES**

BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
THIBAULT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

#### **36 MAITRES DE CONFÉRENCES**

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER (disponibilité)	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE
BOUVIN-PLEY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DELAYE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE

HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
LAJOIE	Laurie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LOUDIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
POUPET	Cyril	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	SANTÉ PUBLIQUE, BIOSTATISTIQUES & ÉPIDÉMIOLOGIE
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

### 3 MAITRES DE CONFÉRENCES ET PRATICIENS HOSPITALIERS

FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

### 3 AHU (Assistant Hospitalier Universitaire)

POUPIN	Pierre	BIOSTATISTIQUES ET SANTE PUBLIQUE
RAMDANI	Yanis	IMMUNOLOGIE
TULOU	Vianney	PHARMACIE CLINIQUE

### 3 ATER (Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche)

AMRANE	Dyha	CHIMIE ORGANIQUE
MEHENNI	Lyes	CHIMIE ANALYTIQUE
VERGER	Alexis	PHARMACIE GALENIQUE

### 1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

### 1 contrat d'enseignement

GERBIER (contrat enseig)	Soledad	ANGLAIS
--------------------------	---------	---------

### 3 CHARGÉS DE RECHERCHE

EPARDAUD	Mathieu	INRAE
MEVELEC	Marie-Noëlle	INRAE
MOIRE	Nathalie	INRAE



## SERMENT DE GALIEN

*En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :*

*D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances;*

*D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;*

*En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;*

*De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;*

*De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;*

*De coopérer avec les autres professionnels de santé ;*

*Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.*

Date :

23/03/2023

L'étudiant

Le Doyen de la Faculté

M Alexandre Bradier

Professeur Denys BRAND

## **Remerciements**

Je tiens à remercier,

Monsieur le Professeur Clastre, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

Madame le Docteur Laurence Douziech, pour avoir dirigé cette thèse. Je vous remercie pour l'accompagnement et le temps consacré durant la rédaction de cette thèse. Votre apport sur la partie analytique aura été d'une aide précieuse sur ce travail.

Monsieur le Docteur Yoann Berlot Schmitt, pour m'avoir encadré durant ce stage qui aura été plus que déterminant dans ma vie professionnelle. A tes côtés, j'ai pu découvrir un métier, la satisfaction de travailler en équipe, un pays et des aspects de ma personnalité que j'ignorais. Je vous suis reconnaissant, toi et toute l'équipe, pour ces moments partagés. Ce sujet est né de cette expérience, merci d'être présent pour assister à l'épilogue de cette aventure.

Madame le Docteur Emilie Lefebvre, pour m'avoir fait confiance pour rejoindre son équipe et m'accompagner durant ce début de carrière. Merci pour tes conseils, tes explications et ta sympathie au quotidien. Je souhaite que cette dynamique continue et se renforce durant toute notre collaboration.

Tous mes professeurs, enseignants et encadrants de stage que j'ai pu rencontrer durant mes années d'études pour m'avoir transmis leur savoir et leur passion.

Ma famille pour m'avoir toujours soutenu durant ces études.

Mathilde, présente du premier déménagement à cette dernière étape, nos moments partagés ont été des bulles de bonheur essentielles durant ces années chargées. Que notre lien ne s'estompe jamais.

Maman, sans toi rien n'aurait été possible. Merci pour ton amour, ton courage et tous les sacrifices.

Papy, pour tout ce que tu m'as transmis. Tu resteras toujours un modèle à suivre.

Andréa, pour tes encouragements, tes conseils et ta patience tout au long de cette rédaction. Merci d'être le petit piment qui épice ma vie et relève ma personne chaque jour. Tu seras toujours ma *partner*.

Mes amis de la faculté, pour tous ces moments partagés, durant les cours, les TP, les révisions et bien entendu pour ces soirées de folie.

L'Atropine, la seule et l'unique, car sans musique la vie serait plus triste.

Fred et Jamy, Sabine et la petite voix pour m'avoir donné le goût de la science, de la découverte et de la curiosité dès mon plus jeune âge.

Enfin merci à Tours, ville à jamais gravée dans ma mémoire, témoin à jamais de mes meilleures années, de mes plus belles bêtises et de mon plus grand amour.

## **Tables des matières :**

<b>Listes des abréviations :</b>	10
<b>Tableaux et figures :</b>	12
<b>Introduction</b>	13
<b>1 Biotechnologies</b>	14
1.1 Définition	14
1.2 Historique	15
1.2.1 De l'antiquité au XIXème siècle - Ere empirique	15
1.2.2 Du XIXème siècle à 1950 – Ere scientifique et industrielle	15
1.2.3 De 1960 à nos jours – Ere moderne	16
1.3 Biotechnologie, biomédicaments et biosimilaires	17
1.3.1 Définition biomédicament	17
1.3.2 Biosimilaires	18
<b>2 Modifications post traductionnelles et glycosylation</b>	19
2.1 Modifications post traductionnelles	19
2.1.1 ADN, protéines et traduction	19
2.1.2 Types de modifications post-traductionnelles	21
2.2 Glycosylation	22
2.2.1 N-glycosylation	22
2.2.1.1 Liaison initiale du glycane	23
2.2.1.2 Maturation des glycanes	24
2.2.2 O-glycosylation	25
2.2.3 Différences inter espèces	26
2.3 Rôles de la glycosylation	27
2.3.1 Action structurale ou modulatrice	27
2.3.2 Fonctions de reconnaissance endogènes	27
2.3.3 Fonctions de reconnaissance exogènes	28
<b>3 Production de protéines recombinantes</b>	29
3.1 Ingénierie génétique	29
3.2 Sélection de la cellule usine	30
3.2.1 Transfert du gène	31
3.2.2 Sélection des cellules	31
3.3 Banque Cellulaire	32
3.4 Upstream Process (USP)	33
3.4.1 Substrat	33

3.4.2	Cinétique .....	34
3.4.3	Système de culture & matériels .....	35
3.5	Down Stream Process (DSP) .....	37
3.5.1	Clarification.....	37
3.5.2	Destruction cellulaire .....	38
3.5.3	Purification .....	39
3.6	Fill and Finish .....	39
<b>4</b>	<b>Impact de la glycosylation sur la protéine .....</b>	<b>40</b>
4.1	Facteurs déterminant de la glycosylation d'une protéine recombinante.....	40
4.1.1	Gène .....	40
4.1.2	Cellule hôte.....	41
4.1.3	Substrat .....	42
4.2	Devenir de la protéine et impact pharmacocinétique .....	42
4.2.1	Stabilité.....	42
4.2.2	Biodisponibilité et Diffusion tissulaire (Adsorption et Distribution) .....	44
4.2.3	Demi-vie (Métabolisme et Elimination) .....	45
4.3	Impact pharmacodynamique .....	46
4.4	Immunogénicité .....	49
<b>5.</b>	<b>Impact sur le monde industriel et moyen de contrôle.....</b>	<b>51</b>
5.1.	Méthodes analytiques.....	53
5.1.1.	Electrophorèse Capillaire (CE).....	53
5.1.2.	Chromatographie en phase liquide (CL).....	55
5.1.3.	Spectrométrie de masse (MS) .....	57
5.2.	Applications.....	59
5.2.1.	Analyse directe des glycoformes et des glycoprotéines .....	59
5.2.2.	Analyse des glycopeptides et de l'hétérogénéité .....	59
5.2.3.	Analyse des glycanes libres et glycan-mapping.....	61
<b>Conclusion.....</b>		<b>64</b>
<b>Bibliographie .....</b>		<b>66</b>



### **Listes des abréviations :**

ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Asn	Asparagine
BPF	Bonnes pratiques de fabrication
CDC	Complement dependent cytotoxicity
CE	Capillary electrophoresis
CGE	Capillary Gas electrophoresis
CHO	Chinese hamster ovary
CI	Chemical Ionization
CIEF	Capillary isoelectric focusing
CL	Chromatographie Liquide
CPP	Critical Process Parameters
CQA	Critical quality attribute
CZE	Capillary Zone electrophoresis
DSP	Downstream Process
EI	Electron Ionization
EPO	Erythropoïétine
ESI	Electrospray ionization
Fab	Fragment antigen-binding
FAB	Fast Atom Bombardment
Fc	Fragment antigen-binding
FDA	Food and Drug Administration
FSH	Follicle-stimulating hormone
FT-ICR	Fourier-transform ion cyclotron resonance
GlcNAc	N-acétylglucosamine
GU	Glucose Unit
HILIC	hydrophilic interaction liquid chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
ICH	International Council for Harmonisation
IL-1	Interleukine 1
IT	Ion trap
LHRH	Luteinizing Hormone Releasing Hormone
LIF	Laser Induced Fluorescence
LIT	Linear ion trap
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
Man	Mannose
MEKC	Micellar Electrokinetic Chromatography
MS	Mass Spectroscopy

Neu5Ac	Acide N-acétylneuraminique
Neu5Gc	Acide N-glycolylneuraminique
NK	Natural Killer
O.G.M	Organisme génétiquement modifié
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economique
PNGase F	Peptide-N-glycosidase F
R&D	Recherche & Développement
RE	Reticulum Endoplasmique
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
Ser	Serine
Thr	Thréonine
TIMS	Thermal ionization Mass Spectrometry
ToF	Time of Fly
USP	Upstream Process
UV	Ultraviolet

## **Tableaux et figures :**

Figure 1 : Base azotée et ADN (19) .....	19
Figure 2 : Synthèse protéique .....	20
Figure 3 : Liaison N-glycosidique .....	22
Figure 4 : Précurseur glycanique intervenant dans la N-Glycosylation .....	23
Figure 5 : Maturation du précurseur glycanique au sein du RE et due l'appareil de Golgi (23) .....	24
Figure 6 : Liaison O-glycosidique .....	25
Figure 7 : Complexité des glycanes inter espèces (24) .....	26
Figure 8 : Création de la cellule et de la banque cellulaire(32) .....	33
Figure 9 : Cinétique de croissance cellulaire (34) .....	35
Figure 10 : Cetuximab, structure tertiaire (46) .....	47
Figure 11 : Fonctions effectrices et schéma glycosidiques (48) .....	48
Figure 12 : Pharmacopée européenne, chapitre 2.2.59 « Analyse glycanique des glycoprotéines »(55) .....	52
Figure 13: Electrophorèse capillaire - Principe de fonctionnement (56) .....	53
Figure 14: Chromatographie liquide d'exclusion , principe de fonctionnement (58) .....	55
Figure 15: Chromatogramme HILIC identifiant des glycopeptides présents sur les 2 sites de glycosylation (62) .....	60
Figure 16 : Schéma des différentes stratégies d'analyse des glycoprotéines (64) .....	61
Figure 17 : Analyse rapide via CE-LIF d'un échantillon après digestion par PNGase F (65) .....	62
Figure 18: Identification des glycanes libérés et séparés par CE-LIF selon leur temps de migration, et leur valeur GU (65) .....	63
Tableau 1 : Code génétique .....	20
Tableau 2 : Principales modifications post traductionnelles et leurs effets biologiques .....	21
Tableau 3 : Techniques d'ionisation et d'analyse en spectrométrie de masse .....	57

## **Introduction**

Depuis les années 80, les médicaments biologiques et les protéines recombinantes font partie intégrante de l'arsenal thérapeutique. Protéines de substitution, vaccins ou anticorps monoclonaux sont des traitements qui, chaque jour, sont produits et administrés partout dans le monde.

Les médicaments issus de biotechnologies s'appuient bien souvent sur un mode de production qui copie les processus biologiques naturels. Ces derniers sont par définition à l'origine de beaucoup de variabilité, entre les espèces, entre les individus de ces espèces, voire au sein de ces individus. Cependant, une forte variabilité est contraire à l'idée d'une production industrielle à grande échelle convenant au plus grand nombre.

La compréhension et la maîtrise des moyens de productions biologiques est donc primordiale afin de garantir la sécurité, la qualité et l'efficacité de ces traitements. Les médicaments produits par biotechnologie sont majoritairement des protéines et à ce titre, celles-ci vont pouvoir subir plusieurs modifications post-traductionnelles durant leur conception. L'une des plus importantes et des plus courantes est la glycosylation.

Le but de cette thèse sera donc de comprendre les différents impacts que peut avoir la glycosylation en étudiant ses mécanismes et ses effets biologiques.

Pour cela, nous nous intéresserons à la façon dont est produite une protéine recombinante : quelles étapes peuvent conduire à des profils glycosidiques différents ? Quelles sont les méthodes de caractérisation et d'analyse qui permettent de s'assurer que le médicament biologique correspond bien à l'attendu et répond aux exigences de qualité, de sécurité et d'efficacité ?

# **1 Biotechnologies**

## **1.1 Définition**

L'Organisation de Coopération et de Développement Economique, l'OCDE, dans un rapport de 2003 (1) soulignait la difficulté de définir le concept de biotechnologie. Si elle donne une définition unique incluant toutes les activités biotechnologiques telle que :

« L'application de la science et de la technologie à des organismes vivants, de même qu'à ses composantes, produits et modélisations, pour modifier des matériaux vivants ou non-vivants aux fins de la production de connaissances, de biens et de services. », elle précise aussi qu'une définition fondée sur des listes en fonction des différents types de biotechnologies permet de dresser un portrait plus précis de cette notion.

Une de ces listes (2) a, par exemple, été conçue en fonction des différents outils à l'origine des applications que nous connaissons :

- ADN/ARN
- Protéines
- Cellules et tissus
- Procédés biotechnologiques
- Vectorisation de gènes et d'ARN
- Bio-informatique
- Nanobiotechnologie

Cette liste illustre bien la grande variété des outils et des technologies du vivant. Il n'y a pas une biotechnologie mais bien plusieurs, d'où la difficulté à définir le terme. Cette pluralité permet des applications dans de nombreux domaines et à des échelles très différentes.

Une classification par domaine d'applications a ainsi été créée et permet d'avoir un aperçu plus concret et large de l'ensemble des biotechnologies.

## 1.2 Historique

### 1.2.1 De l'antiquité au XIXème siècle - Ere empirique

Bien que les biotechnologies se soient développées dans le monde pharmaceutique principalement durant les 40 dernières années, les premières biotechnologies -au sens de l'utilisation de la matière vivante à des fins de production ou de services- remontent à l'antiquité.

On trouvera durant cette période une utilisation des biotechnologies principalement dans les domaines de l'agriculture et de l'alimentaire. La principale technique utilisée est alors la fermentation : la fabrication du pain au levain, des fromages, du vin ou de la bière repose en effet sur l'utilisation de levures qui sont des micro-organismes. L'utilisation du vivant est ici purement empirique et sert à la transformation d'aliments, répondant ainsi aux contraintes de conservation de l'époque. Les micro-organismes et leur processus de transformation, ne sont alors pas connus ni compris, et ce jusqu'au milieu du XIXème siècle.

Il est intéressant de noter que l'on retrouve des traces de ces techniques et produits aux seins de beaucoup de civilisations antiques, et cela tout autour du monde. Les différentes populations déclinant ce procédé universel avec les cultures agricoles locales (céréales différentes, fruits exotiques, lait d'animaux locaux)

### 1.2.2 Du XIXème siècle à 1950 – Ere scientifique et industrielle

L'utilisation empirique des biotechnologies laisse place à leur utilisation théorique avec les débuts de la microbiologie ; illustrés notamment par les travaux de Pasteur (1822-1895) qui permettent d'introduire la notion de micro-organismes et de comprendre leur fonctionnement.

De ces recherches, découleront :

- L'identification des microorganismes responsables des fermentations alcooliques, lactiques, et d'autres.
- La pasteurisation et l'invention de l'autoclave
- La vaccination contre la rage et contre le bacille du charbon

A la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, l'avancée des techniques d'études microbiologiques (boîte de Petri, milieu de culture de différentes sortes, coloration de Gram, ...) permet la découverte des enzymes (3). Les travaux de Büchner permettront, en 1897, les premières extractions à partir de levures et l'on comprend vite l'intérêt et les applications sous-jacentes (4).

Dans le même temps, les débuts de l'industrialisation conduisent à la conversion de grandes pharmacies européennes et nord-américaines en sociétés pharmaceutiques. Les processus de fabrication des médicaments se standardisent et se mécanisent : la découverte de l'insuline en 1921 (5) par Banting et Best va donner lieu à son extraction chez l'animal et à sa commercialisation par des entreprises pharmaceutiques spécialisées, le développement et la production industrielle des antibiotiques pendant la Seconde Guerre Mondiale en sont des exemples.

La génétique est une nouvelle discipline qui apparaît au XIX<sup>ème</sup> siècle : Mendel met en évidence l'hérédité dans ses travaux de 1865, le terme de « gène » est introduit en 1909, Thomas Hunt Morgan énonce la notion d'hérédité sexuelle et l'influence du positionnement des gènes sur les chromosomes sur leur transmission (6).

Les premières extractions d'ADN s'effectuent au milieu des années 1930 et les travaux de Watson et Crick (7) en 1953 permettent de déterminer sa structure biochimique en double hélice. La compréhension de cette structure sera la clé du décodage du génome humain.

### 1.2.3 De 1960 à nos jours – Ere moderne

La révolution entraînée par la génétique fait entrer les biotechnologies dans leur ère moderne grâce à l'introduction des protéines recombinantes. Il s'agit de protéines issues de gènes humains, qui sont donc mieux tolérées et plus efficaces que des protéines animales.

Les industries pharmaceutiques utilisant les biotechnologies redéfinissent alors de nombreuses thérapeutiques : c'est notamment le cas pour l'insuline, première protéine recombinante commercialisée par Eli Lilly (8).

Son développement s'appuie sur plusieurs grandes avancées : le premier transfert de gènes chez la bactérie *E. coli* par Boyer et Cohen en 1973 (9), la première expression d'un gène dans une bactérie l'année suivante et enfin la première production d'une protéine recombinante, la somatostatine en 1977 (10). Eli Lilly développe les techniques de production et de purification à grande échelle pour commercialiser une insuline recombinante humaine, s'appuyant sur *E.*

*coli* génétiquement modifiée pour synthétiser de l'insuline humaine développée par Genentech (11), qui obtient l'approbation de la FDA à la fin de l'année 1982.

Ces évolutions furent possibles grâce aux avancées faites dans les domaines de la génétique et du séquençage de l'ADN. Celui-ci débute à la fin des années 70 grâce aux travaux de Sanger et à sa méthode de séquençage (12). Très vite, des gènes de différents organismes seront séquencés et étudiés, y compris humains.

L'un des tournants de la recherche sur les protéines thérapeutiques est effectué en 1975 avec la création du premier hybridome par Milstein et Köhler (prix Nobel en 1984 (13)). Cette technique permet de générer indéfiniment des clones de cellules productrices d'un seul et même type d'anticorps, des anticorps monoclonaux.

Avec cette découverte, il devient possible de produire des lots standardisés d'un même anticorps, reconnaissant toujours la même cible. Le premier anticorps monoclonal thérapeutique, le muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®), fut ainsi autorisé dès 1986 en tant qu'immunosuppresseur pour prévenir les rejets de greffes (14). Aujourd'hui une quarantaine d'anticorps monoclonaux thérapeutiques ont une AMM (15) en France, dans des ères thérapeutiques très variées mais principalement en rhumatologie et en oncologie.

Depuis les années 2000, la fin des brevets protégeant les premières protéines thérapeutiques a permis le développement et la commercialisation de biosimilaires.

### 1.3 Biotechnologie, biomédicaments et biosimilaires

#### 1.3.1 Définition biomédicament

D'après le code de la santé publique, « *on entend par médicament biologique, tout médicament dont la substance active est produite à partir d'une source biologique ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physiques, chimiques et biologiques ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle* » (16).

Il existe plusieurs différences fondamentales entre les biomédicaments et les médicaments chimiques.

La première d'entre elles réside dans la taille. Les protéines étant des macromolécules, elles traversent difficilement les membranes. Il sera plus efficace de les administrer directement dans



la circulation générale. Un biomédicament est donc principalement un médicament injectable (17).

Une autre différence se manifeste au moment du développement du biomédicament. Si lors de la création d'un médicament chimique, le processus de production doit être déterminé, celui-ci sera principalement en lien avec la forme galénique choisie. Dans le cas d'un biomédicament, une fois la protéine d'intérêt, et donc le gène d'intérêt, identifiés, il faudra développer la cellule usine ou le moyen de production.

Enfin une dernière différence résulte de la production « biologique » des biomédicaments. Ce mode de production va entraîner une hétérogénéité de forme non présente sur les procédés de production des médicaments chimiques. Des variations mineures de la même protéine peuvent apparaître au cours de la production, notamment à cause des modifications post-traductionnelles. La réglementation encadrant ces médicaments est donc plus lourde et rend le développement de biosimilaires compliqué.

### 1.3.2 Biosimilaires

Un médicament biosimilaire est « un médicament biologique de même composition qualitative et quantitative en substance active et de même forme pharmaceutique qu'un médicament biologique de référence mais qui ne remplit pas les conditions pour être regardé comme une spécialité générique en raison de différences liées notamment à la variabilité de la matière première ou aux procédés de fabrication et nécessitant que soient produites des données précliniques et cliniques supplémentaires dans des conditions déterminées par voie réglementaire » (16).

Il se rapproche du concept de médicament générique pour les spécialités chimiques mais en est très différent. Du fait de la variabilité et la complexité inhérente aux processus de fabrication biologique, les médicaments biosimilaires ne sont pas strictement identiques aux médicaments de référence. Afin d'obtenir son AMM, le biosimilaire devra démontrer que sa qualité (comparaison des propriétés physico-chimiques et biologiques), sa sécurité (comparaison des propriétés pharmacodynamiques et toxicologiques) et son efficacité (études cliniques), sont identiques aux médicaments biologiques de référence.

## 2 Modifications post traductionnelles et glycosylation

Le support de l'information génique et de l'hérédité est l'ADN, l'acide désoxyribonucléique. Cette information peut ensuite être traduite en protéines, éléments fonctionnels des cellules.

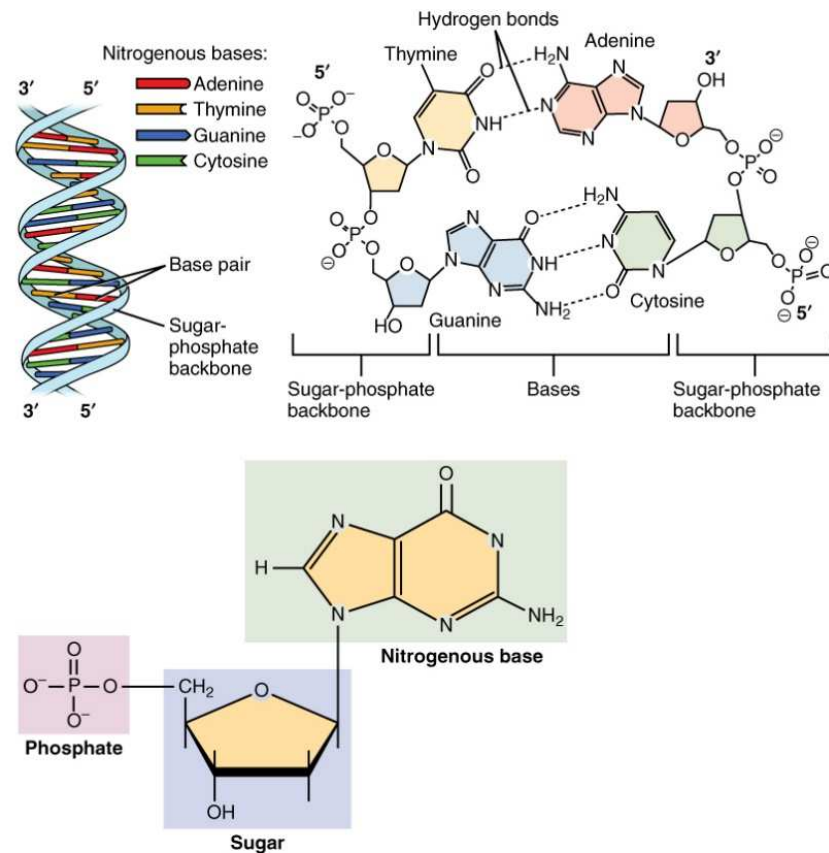
### 2.1 Modifications post traductionnelles

#### 2.1.1 ADN, protéines et traduction

Une molécule d'ADN est un enchaînement de plusieurs nucléotides. Ces derniers sont composés de différents éléments (18) :

- Une base azotée de type purine (Adénine & Guanine) ou pyrimidine (Cytosine & Thymine)
- D'un sucre, le  $\beta$ -D-2'-désoxyribose
- Un groupement triphosphate

Ces 4 bases azotées codent l'information génétique. Ainsi, le génome humain compte 3,6 milliards de paires de bases organisées en 20 000 gènes. (*Figure 1*)



*Figure 1 : Base azotée et ADN (19)*

L'ADN est transcrit sous forme d'ARN messager (ARNm) qui peut ensuite quitter le noyau vers le cytoplasme. Cette étape est suivie de celle de traduction par les ribosomes, qui vont synthétiser une chaîne d'acide aminés, composants élémentaires des protéines (20) à partir de l'ARNm. (Figure 2)

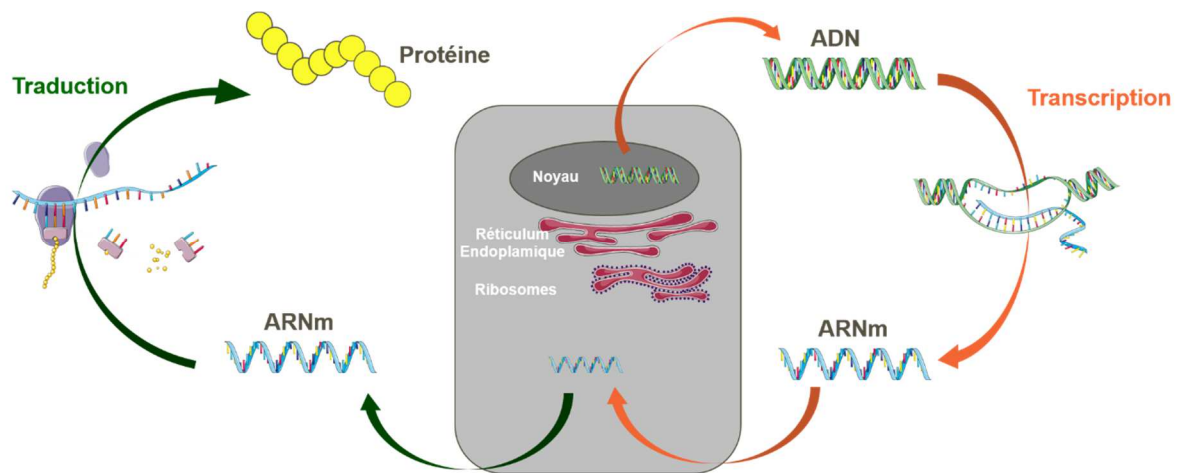


Figure 2 : Synthèse protéique

Chaque triplet de nucléotides correspondra à un acide aminé bien particulier, l'ADN et son code génétique universel opérant comme un plan pour la séquence protéique.

	U		C		A		G		
U	UUU	Phénylalanine	UCU	Serine	UAU	Tyrosine	UGU	Cystéine	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leucine	UCA		UAA	Stop	UGA	Stop	A
	UUG		UCG		UAG		UGG	Tryptophane	G
C	CUU	Leucine	CCU	Proline	CAU	Histidine	CGU	Arginine	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Glutamine	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU	Isoleucine	ACU	Thréonine	AAU	Asparagine	AGU	Sérine	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Lysine	AGA	Arginine	A
	AUG	Méthionine	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	Valine	GCU	Alanine	GAU	Acide	GGU	Glycine	U
	GUC		GCC		GAC	Aspartique	GGC		C
	CUA		GCA		GAA	Acide	GGA		A
	CUG		GCG		GAG	Glutamique	GGG		G

Tableau 1 : Code génétique

Une fois la traduction terminée et la protéine synthétisée, celle-ci ne sera pas pour autant fonctionnelle. Cette fonction n'apparaîtra qu'avec la formation de sa structure tridimensionnelle, secondaire à son repliement. La fixation et l'activation du récepteur se font la majorité du temps selon une reconnaissance de forme.

Les protéines nues repliées peuvent voir leurs fonctionnalités aussi transformées par des ajouts de groupements chimiques. Ce sont les modifications post traductionnelles.

### 2.1.2 Types de modifications post-traductionnelles

Ces modifications confèrent à la protéine des propriétés physicochimiques très différentes de la protéine « nue » codée par le gène, et influencent sa structure (21). Généralement ces modifications sont conditionnées par :

- Une localisation précise pour recevoir le groupement chimique, aussi toutes les protéines ne peuvent subir toutes les modifications.
- Desenzymes et des co-facteurs spécifiques rendant les modifications spécifiques de certaines espèces, ou bien s'exprimer avec des variations

Le tableau 2 recense les principales modifications post traductionnelles et leurs effets biologiques.

Modification	Effets	Rôles
Phosphorylation	Ajout ou retrait d'un groupement phosphate	Mécanisme de régulation mode actif/inactif
Glycosylation	Ajout ou retrait d'un groupement glucidique	Signalisation et reconnaissance cellulaire
Pont disulfure	Formation d'une liaison covalente entre 2 atomes de soufre	Structure des protéines
Ubiquitination	Fixation d'une ou plusieurs protéines d'ubiquitine	Dégradation des protéines via le protéasome
Acetylation	Ajout ou retrait d'un groupement acétyl	Modification de l'affinités des protéines Régulation de l'expression génétique
S-nitrosylation	Ajout ou retrait d'une molécule de monoxyde d'azote	Signalisation cellulaire
Isoprénnylation	Ajout ou retrait d'un groupe hydrophobique "prényl" (ex :farnésyl)	Liaison protéique/Ancrage membranaire
Hydroxylation	Ajout ou retrait d'un groupement Hydroxyle	Régulation de la stabilité de la protéine
Protéolyse	Coupe d'une liaison protéique	Structure des protéines
Lipidation	Ajout d'un groupement lipide	Ancrage membranaire

*Tableau 2 : Principales modifications post traductionnelles et leurs effets biologiques*

## 2.2 Glycosylation

La glycosylation est un phénomène survenant au cours de la biosynthèse de certaines protéines destinées à être sécrétées ou intégrées à la membrane plasmique. Il s'agit de l'ajout d'oligosaccharides, qui sont des polymères constitués d'un petit nombre de glucides simples ou d'oses. On parle alors de glycoprotéines.

La glycosylation a lieu chez tous les eucaryotes et est l'une des modifications post traductionnelles les plus répandues. Elle participe à la maturation de ces protéines et a donc un rôle décisif dans l'acquisition de leurs fonctions cellulaires. L'ajout des oligosaccharides est un processus multi-étapes impliquant plusieurs voies enzymatiques différentes selon le schéma de glycosylation finale.

On distingue deux grandes catégories de glycosylation selon les acides aminés qui vont porter les arbres glucidiques greffés : la *N*-glycosylation et la *O*-glycosylation.

### 2.2.1 *N*-glycosylation

Elle est la plus répandue et est essentiellement co-traductionnelle. En effet, le glycane sera attaché à la chaîne polypeptidique durant la biosynthèse de la protéine et il sera modifié pendant la traversée du réticulum endoplasmique (22). La *N*-glycosylation permet l'ajout de glycans de grandes tailles et souvent très ramifiés, qui subiront plusieurs altérations après avoir été liés aux protéines.

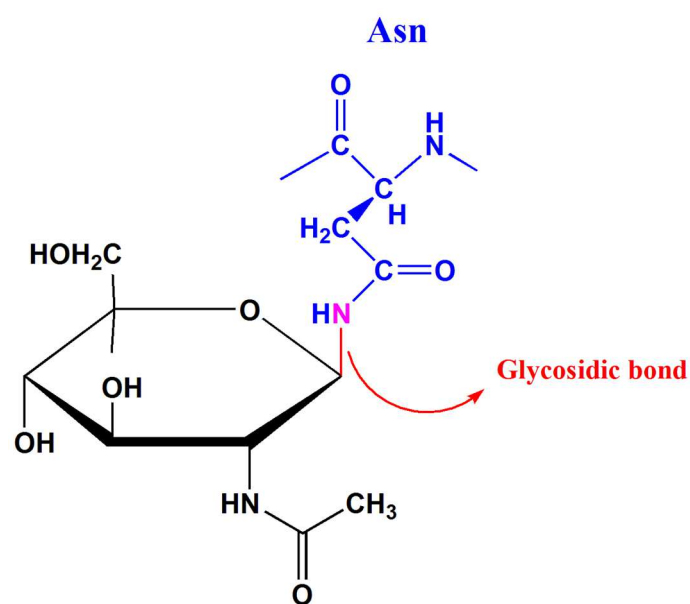


Figure 3 : Liaison *N*-glycosidique

La N-glycosylation s'effectue en deux étapes.

#### 2.2.1.1 Liaison initiale du glycane

Dans un premier temps, une chaîne ramifiée de quelques oses est ajoutée d'un seul bloc sur la protéine à modifier (22). Le glycane va être attaché de manière covalente à l'azote (N) du groupement amide d'une asparagine via une liaison avec un hydroxyle (-OH) d'une N-acétylglucosamine. (Fig. 3)

L'addition de chaînes glucidiques ne s'effectue pas au hasard. Seules les asparagines appartenant aux deux séquences **Asn-X-Ser** ou **Asn-X-Thr** (où *X* est un acide aminé quelconque excepté la proline) peuvent être glycosylées. Ce sont des sites potentiels de N-glycosylation. D'autres facteurs, comme la structure de la protéine elle-même ou le type de cellule réalisant sa synthèse, détermineront si ces sites seront glycosylés ou non.

La réaction établissant cette liaison covalente est contrôlée par des glycosyltransférases, enzymes localisées dans la lumière du réticulum endoplasmique.

Les oligosaccharides attachés via une liaison N-glycosidique proviennent d'un précurseur contenant 14 oses : 2 N-acétylglucosamines (GlcNAc), 9 mannoses (Man) et 3 glucoses (Glc) (22). Ce précurseur est initialement porté par un lipide de la face interne de la membrane du réticulum endoplasmique et représenté sur la figure 4.

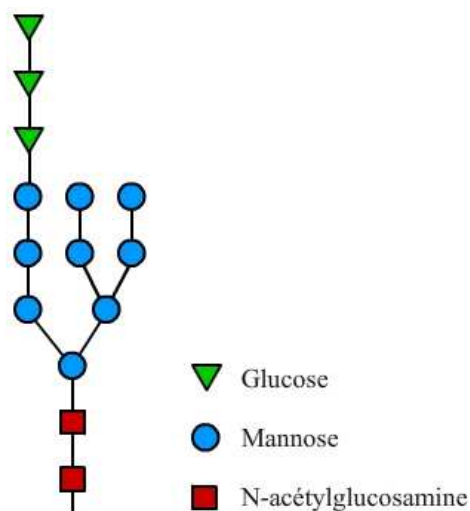


Figure 4 : Précurseur glycanique intervenant dans la N-Glycosylation

### 2.2.1.2 Maturation des glycanes

À ce stade de la glycosylation, toutes les glycoprotéines N-glycosylées ont la même structure, celle du glycanes précurseur. La chaîne glucidique initiale va ensuite être remaniée lors de sa traversée du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi.

Cette voie de maturation impliquant plusieurs enzymes permet la production de glycoprotéines complexes aux motifs oligosaccharidiques d'une grande diversité.

Elle combine des étapes de clivages et d'additions pour ainsi diversifier la chaîne de glycanes attachée à la protéine. Ces étapes ont lieu dans un ordre précis (23), dans les différents compartiments successifs de l'appareil de Golgi (cis, médian, trans) -chaque citerne de l'appareil de golgi comportant une enzyme spécifique impliquée dans ces modifications. La figure 5 présente un exemple de cette maturation.

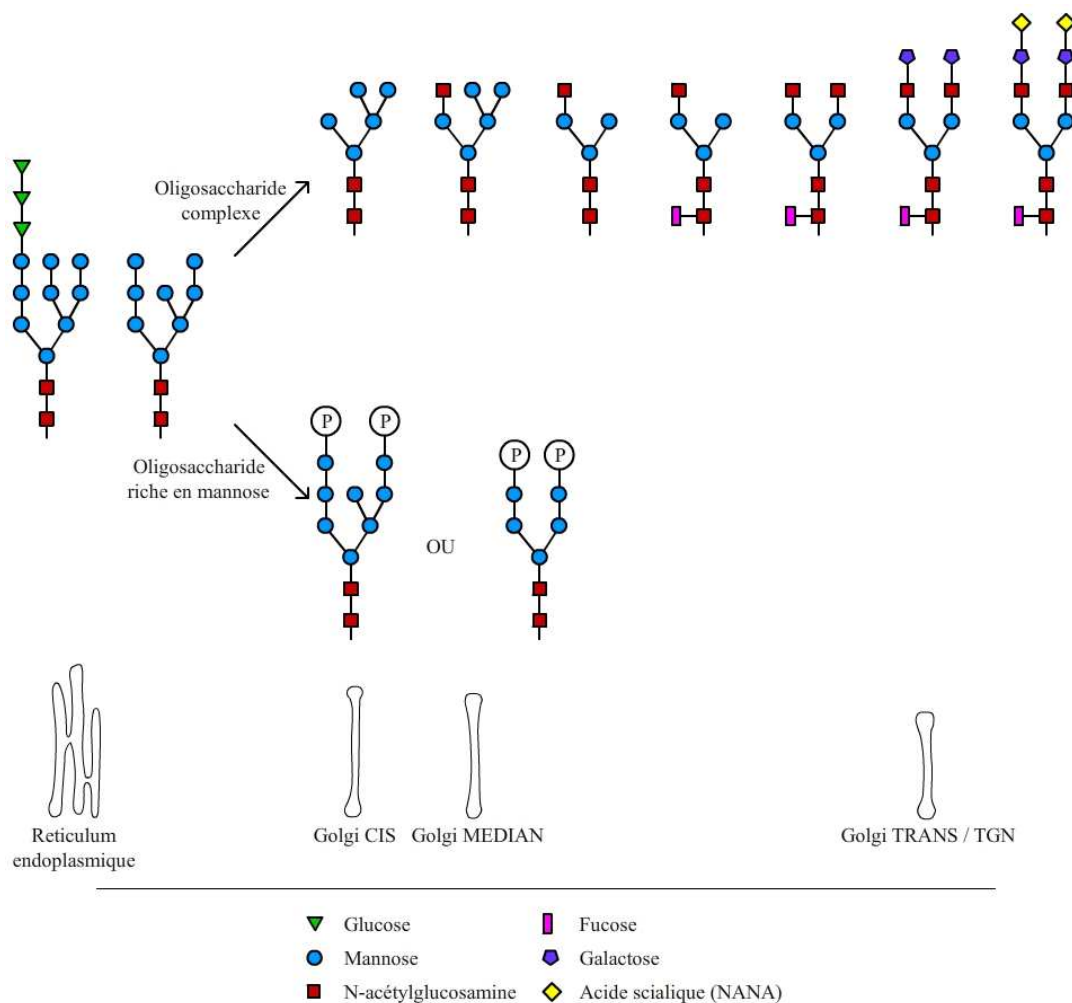


Figure 5 : Maturation du précurseur glycanique au sein du RE et due l'appareil de Golgi (23)

### 2.2.2 O-glycosylation

La O-glycosylation correspond aussi à l'ajout d'un oligosaccharide sur une protéine, cependant, celui-ci s'effectue via une liaison O-glycosidique. Dans la O-glycosylation, la liaison entre la protéine et l'arbre glucidique se fait entre le groupement hydroxyle (-OH) de la chaîne latérale d'un résidu serine ou thréonine et d'une molécule de sucre. (Fig. 6)

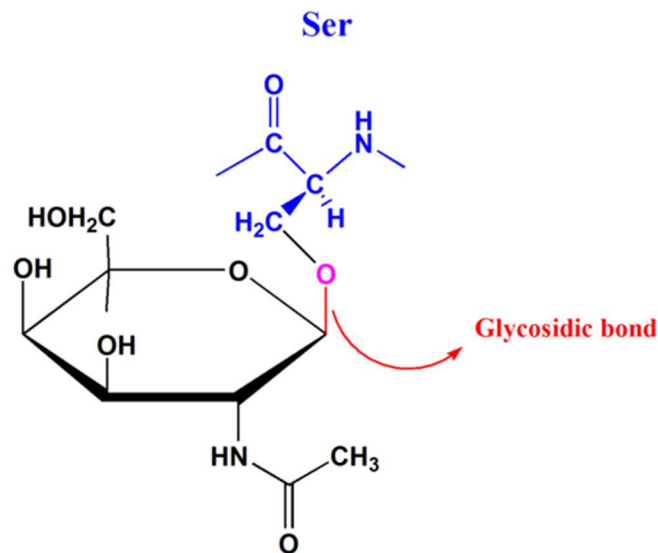


Figure 6 : Liaison O-glycosidique

Le mécanisme de l'O-glycosylation est moins complexe que celui de la N-glycosylation, les ajouts de résidus de sucre se font séquentiellement, les uns après les autres, directement sur les acides aminés cibles. Les sucres greffés sont des oses activés par une liaison à un nucléotide sans précurseur commun. Plusieurs glycosyltransférases interviennent tour à tour et catalysent les réactions. Cette addition se déroule dans l'appareil de Golgi, durant la phase de maturation de ces glycoprotéines (22).

Même s'il n'y a pas de séquences définies comme pour la N-glycosylation, certains motifs se retrouvent plus fréquemment chez telles ou telles espèces du fait de leurs enzymes respectives et des rôles qu'auront à jouer les différentes glycoprotéines dans ces organismes.

A la fin de la maturation des protéines, les chaînes glycosidiques issues de la O-glycosylation sont beaucoup plus variées et plus courtes que les chaînes générées par N-glycosylation.



### 2.2.3 Différences inter espèces

Tous les organismes ne réalisent pas une glycosylation identique de leurs protéines. Le type de sucre ajouté étant lié au type de glycosyltransférase, les chaînes glycosidiques greffées dépendent pour chaque espèce du bagage enzymatique qu'elle porte. Ainsi les profils de glycosylation seront très différents d'une espèce à une autre, même pour une protéine similaire, comme illustré dans la figure 7.

Le degré de complexité des glycanes ajoutés ira de pair avec l'évolution de l'organisme considéré. Plus il aura de matériels cellulaires et d'enzymes complexes, plus la glycoprotéine pourra subir de modifications.

Chez l'homme, les principaux saccharides ajoutés dans les chaînes greffées de glycanes sont : le N-acétylglucosamine, le mannose, le fucose, l'acide N-acétylneuraminique (acide sialique), le xylose, le galactose, le glucose, et la N-acétylgalactosamine.

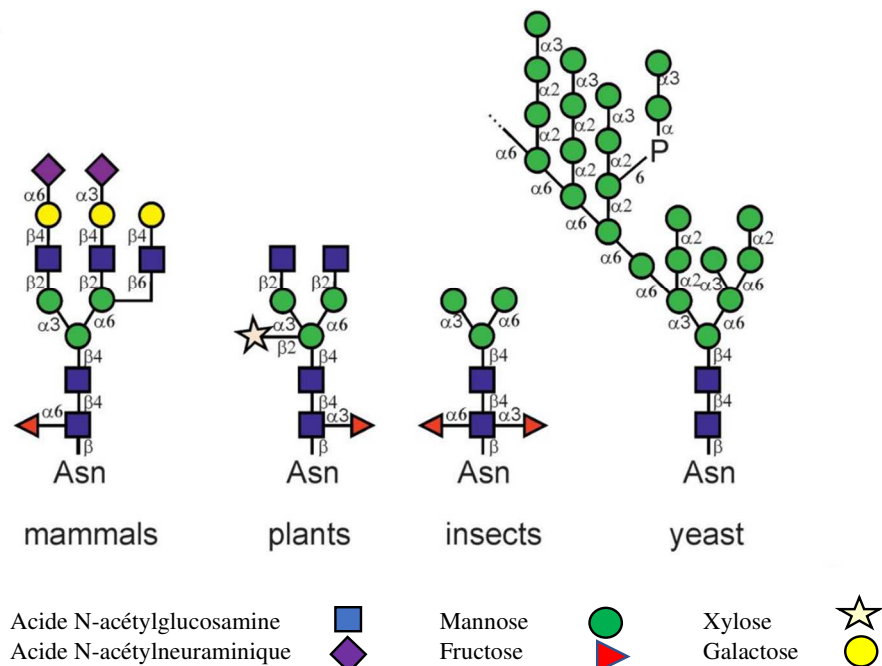


Figure 7 : Complexité des glycanes inter espèces (24)

## 2.3 Rôles de la glycosylation

Du fait de leur complexité et de leur grande variabilité, la glycosylation d'une protéine peut avoir de nombreuses et très différentes fonctions. On peut classer ces rôles en 3 grandes familles.

### 2.3.1 Action structurale ou modulatrice

La glycosylation joue un rôle prépondérant dans l'activité de la protéine. Lors du passage dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de golgi, les sucres greffés vont faciliter le bon repliement des protéines et stabiliser leur structure tridimensionnelle. C'est cette structure qui donne son activité à la protéine. Aussi certaines glycoprotéines présentant un schéma de glycosylation incorrect, pourront de pas réussir à effectuer le bon repliement et seront donc non fonctionnelles (25).

En plus de renforcer leur structure, les glycanes protègent la protéine contre les protéases, des enzymes coupant les liaisons peptidiques des protéines. Leur fixation à la glycoprotéine entraîne un encombrement stérique qui empêche les enzymes d'accéder à leur site d'activité. (26).

La présence des sucres va aussi pouvoir moduler l'activité de la protéine. En effet, certaines protéines fonctionnelles, pourront voir leur activité se manifester dans des cas de glycosylation particulier. On pourra observer ce phénomène sur l'activité des facteurs de croissances par exemple (22).

### 2.3.2 Fonctions de reconnaissance endogènes

Les glycoprotéines interviennent dans de nombreuses interactions cellulaires. Les sélectines et autres lectines sont à l'origine des phénomènes d'adhésion intercellulaire, de l'endocytose ou de phagocytose. Les glycoprotéines peuvent aussi permettre des interactions avec la matrice cellulaire et être à l'origine de certains trafics cellulaires, notamment dans le cas des leucocytes. Les sélectines présentes en surface des cellules endothéliales permettent la reconnaissance, la capture et le passage des leucocytes au travers de la barrière endothéliale (27).

Une application concrète et bien connue des rôles endogènes des glycoprotéines concerne les groupes sanguins. En effet, les épitopes antigéniques entrant dans le système ABO sont d'origine glycoprotéique. Les interactions entre ces sucres et les anticorps du soi permettront la

reconnaissance des globules rouges de groupes sanguins différents et déclencheront des réactions de hemagglutination. (26).

### 2.3.3 Fonctions de reconnaissance exogènes

La glycosylation et les glycanes étant ubiquitaires chez les êtres vivants, les glycoprotéines peuvent remplir les mêmes fonctions de reconnaissance, d'adhésion, de trafic et de signalisation cellulaire avec des organismes exogènes voir pathogènes.

Ainsi, certains glycanes agissent comme des récepteurs spécifiques pour une multitude de micro-organismes et les toxines qu'ils peuvent produire. Les glycoprotéines permettant l'adhésion des bactéries, parasites ou de certains champignons à d'autres cellules ou à la matrice extracellulaire pourront être ciblées, soit par des thérapeutiques, soit par le système immunitaire. En effet la spécificité des glycanes et des profils de glycosylation en fonction des espèces permet la création d'épitopes antigéniques spécifiques et reconnaissables par le système immunitaire.

L'hémagglutinine des virus *Influenza* (virus de la grippe) met en lumière ces différents rôles des glycoprotéines dans les interactions « exogènes ». Il s'agit d'une glycoprotéine présente à la surface du virus, qui joue un rôle primordial dans le processus d'infection. L'hémagglutinine va reconnaître certains acides sialiques à la surface des cellules que le virus va infecter (cellules pulmonaires humaines dans le cas de la grippe). Une fois fixée aux récepteurs, l'hémagglutinine va permettre la fusion de la membrane virale avec celle des endosomes cellulaires et ainsi infecter les cellules hôtes (25).

Cette hémagglutinine étant une protéine antigénique caractéristique des virus *influenza*, elle est reconnue par le système immunitaire et est utilisée dans la classification des virus de cette famille. On retrouve ainsi plusieurs virus qui, en fonction des hémagglutinines qu'ils portent, n'auront pas le même pouvoir infectieux : H1N1, H5N1, H3N2 etc .... (où « H » correspond à l'hémagglutinine)

### **3 Production de protéines recombinantes**

La production de protéines recombinantes est maintenant un processus connu et régulièrement utilisé. Il permet de générer avec un meilleur rendement, et de manière plus standardisée, des protéines thérapeutiques qui précédemment étaient prélevées directement du vivant.

#### **3.1 Ingénierie génétique**

Les protéines recombinantes sont produites par des cellules dont l'ADN a été modifié par recombinaison génétique. De cette cellule-usine va dépendre de nombreuses propriétés de la protéine et du processus de production. Il est donc primordial que sa conception et ses caractéristiques soient réfléchies et pertinentes.

Comme lors d'une production dans une cellule humaine, une protéine recombinante découlera d'un gène. Il faudra donc dans un premier temps identifier le gène de la protéine d'intérêt que l'on souhaitera produire.

En fonction de la protéine d'intérêt, on peut isoler celui-ci directement depuis l'ADN génomique ou bien chercher à obtenir un ADN complémentaire (ADNc). L'ADNc complémentaire est le résultat de l'amplification par RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) de l'ARNm de la protéine d'intérêt. La RT-PCR, est une technique d'amplification et de quantification de l'ADN à partir d'ARN, utilisant la transcriptase inverse. L'intérêt de travailler à partir de l'ADNc est de permettre d'obtenir la séquence génétique précise correspondant à la protéine, sans introns.

En effet dans un organisme eucaryote, l'ARN codant pour la protéine sera transformé lors des étapes d'épissage. L'épissage est un processus de maturation des ARN messager, présent chez les organismes eucaryotes, où des sections d'ARNm natif seront éliminées, les introns. Les sections conservées, les exons, formeront l'ARNm mature. Ce processus permet aussi aux organismes eucaryotes de générer plusieurs protéines différentes à partir d'une même séquence d'ADN, en fonction des segments qui seront excisés, conservés ou transformés.

Une fois cet ADN identifié, isolé et amplifié, il va être cloné dans le vecteur d'expression avec des séquences régulatrices, via des enzymes de restrictions. Il existe plusieurs types de vecteur pouvant recevoir des fragments d'ADN plus ou moins importants. En plus de l'ADNc, des séquences de régulation et de restriction, d'autres séquences tels que des promoteurs, des amplificateurs, des sites de clonage multiples (MSC), pourront être intégrés aux vecteurs. (28).

En effet, la construction du vecteur génétique doit tenir compte des éléments indispensables à l'adressage correct de la protéine dans la cellule hôte. Par exemple, en fonction du compartiment cellulaire dans lequel la protéine d'intérêt se replie ou exerce son activité biologique naturelle, le vecteur devra contenir les séquences spécifiques permettant ces actions.

### 3.2 Sélection de la cellule usine

Le système hôte utilisé pour la production de la protéine d'intérêt peut être soit un organisme unicellulaire (procaryote ou eucaryote) soit un organisme pluricellulaire (plantes et animaux transgéniques). Son choix s'effectue en fonction de l'utilisation désirée de la protéine recombinante ainsi que des mécanismes cellulaires et des modifications nécessaires à la production d'une protéine fonctionnelle.

Si les modèles procaryotes offrent une culture facile, rapide et moins exigeante dans leur mise en œuvre, ceux-ci ne permettent pas de modifications post traductionnelles comme la glycosylation (29). Ces modifications pouvant être nécessaire à sa fonctionnalité, la production d'une protéine eucaryote dans un système bactérien n'est effectuée que pour des protéines dont l'activité n'est pas requise ou dont les modifications post-traductionnelle sont sans impact sur celle-ci.

Malgré des rendements plus faibles et un processus de production plus long et complexe, les cellules de mammifères se sont progressivement imposées pour la production de protéines thérapeutiques. Elles possèdent toutes les capacités de modifications requises pour l'obtention de protéines complexes et biologiquement actives. Plus de la moitié des produits thérapeutiques biologiques sont produits dans les systèmes CHO (ovaires de hamsters chinois). Ils ont l'avantage de pouvoir être cultivés en suspension aux échelles requises pour répondre aux demandes et présentent moins de risques de propagation de virus humains que d'autres cellules recombinantes de mammifères (29).

Des organismes hôtes pluricellulaires peuvent aussi être utilisés (30). Les plantes transgéniques (tabac, luzerne, colza, maïs, riz, soja, pomme de terre...) présentent plusieurs avantages :

- une transgénèse facile et la présence de modification post traductionnelle
- un faible prix de revient de la production grâce à de faibles investissements de départ
- une sécurité par rapport aux risques infectieux (virus, prions).

Cependant, les protéines produites, peuvent être difficiles à extraire et à purifier, du fait de leur localisation dans les feuilles ou les graines.

### 3.2.1 Transfert du gène

Maintenant que la cellule hôte est identifiée, il faut y intégrer l'ADN recombinant conçu précédemment. Plusieurs techniques peuvent être utilisées en fonction de la taille de l'ADN recombinant à intégrer

Il est possible de perméabiliser la membrane de la cellule hôte par différents réactifs chimiques (lipides cationiques, phosphate de calcium, DEAE-dextran) ou via des méthodes physiques (Electroporation, micro-injection). Ces techniques sont documentées et ont été approuvées par les autorités de santé pour une utilisation commerciale et sont les méthodes les plus utilisées en bioproduction industrielle. Cependant ces techniques peuvent dégrader la cellule hôte. Afin de ne pas endommager la cellule hôte ou l'ADN recombinant, il sera possible d'utiliser des vecteurs de transfection (tels que des adenovirus) qui infecteront la cellule sans perméabiliser sa membrane. Ces techniques présentent plus de risque biologique et nécessitent une stratégie de clonage plus complexe (28).

Une fois le vecteur et l'ADN recombinant intégré à l'organisme hôte, ce dernier devient un OGM, organisme génétiquement modifié. Pour autant, la protéine d'intérêt qu'il produira sera une protéine naturelle identique à celle de l'organisme de départ.

### 3.2.2 Sélection des cellules

Lors de la transfection, tous les organismes ne seront pas transformés. Aussi afin de produire dans les meilleures conditions, et avec des rendements optimaux, des protéines fonctionnelles, une sélection des « cellules-usines » correctement recombinées doit être effectuée. Dans les modèles unicellulaires, un gène de sélection est intégré au vecteur. Il s'agit d'un gène conférant un avantage et permettant la survie de la cellule dans un milieu de culture spécifique, présentant des contraintes.

Pour des cellules hôtes bactériennes par exemple, on procède à leur culture dans un milieu enrichi avec un antibiotique. Le plasmide transfecté dans les bactéries contient, en plus du gène d'intérêt, un gène de résistance à cet antibiotique. Ainsi, seules les bactéries ayant absorbé le plasmide résisteront à l'antibiotique et survivront. De cette manière, il est possible de sélectionner uniquement les bactéries dans lesquelles le plasmide aura été correctement

transfecté. Dans le cas d'une cellule de mammifère, on peut utiliser le gène de la glutamine synthétase qui permettra aux cellules transfectées par le vecteur de se développer dans un milieu spécifique, sans glutamine (28).

Les cellules sélectionnées forment une banque cellulaire qui sera utilisée lors de la production industrielle.

### 3.3 Banque Cellulaire

Une fois la cellule usine construite et isolée, l'objectif sera de toujours produire avec ce modèle, afin de maintenir un même niveau de qualité et d'homogénéité du produit. Pour cela, un stock de cellules va être constitué et conservé pour assurer les étapes de développement et de production. Cette lignée cellulaire de haute qualité et de haute stabilité, parfaitement caractérisée, forme une banque cellulaire, que l'on décline sur plusieurs niveaux.

La « Master Cell Bank » (MBC) consiste en une réserve brute de cellules. Toutes les cellules de la MBC seront identiques et issues d'une même et unique lignée. A partir de cette Master Cell Bank on générera des « Working Cell Banks » qui serviront aux étapes de production. Lorsqu'une WCB est épuisée, généralement après une cinquantaine de cycles cellulaires, un autre flacon de MCB sera décongelé et utilisé pour générer une nouvelle WCB.

Une banque de cellules correctement préparée et décrite, stockée dans des conditions sûres, contrôlées et surveillées, permet de garantir toujours la même origine des cellules utilisées durant tout le processus industriel. Cette technique permet aussi d'éviter des problèmes d'épuisement cellulaire ou de dérive génétique.

Selon le type d'organisme utilisé, diverses méthodes de stockage des cellules sont acceptables, mais elles doivent toujours garantir un niveau adéquat de viabilité des cellules sur une longue période de stockage. La méthode de prédilection est la congélation à -70°C.

Les banques de cellules étant un élément clé de la qualité de la protéine produite, elles doivent être créées conformément aux réglementations et lignes directrices « guidelines » actuelles (31). Les principales utilisées sont issues des recommandations de l'ICH (International Council for Harmonisation). Ces textes sont numérotés en fonction de leurs domaines d'application : Q pour qualité, S pour Sécurité, E pour Efficacité et M pour les textes multidisciplinaires.

La figure 8 reprend les différentes étapes permettant d'obtenir un système d'expression stable et sa banque cellulaire associée.

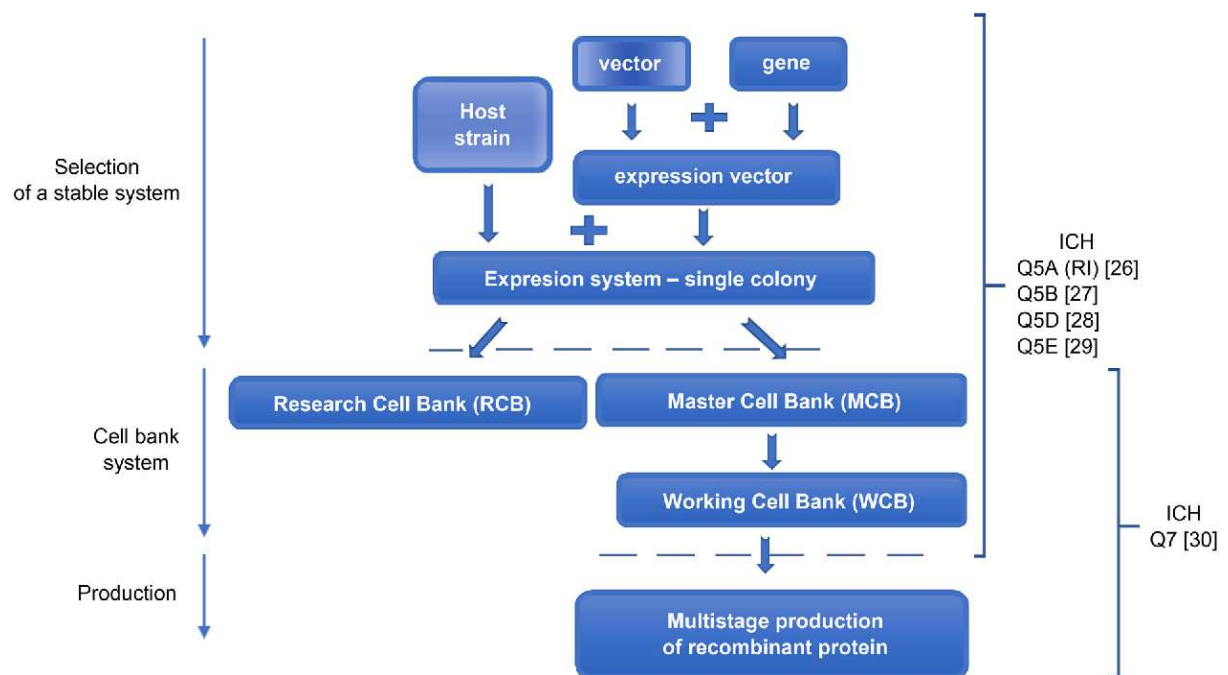


Figure 8 : Création de la cellule et de la banque cellulaire(32)

### 3.4 Upstream Process (USP)

La majorité de la production des protéines recombinantes s'effectue dans des incubateurs avec des organismes hôtes eucaryotes et monocellulaire. L'ensemble des étapes de culture cellulaire correspond aux procédés « Upstream Process ».

#### 3.4.1 Substrat

Pour se développer et se multiplier, la cellule usine a besoin d'un milieu de culture adéquat. Ce milieu de culture doit fournir les mêmes nutriments et facteurs de croissance que ceux auxquels les cellules sont exposées *in vivo* pour qu'elles puissent survivre et proliférer. Le développement des milieux est un enjeu stratégique majeur lors du processus d'optimisation de la culture cellulaire.

Dans le cas des bactéries et des levures, les milieux sont bien connus et référencés. Cependant, pour des cellules animales, et notamment de mammifères, les milieux sont plus complexes et devront être optimisés dans chaque cas.



Pour correctement se développer, les cellules de mammifères auront besoin de sérum. Le sérum contient de nombreux composants essentiels à la culture cellulaire : des facteurs de croissance, des hormones, des protéines de transport ou de liaison, des inhibiteurs de protéase etc ...

Cependant, l'utilisation de sérum, bien souvent d'une source vivante, présente une variabilité inter lot, ainsi qu'un risque supplémentaire de contamination. Ces problématiques poussent de plus en plus les industriels à effectuer des cultures sans sérum, « serum free ». Il s'agit d'introduire artificiellement et de manière spécifique, les différents nutriments habituellement apportés par le sérum, dans le milieu de culture du processus de production. On parle de milieux chimiquement définis. En plus de supprimer les problématiques citées ci-dessus, cette technique permet de personnaliser et d'optimiser son milieu de culture, en fonction des besoins spécifiques de la cellule (33). Leur utilisation reste limitée de par leur coût beaucoup plus important.

#### 3.4.2 Cinétique

La croissance cellulaire suit plusieurs temps, qui vont rythmer le processus de production. Les cellules débuteront leur première phase de croissance dans des flacons de culture de faible contenance. On augmentera la capacité au fur et à mesure que les cellules se multiplieront. Une fois la biomasse assez conséquente, il est possible de débiter la culture en incubateur.

Les cellules connaissent dans un premier temps une phase de latence durant laquelle, elles s'adaptent à ce nouvel environnement et au milieu de culture. Puis, les divisions cellulaires commencent et on pourra observer une augmentation de la biomasse. Celle-ci va s'accélérer jusqu'à atteindre une phase de croissance exponentielle. Le taux de croissance est maximum et les milieux de cultures sont fortement consommés.

Avec la diminution des éléments nutritifs et de l'espace libre dans l'incubateur, la division cellulaire ralentit pour atteindre un plateau, une phase stationnaire. Autant de nouvelles cellules sont générées que d'anciennes cellulaires meurent. C'est dans cette phase que la production de protéines d'intérêt est la plus intéressante. Le processus industriel essaiera donc de faire durer le plus longtemps possible cette phase, en prélevant régulièrement le produit, les cellules mortes mais aussi en alimentant continuellement les cellules vivantes en milieux de culture.

Si le milieu s'appauvrit trop ou s'il devient toxique à cause de l'excès de déchets cellulaires, le nombre de cellules mourantes dépassera celui des nouvelles générées et la biomasse déclinera (Fig. 9).

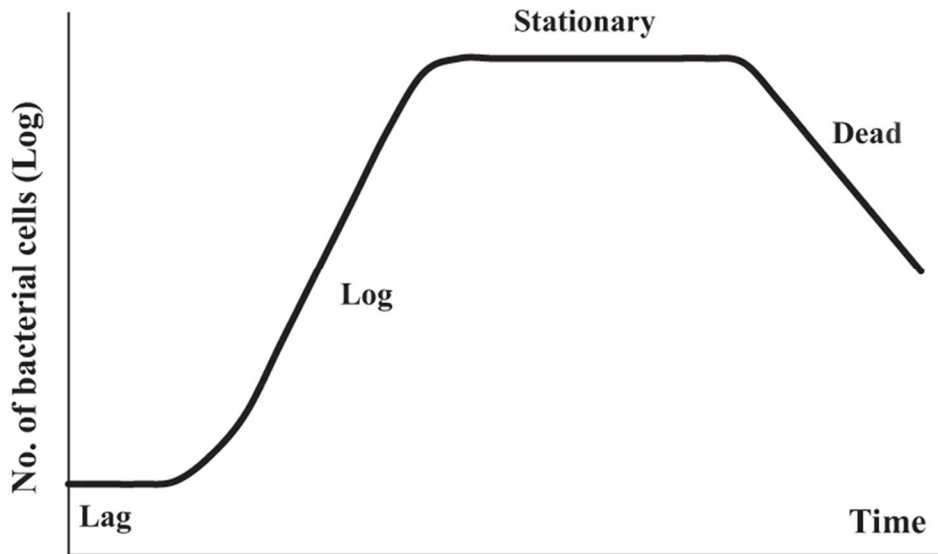


Figure 9 : Cinétique de croissance cellulaire (34)

### 3.4.3 Système de culture & matériels

Les cellules sont cultivées dans des incubateurs. Ceux-ci permettent d'assurer un environnement de culture et de production stérile où les paramètres d'agitation, de température, de pH et de la teneur en oxygène ou autres gaz pourront être contrôlés et surveillés. Les incubateurs sont remplis du milieu de cultures et des cellules en suspensions. Plusieurs volumes d'incubateurs existent, afin de permettre une croissance progressive de la biomasse et du volume de production (28).

Plusieurs modes de production en incubateur existent :

- Mode « Batch » ou culture discontinue :

Ce mode de production est le plus simple et nécessite le moins d'optimisation. Il s'agit d'une culture en système fermé, à volume constant. On introduit un volume fixe de milieu de culture avec l'inoculum dans l'incubateur. Aucun nutriment ne sera rajouté par la suite. De même, les paramètres de cultures (pH, oxygène dissous, température) sont maintenus constants au cours du cycle de production. Les produits seront récoltés à la fin du cycle de production.

Les inconvénients de cette méthode sont multiples : un rendement faible et une dégradation importante des protéines produites dû à l'appauvrissement du milieu.

- Mode « FedBatch » ou culture discontinue alimentée

C'est le mode de culture le plus utilisé dans l'industrie. La phase initiale est identique au mode « Batch », cependant une fois la phase de croissance initiale terminée, et que certains éléments critiques viennent à manquer, on réalimentera la cuve en éléments nutritifs. Ceci permet de prolonger la phase stationnaire et d'augmenter la quantité de protéines produites. Ainsi le volume de la cuve augmentera au cours du cycle de production. Une fois le volume maximal atteint, la fin du cycle de production redeviendra identique au mode batch classique.

En prolongeant de quelques semaines le cycle de production, ce mode permet des rendements et des quantités produites supérieures. Cependant, le risque de contamination de l'incubateur est augmenté et la dégradation des protéines produites reste présente.

- Mode « Perfusion » ou culture en continue

Il s'agira cette fois, de prélever le milieu épuisé parallèlement à l'ajout de milieu neuf, la culture se fera donc à volume constant. Lors des phases de prélèvement, diverses installations sur l'incubateur permettent de ne pas soustraire les cellules à l'incubateurs ou bien de les séparer rapidement pour les remettre en suspension. Cette technique est beaucoup plus complexe à mettre en œuvre mais donne la possibilité de prolonger le cycle de production de plusieurs semaines. Les quantités produites pourront être beaucoup plus importantes. De même le soutirage du milieu usagé réduit la dégradation protéique et permet un rendement maximal. La contrepartie à ce gain d'efficacité sera l'augmentation du risque de contamination de la cuve à chaque étape de prélèvement et d'ajout de milieu.

### 3.5 Down Stream Process (DSP)

Une fois la phase de production cellulaire terminée et le produit récupéré, celui-ci doit être purifié afin d'isoler, de concentrer et de sécuriser la protéine d'intérêt en vue de sa formulation. Cette phase appelée « Down Stream Process » est constituée de plusieurs étapes.

#### 3.5.1 Clarification

Dans un premier temps la biomasse, solide, sera séparée des différents milieux de culture et autres liquides présents dans l'incubateur. Plusieurs méthodes existent :

- **Décantation**

La séparation du produit s'effectue par l'action de la pesanteur, sans matériel spécifique. Les cellules, plus lourdes, s'accumuleront dans le fond de la cuve. Il est possible d'accélérer le processus en modifiant la solubilité et la force ionique du solvant ou en utilisant des flocculants pour aider à la formation d'agglomérats. Cette technique reste cependant peu utilisée à l'échelle industrielle.

- **Centrifugation :**

Autre méthode de séparation selon la masse des particules, la centrifugation permet, via une rotation à une vitesse définie, de plaquer les éléments les plus denses et lourds au fond du récipient. Plus rapide et plus efficace que la décantation, cette méthode est couramment utilisée malgré les contraintes plus importantes qui s'exerce sur la protéine.

- **Filtration :**

La filtration permet une séparation en fonction de la taille des particules. Plusieurs techniques existent avec différents avantages et inconvénients.

- **Filtration frontale** : méthode classique qui s'applique plutôt sur de faible volume du fait des problèmes de colmatage important qu'elle présente.
- **Filtration tangentielle** : afin de limiter le colmatage, il est possible de faire passer le récoltât parallèlement au filtre. La pression du fluide lui permettra de traverser le filtre tandis que les particules resteront dans le flux de circulation du liquide, en surface du filtre.

- **Filtration en profondeur** : Cette technique s'appuie sur le phénomène d'absorption afin de capturer et retenir les particules en fonction de leur taille et de leurs charges. Le liquide passe au travers d'une ou plusieurs membranes poreuses, dont la taille des pores est définie. A la fin du processus on obtient un filtrat clarifié d'un côté et de l'autre les membranes chargées des différentes impuretés retenues. Plus efficace que la filtration tangentielle, elle reste plus compliquée et plus cher à mettre en place.

Afin de clarifier aux mieux le produit, ces différentes techniques peuvent être utilisées conjointement.

### 3.5.2 Destruction cellulaire

Une fois les 2 phases séparées, la suite du procédé pourra suivre 2 voies.

Si la protéine d'intérêt est contenue dans la phase liquide, celle-ci sera purifiée et concentrée directement.

Cependant si la protéine d'intérêt est contenue dans la biomasse (intracellulaire ou transmembranaire), il faudra l'extraire de la phase solide en cassant les cellules. Pour cela on pourra utiliser différentes méthodes d'extraction :

- Via des traitements physiques : un choc osmotique, un choc thermique ou bien encore l'utilisation d'ondes sonores ou de forte pression pour casser les cellules.
- Via des traitements chimiques : exposition à des détergents, des solvants organiques ou alcalin
- Via des traitements enzymatiques
- Via des traitements mécaniques : tels que l'utilisation d'une « french press », d'un mélangeur ou d'un polytron, des techniques de broyage avec des billes de verres.

Toutes ces techniques de destruction cellulaire sont par définitions des procédés violents. Il faudra donc s'assurer de ne pas détériorer la protéine d'intérêt que l'on souhaite extraire, lors de la mise en place de ces méthodes et de leurs associations.

### 3.5.3 Purification

La purification consiste à séparer les protéines d'intérêts, des autres éléments solides non désirables restant encore présents dans la phase liquide. Ces autres éléments peuvent être des reliquats cellulaires, des protéines non fonctionnelles, ou bien des composants du milieu de culture non désirés dans le produit final.

La stratégie et les techniques de séparation dépendent des caractéristiques de la protéine à isoler. En utilisant plusieurs méthodes de séparation croisées, selon plusieurs caractères physico-chimiques, il est possible d'obtenir un produit riche en protéines d'intérêt, utilisable pour la formulation d'un médicament.

La principale technique de purification utilisée est la chromatographie. Celle-ci permet de séparer différents éléments d'un liquide selon un critère spécifique : taille ou poids moléculaire, charge, hydrophobie, affinité particulière, etc ...

### 3.6 Fill and Finish

Les dernières étapes du « Down Stream Process » consistent à préparer le produit avant son conditionnement.

Les différents tampons et solvants de purifications sont remplacés par le tampon de formulation, un solvant adapté à une injection dans le corps humain (pH 7,4). La concentration du produit sera ensuite ajusté à la cible souhaitée. Ces 2 actions s'effectuent majoritairement grâce aux techniques de dialyse et de diafiltration.

Enfin, dans certains cas, des étapes de sécurisation biologique plus ou moins importantes et nombreuses devront avoir lieu. En effet, en fonction de la source des protéines purifiées, le produit pourra présenter un risque infectieux plus ou moins important.

Une fois le produit purifié, sécurisé et à bonne concentration, il faudra le formuler et le conditionner en vue de son utilisation chez le patient. L'administration de ces traitements étant faite majoritairement par voie injectable, on retrouve ces spécialités sous 2 conditionnements :

- Seringue unitaire prête à l'emploi
- Flacons de produit lyophilisé à reconstituer avant injection.

## 4 Impact de la glycosylation sur la protéine

### 4.1 Facteurs déterminant de la glycosylation d'une protéine recombinante

Si la séquence protéique peut être connue et maîtrisée par la connaissance de l'ADN, la glycosylation dépendra quant à elle de plusieurs facteurs.

#### 4.1.1 Gène

Le premier élément déterminant de la glycosylation d'une protéine est la présence ou non de site de glycosylation dans sa séquence. Pour permettre la glycosylation, il faut en effet la présence dans la séquence protéique :

- Des motifs Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr (*où X est un acide aminé quelconque excepté la proline*) pour une N-glycosylation
- D'un résidu serine ou thréonine pour la O-glycosylation

La séquence protéique dépendant directement du gène codant pour cette dernière, il sera possible de modifier l'ADNc que l'on souhaitera transfecter grâce au génie génétique.

Deux cas seront possibles :

- La protéine est glycosylée, mais cette glycosylation n'est pas nécessaire à son activité. Il est alors possible de supprimer le site de glycosylation afin de rendre plus homogène les protéines produites et supprimer les effets adverses potentiellement apporté par celle-ci.

On trouve cette approche dans le développement de certaines thérapies contre le VIH utilisant des anticorps neutralisants (35). L'élimination de certains profils de glycosylation améliore l'homogénéité des lots produits sans affecter ces autres caractéristiques. La production commerciale et la mise sur le marché de ces nouvelles thérapeutiques se trouve alors simplifié.

- La protéine n'est pas glycosylée mais nécessite la présence de glycanes pour augmenter ses caractéristiques pharmacologiques. L'insertion d'un site de glycosylation sera à effectuer à l'endroit souhaité.

Ce processus a été mené par les équipes d'AMGEN pour le développement de l'Aranesp® (Darbépoétine alpha), un dérivé de l'érythropoïétine humaine modifié génétiquement pour y

ajouter deux sites de glycosylation supplémentaires, approuvé par la FDA en 2001. Cette modification se traduit par une demi-vie augmentée et une efficacité renforcée pour cette nouvelle forme de la protéine (36).

#### 4.1.2 Cellule hôte

Le choix de la cellule usine a un impact considérable sur la glycosylation de la protéine recombinante. Comme vu précédemment les modèles de productions procaryotes ne pourront pas effectuer de modifications post traductionnelles complexes du fait de l'absence d'organites appropriées.

La majorité des protéines thérapeutiques recombinantes sont produites dans des systèmes mammifères (CHO ; NS0 ; SP2/0) du fait de leur capacité à effectuer une glycosylation proche de l'humain. Cependant, la glycosylation effectuée par ces cellules présentera certaines différences pouvant impacter le produit fini. Ainsi, plusieurs travaux sont menés afin de modifier ces cellules afin de modifier certaines de leurs voies de glycosylation. La suppression des gènes codant pour les enzymes spécifiques de certains schémas de glycosylation permettra de créer des motifs de glycosylation plus souhaitables. Cette approche est beaucoup utilisée dans la conception des anticorps monoclonaux actuels (37).

Les cellules mammifères présentent toutefois l'inconvénient d'avoir une culture longue et complexe. Aussi certaines équipes ont cherché à créer artificiellement, grâce à la glycoingénierie, des schémas de glycosylation humains dans des levures, qui sont des organismes plus simples et rapides à cultiver (38). La levure bien que capable de N-glycosylation présente une architecture de glycanes très différentes de l'humain, ne la rendant pas utilisable pour la production de protéines thérapeutiques glycosylées. En modifiant les enzymes de la levure impliquées dans la glycosylation, par celles des voies de biosynthèse des glycanes humains, il est possible d'« humaniser » une levure.



#### 4.1.3 Substrat

Le milieu de culture et les conditions de productions vont aussi exercer une influence sur la glycosylation des protéines.

La composition du milieu et son évolution au cours de la production ont montré une forte influence sur le type de sucre greffé. Le niveau de fucosylation des protéines a pu être corrélé au taux d'oxygène dissous et on a pu montrer qu'une accumulation d'ammoniaque dans le milieu diminuait la quantité d'acide sialique fixé aux protéines.

Plusieurs études ont aussi mis en évidence des variations dans la quantité de protéines glycosylées en fonction des conditions de cultures. Tout comme pour la partie protéique, la partie glycane sera sensible aux variations importantes de températures, de pH ou aux forces de cisaillement (39).

### 4.2 Devenir de la protéine et impact pharmacocinétique

La pharmacocinétique a pour but d'étudier le devenir d'un médicament dans l'organisme. La vie d'un médicament dans l'organisme sera rythmée par plusieurs phases : Absorption, Distribution, Métabolisation et Elimination. Plusieurs paramètres permettent de mesurer l'impact de la glycosylation sur la vie du médicament dans l'organisme.

#### 4.2.1 Stabilité

La stabilité d'une protéine conditionne en grande partie l'efficacité de celle-ci. En effet, plus une protéine sera stable, moins il y aura de chance que celle-ci soit dénaturée et donc inactive. La dénaturation d'une protéine thérapeutique correspond à un mauvais repliement ou à une perte de structure de niveaux supérieurs (secondaire ou tertiaire). Elle peut apparaître de différentes manières : une exposition à certains pH, certaines enzymes, des forces mécaniques exercées trop importantes.

Aussi, en augmentant la stabilité d'une protéine, on renforce sa capacité à résister au voyage dans le corps humain, mais aussi au processus industriel de purification et de formulation. La stabilisation de la protéine peut être engendrée de manière externe, via certains excipients, ou bien directement en jouant sur la protéine et sa structure via des mutations ou des modifications post traductionnelles précises.

La stabilisation via la glycosylation représente une voie très prometteuse, notamment dans la diversité de ces effets protecteurs qu'elle peut amener. La glycosylation peut réduire la dégradation chimique et thermique, l'oxydation, la sensibilité au pH, les attaques protéolytiques et les phénomènes d'agrégation ou de précipitation (40).

Le repliement protéique et le maintien structural de la protéine dépend de l'équilibre thermodynamique entre les différents acides aminés. Les chaînes latérales des acides aminés présentant des structures chimiques différentes, elles sont le lieu d'interaction intermoléculaire et de liaison non covalentes (liaison de Van der Waals, liaison hydrogène, interaction hydrophile / hydrophobe, interaction électrostatique). Des agressions chimiques ou physiques peuvent venir modifier la structure moléculaire des chaînes latérales des acides aminés et perturber l'équilibre thermodynamique permettant le maintien structural de la protéine.

Dans le cas des instabilités chimiques telles que la dégradation protéolytique ou l'oxydation, la glycosylation permet, via l'augmentation de l'encombrement stérique, d'empêcher l'attaque des radicaux libres ou des enzymes protéolytiques. Ces éléments dénaturants ne peuvent plus agir sur les acides aminés et modifier les chaînes protéiques. Le repliement, la structure tridimensionnelle et la fonctionnalité de la protéine sont préservés.

Les instabilités physiques peuvent apparaître à la suite de changements de pH, de température, ou d'environnement chimique (solvant polaire, hydrophobe, etc...). La modulation de ces paramètres chimiques dérègle l'équilibre des forces s'exerçant dans la protéine et provoque des phénomènes d'agrégation ou de précipitation. La structure des glycanes, qui leur permet d'établir des interactions intermoléculaires, et l'ajout de glycanes sur la protéine viendront contrebalancer dans une certaine mesure ce dérèglement.

Avec une protéine dont la stabilité aura été renforcée, les rendements de purification seront meilleurs car la dégradation due aux différentes étapes affectera moins de protéines. De plus, la protéine résistera mieux au trajet dans l'organisme, son effet sera renforcé et son dosage plus précis. La glycosylation comme élément de stabilisation est d'ores et déjà utilisée pour certaines spécialités commercialisées (40).

#### 4.2.2 Biodisponibilité et Diffusion tissulaire (Adsorption et Distribution)

Pour déployer son effet, la protéine doit être au contact de sa cible thérapeutique. Celle-ci se trouve généralement dans des tissus spécifiques, éloignés du point d'administration, et l'intégralité de la dose reçue ne pourra pas y accéder. Pour mesurer cette quantité réelle atteignant le site actif, deux paramètres peuvent être mesurés : la biodisponibilité et la diffusion tissulaire.

La biodisponibilité représente la fraction (F), de la dose administrée par voie extravasculaire qui atteint la circulation générale (de 0 à 100 %). Celle-ci va dépendre de la voie d'administration et les caractéristiques de la molécule. Plus la disponibilité d'un médicament sera importante, plus la dose et la fréquence d'administration pourront être faibles. De plus, une biodisponibilité importante permet de réduire les effets liés aux différences interindividuelles. C'est un paramètre critique, que l'on cherche à maximiser lors des phases de développement du médicament.

Une fois dans la circulation générale, le médicament doit pénétrer dans le tissu pour atteindre la cible. Ce passage nécessite que la protéine se trouve sous forme libre, non liée à des protéines plasmatiques ; et dépendra de l'affinité de celle-ci pour les tissus et les transporteurs présents.

Une étude (41) américaine mentionnait dès 1991 la possibilité d'une variabilité des profils pharmacocinétiques liées aux différentes glycoformes de l'érythropoïétine humaine recombinante. En fonction des glycanes attachés, la disponibilité de la protéine au niveau du site actif était plus importante et les effets plus importants. Ceci est confirmé dans les années 2000 par plusieurs études s'intéressant à la glycosylation comme voie d'amélioration. Il a été montré qu'il est possible que l'interleukine IL-1 $\alpha$  portant un acide sialique N - acétylneuraminique (NeuAc-IL-1 $\alpha$ ) se distribuait à de plus fort niveau que l'IL-1 $\alpha$  dans tous les tissus, excepté le foie. (*NeuAc-IL-1 $\alpha$  distributed at higher levels than IL-1 $\alpha$  in all the tissues except for the liver at 2 h*) (42).

Dans le cas des protéines thérapeutiques, l'administration est très souvent réalisée par voie injectable. Si cette voie d'administration permet une absorption et une biodisponibilité de la protéine importante, elle présente des contraintes importantes pour le patient. De plus en plus de recherches sur des formes d'administration non injectables, tels que des aérosols sont menées. Celles-ci permettraient de faciliter l'accès et l'administration de ce type de traitement.

Une étude de 2015 (43) a pu prouver qu'une conjugaison de lactose à la protéine LHRH (hormone de libération des gonadotrophines hypophysaire) permettait une administration par voie orale chez le rongeur. Cette hormone est utilisée notamment dans le traitement des cancers de la prostate.

#### 4.2.3 Demi-vie (Métabolisme et Elimination)

La demi-vie d'un médicament correspond au temps nécessaire pour que, après son administration, la concentration plasmatique du médicament soit diminué de moitié. Un médicament est éliminé au bout de 5 demi-vies. C'est un paramètre pharmacocinétique important car il détermine la fréquence d'administration, lorsque la prise d'un médicament doit être répétée. La demi-vie d'un médicament dépend en outre de la clairance hépatique ou rénale du patient, elle pourra donc être modifiée dans certains cas pathologiques. Sa connaissance est donc primordiale dans l'adaptation posologique de médicament, notamment lorsque la marge thérapeutique est étroite.

Il a été montré, en 2010, qu'avec un schéma de glycosylation particulier, il était possible d'allonger la demi-vie de la somatotropine, plus couramment appelée hormone de croissance (44).

La somatotropine est une hormone humaine intervenant dans la croissance des enfants et adolescents et est naturellement synthétisée dans le cerveau. Son déficit entraîne un retard de croissance de l'individu. Aussi, il est possible d'administrer de la somatotropine humaine recombinante pour compenser son absence pathologique. Plusieurs spécialités sont commercialisées et consiste en des injections sous-cutanées quotidiennes.

Afin de simplifier son utilisation et réduire la fréquence d'injection, une équipe de scientifiques danois, cherchant à augmenter la demi-vie de ce produit, s'est intéressée à sa glycosylation. La somatotropine recombinante n'est habituellement pas glycosylée, comme la protéine humaine sauvage, aussi plusieurs sites de glycosylation ont été introduits dans le gène de la protéine humaine. Ce nouvel ADN a été transféré dans des cellules CHO et les glycoprotéines ainsi produites ont été analysées.

Il en ressort que les formes présentant une triple glycosylation ont montré chez le rat une clairance diminuée et par conséquent une demi-vie entre 10 à 20 fois plus longue que la forme sauvage de la protéine. Cette différence de profil pharmacocinétique, se traduit aussi lors des observations *in vivo*. En pratique, on observe chez les rats ayant reçu une dose unique de cette

forme glycosylée les mêmes effets que chez les rats ayant reçu une dose quotidienne de somatotropine sauvage.

Cette étude rejoint d'autres articles montrant la circulation plus longue des protéines EPO, FSH ou encore de certains interférons présentant des sites de glycosylation supplémentaire (45).

#### 4.3 Impact pharmacodynamique

Une fois que la protéine aura atteint la cible thérapeutique, elle pourra agir et déployer son effet. Si l'effet thérapeutique recherché, à l'origine du développement du biomédicament, est entraîné par la partie protéique, la glycosylation aura un rôle à jouer dans la modulation de cet effet.

Dans la plupart des cas, la fonction d'une protéine est engendrée par le récepteur sur lequel elle agira. Comme vu précédemment, la glycosylation permet de moduler cet effet. Cependant, dans le cas des anticorps monoclonaux, la glycosylation pourra être à l'origine de nouvelles fonctions à ces protéines thérapeutiques, ce qui pourra augmenter leur effet et permettre de nouvelle voie de traitement.

Les anticorps monoclonaux sont de grosses protéines thérapeutiques, constituées de 4 sous unités protéiques. Par convention, on différencie plusieurs parties ou fonctions différentes :

- La partie Fab (Fragment antigen-binding) est la région variable de l'anticorps. Elle permettra la reconnaissance de l'épitope et donne sa spécificité à l'anticorps. Cette partie est représentée en orange sur la figure 10.
- La partie Fc (Fragment cristallisable) est la partie constante et sera à l'origine des fonctions effectrices des anticorps. Sa séquence sera très proche d'un anticorps à un autre. Ce fragment contient un site de glycosylation. Cette partie est représentée en bleu sur la figure 10.

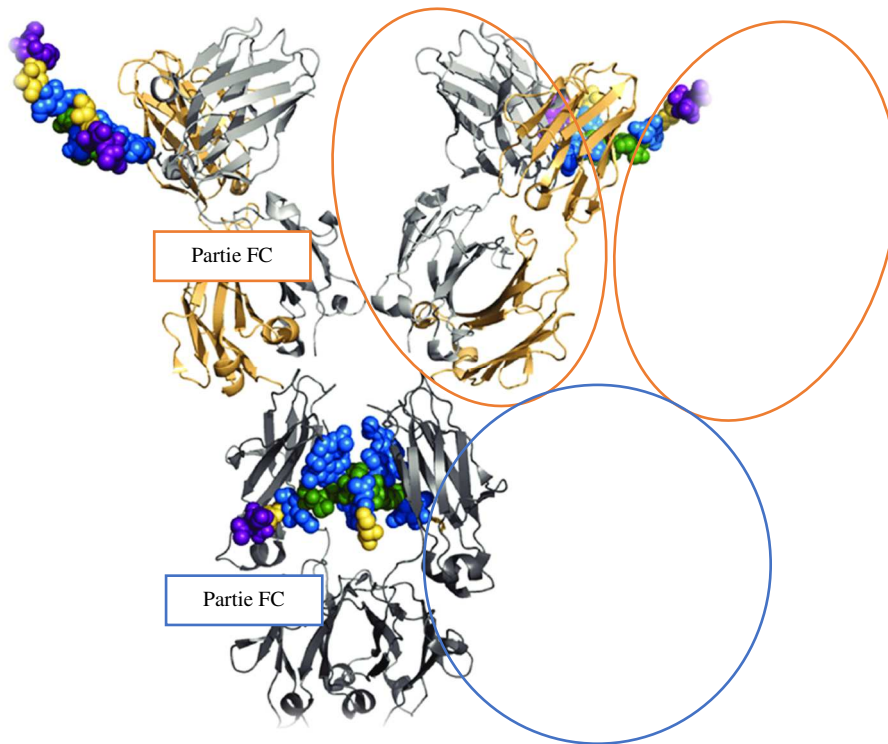


Figure 10 : Cetuximab, structure tertiaire (46)

L'un des intérêts principaux des anticorps thérapeutiques est leur capacité de ciblage et de neutralisation des antigènes. La forte spécificité des médicaments biologiques permet des thérapies ciblées, très efficaces et présentant des effets secondaires beaucoup moins importants que des traitements chimiques systémiques.

Cependant, depuis plusieurs années, l'utilisation des fonctions effectrices comme mécanisme thérapeutique principal sont aux cœurs des recherches. Les fonctions effectrices des anticorps correspondent aux mécanismes de l'ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) et de la CDC (complement-dependent-cytotoxicity).

L'ADCC, la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps, correspond aux recrutements de différentes cellules effectrices (cellules NK, macrophages) qui vont éliminer le corps étranger grâce à des mécanismes de cytotoxicité ou de phagocytose. La CDC, c'est-à-dire la cytotoxicité dépendante du complément, entraîne la aussi l'élimination du corps indésirable mais cette fois via le système du complément.

Depuis plusieurs années, on sait que certains schémas de glycosylation de la partie Fc de l'anticorps vont profondément affecter ces fonctions effectrices. T Shantha Raju, dans son article « *Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs* » (47) dresse un bilan des conséquences que peuvent avoir ces sucres.

Ainsi la réponse ADCC est :

- Augmentée en cas d'absence de Fucose sur le corps du groupement glycane fixé à l'anticorps
- Augmentée lors d'une hypermanosilation
- Diminuée en présence d'acide sialique terminaux

Concernant la réponse CDC, elle est :

- Augmentée par la présence d'un ou de deux galactoses à l'extrémité des antennes du glycane.
- Réduite lorsque la terminaison sera effectuée par des N-Acetylglucosamine

Ces effets de la glycosylation sur les fonctions effectrices, illustrés par la figure 11, sont à mettre en lien avec la modification d'affinité de certains récepteurs spécifiques. Ainsi, l'affinité du fragment Fc pour le récepteur FcγRIIIa, présent sur les cellules NK entre autres est responsable de l'ADCC, sera augmentée en cas d'afucosylation de l'anticorps.

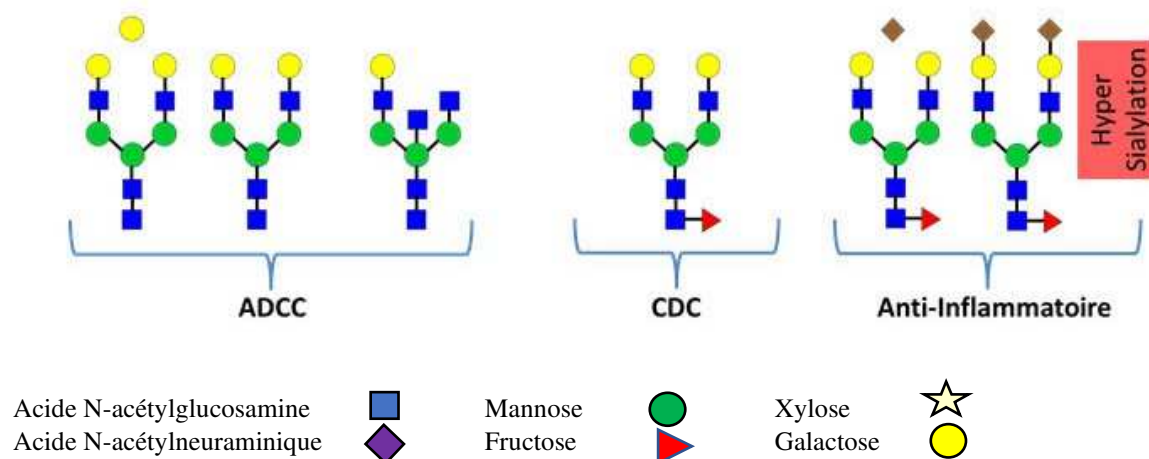


Figure 11 : Fonctions effectrices et schéma glycosidiques (48)

La modification de ces fonctions effectrices peut radicalement changer l'impact thérapeutique de ces protéines thérapeutiques et ouvre des voies de traitement, notamment dans différents types de cancers. En 2018, trois spécialités à base d'anticorps non fucosylés étaient déjà commercialisées : Gazyva® (Obinutuzumab) ; Poteligeo® (Mogamulizumab) et Fasenra™ (Benralizumab). Plus d'une vingtaine d'anticorps afucosylés sont en cours d'études et pourraient arriver sur le marché prochainement (49).

#### 4.4 Immunogénicité

Une dernière propriété de la protéine peut être impactée par les sucres qu'elle porte, son immunogénicité. Le caractère immunogène d'une molécule représente sa capacité à provoquer une réaction immunitaire. Dans ce cas, ces molécules sont considérées comme des antigènes, des intrus parmi les composants de l'individu, et sont détectées et ciblées par les anticorps de l'individu.

L'immunogénicité d'une protéine peut être due à sa séquence propre, la protéine n'est pas humaine ou trop différente de l'attendue et sera éliminée. Ce mécanisme est à l'origine de l'humanisation des anticorps monoclonaux thérapeutiques. On a souhaité faire disparaître les caractères murins, détectés par le système immunitaire, au profit d'une séquence humaine.

Le même phénomène pourra apparaître vis à vis des sucres composant la glycoprotéine thérapeutique. Cela pourra entraîner une perte d'efficacité, la protéine étant inactivée voir détruite par les anticorps du patient, ou même une réaction allergique au traitement.

Cette immunogénicité des sucres dépend essentiellement de la cellule usine utilisée. Bien que le gène recombinant soit humain, et donc que les sites de glycosylation se situent au même endroit, la glycosylation est réalisée par les organites de la cellule usine, selon des schémas spécifiques à son espèce. Les levures, les cellules d'insectes ou les cellules de plantes présentent des sucres différents, non présents chez l'homme qui ne sont donc pas souhaitables dans le cas d'une stratégie d'optimisation du paramètre de la glycosylation.



La majorité des protéines thérapeutiques glycosylées est aujourd'hui produite dans des cellules de mammifères, notamment dans des cellules de rongeurs :

- Issu du hamster comme le modèle CHO (Chinese Hamster Ovary)
- Issu de cellules de myélome de souris comme les modèles SP2/0 ou N2/0

Malgré des profils de glycosylation très proches de ceux présents chez les protéines humaines, certaines spécificités pourront persister et provoquer des phénomènes immunogènes.

Une de ces réponses immunogènes bien étudiée concerne les acides sialiques pouvant être greffés à la protéine synthétisée. Les deux principaux types d'acide sialique sont :

- L'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac), un type d'acide sialique très présent chez les différents mammifères et principal acide sialique chez l'humain.
- L'acide N-glycolylneuraminique (Neu5Gc), un acide sialique synthétisé chez de nombreux mammifères mais absent chez l'homme. Cet acide sialique entraînera une réponse importante du système immunitaire (50).

Dans le cas d'une production d'une protéine humaine dans un modèle mammifère, il est possible que lors des étapes de glycosylation, certaines protéines se voient greffer des acides sialiques de type Neu5Gc. En fonction de leur proportion, le médicament final peut entraîner une réponse immunitaire du patient lors de l'injection.

D'autres incompatibilités de sucres non présents chez l'humain ont aussi été rapportées par exemple pour le  $\beta(1,2)$ -Xylose, l' $\alpha(1,3)$ -Fucose, ou bien l' $\alpha(1,3)$ galactose (51), responsable des phénomènes d'hypersensibilité au cetuximab (52).

Le Centre Régional de Pharmacovigilance (CRPV) de Lille rapporte ainsi que les réactions d'hypersensibilité peuvent concerner jusqu'à un tiers des patients traités (53). La production du cetuximab dans des cellules myélomateuses murine (type SP2/0 ou N2/0) conduit à l'apparition d'un résidu galactose- $\alpha$ -1,3-galactose dans son motif de glycosylation. Ce glucide est synthétisé chez de nombreux mammifères mais pas chez l'homme. Il est donc reconnu comme un corps étranger par le système immunitaire humain.

## **5. Impact sur le monde industriel et moyen de contrôle**

Au vu des nombreux impacts et variations que la glycosylation peut entraîner, le profil de glycosylation des protéines produites et commercialisées par l'industrie pharmaceutique doit être réfléchi, connu et contrôlé tout au long du processus de fabrication.

Une glycosylation différente à celle attendue pourra être à l'origine d'un traitement moins efficace ou même d'effets indésirables pour le patient. Le profil glycosidique est donc un CQA (Critical Quality Attribute) d'après la définition de l'ICH Q8 R2 (54) :

« Un CQA est une propriété ou une caractéristique physique, chimique, biologique ou microbiologique qui doit se situer dans une limite, une plage ou une distribution appropriée pour garantir la qualité souhaitée du produit. »

La glycosylation doit être au cœur de la conception du procédé de fabrication (Critical Process Parameters - CPP) et de la stratégie de contrôle du médicament, comme le veut la stratégie « Quality by Design ».

Comme vu précédemment la « conception » de la cellule joue un rôle primordial dans la détermination du profil glycosidique de la protéine qui sera produite (*Partie III*). Cependant, la glycosylation sera dépendante aussi des conditions de production. De ce fait, le contrôle du profil glycosidique de la protéine finale devra être réalisé pour s'assurer de la bonne correspondance avec le « design » initial et les propriétés voulues.

De nombreuses méthodes d'analyses existent pour caractériser les différents sucres. Bien souvent, ces techniques sont utilisées de manière associée ou combinées à des traitements chimiques. L'analyse des glycanes peut s'effectuer à plusieurs échelles, en fonction de l'objectif à atteindre. Le chapitre 2.2.59 de pharmacopée européenne (55) a pour but d'aider les industriels et chercheurs dans l'« analyse glycanique des glycoprotéines » en listant les différentes techniques de référence en fonction des types d'analyses souhaitées. L'ensemble est résumé sur la figure 12.

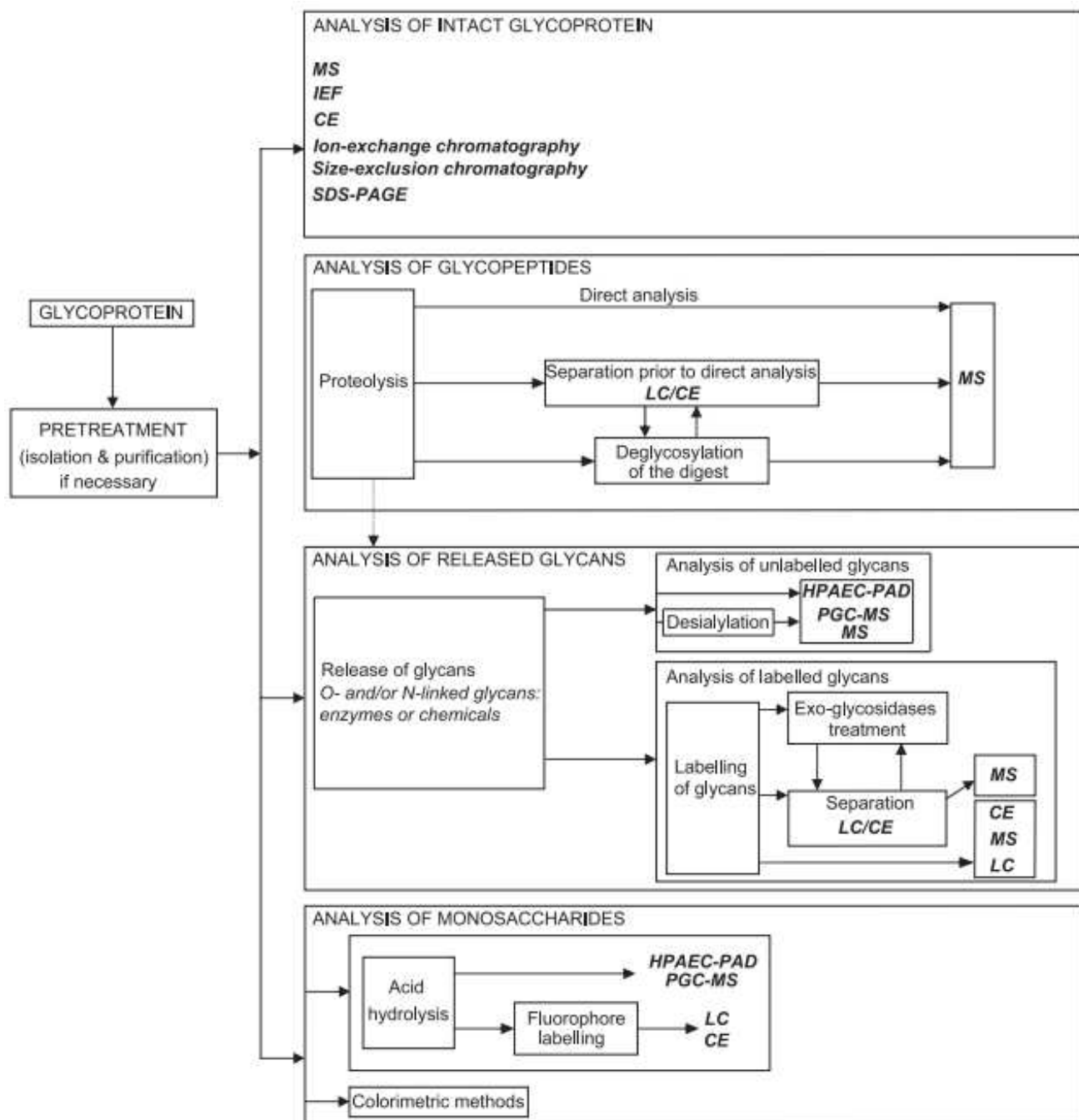


Figure 12 : Pharmacopée européenne, chapitre 2.2.59 « Analyse glycanique des glycoprotéines »(55)

## 5.1. Méthodes analytiques

### 5.1.1. Electrophorèse Capillaire (CE)

La méthode analytique la plus utilisée pour l'analyse des glycanes est l'électrophorèse capillaire.

Les méthodes d'électrophorèse regroupent différentes techniques de séparation de molécules en fonction de leur taille et de leur charge suite à l'application d'un champ électrique. Dans le cas de l'électrophorèse capillaire, la séparation s'effectue au sein d'un capillaire de quelques micromètres de diamètre composé de silice vierge et rempli d'une solution tampon électrolytique. Le mélange à analyser est injecté dans le capillaire grâce le plus souvent à l'application d'une pression un temps donné sur le flacon contenant l'échantillon à analyser et placé sous le capillaire.

Une fois le montage sous tension, les molécules chargées commencent à migrer. Un détecteur placé avant la sortie du capillaire permet le recueil des données lors du passage des molécules et la génération d'un électrophérogramme. Les méthodes de détection les plus courantes sont la spectroscopie UV-visible et la fluorescence. La figure 13 représente de manière schématique l'installation et le principe de fonctionnement de cette méthode.

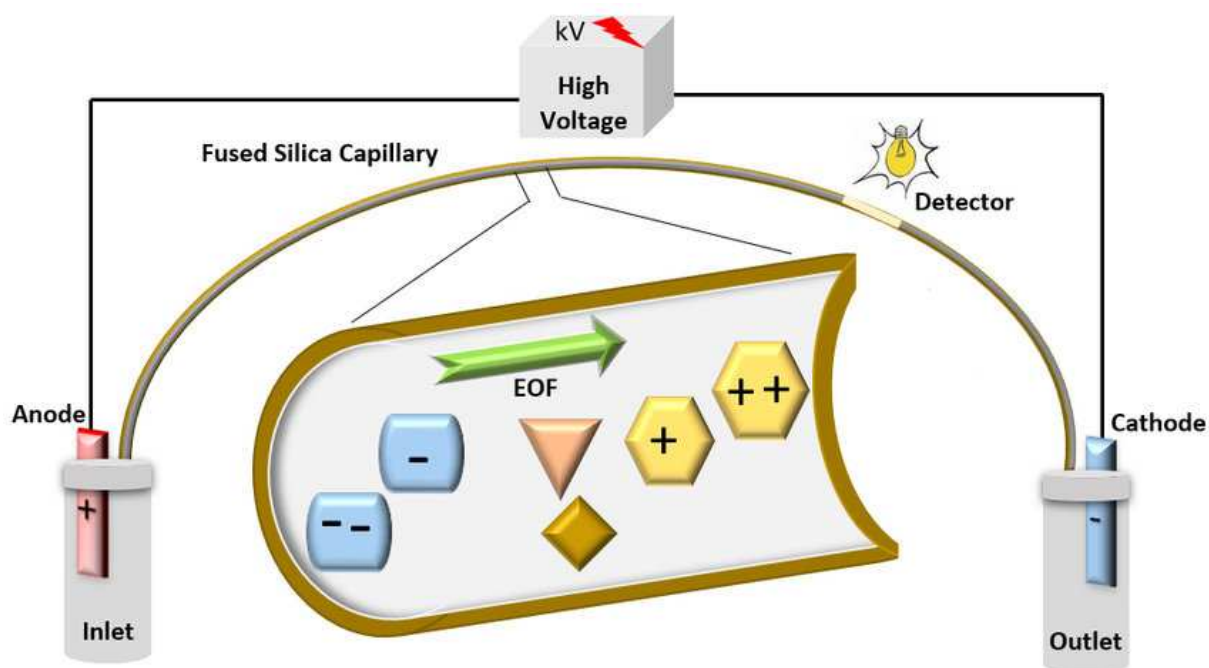


Figure 13: Electrophorèse capillaire - Principe de fonctionnement (56)

L'électrophorèse capillaire répond donc aux principes de toute méthode électrophorétique. Elle se distingue cependant par un phénomène supplémentaire appelé courant électroosmotique. Le courant d'électroendosmose est un écoulement de liquide dans le capillaire qui est la conséquence de la présence de charges à la surface du capillaire. Celui-ci, constitué de silice, présente des fonctions silanols (Si-OH) à sa surface. En fonction du pH du tampon de l'électrolyte, ces fonctions silanol peuvent s'ioniser et on retrouvera des cations excédentaires dans le tampon. Ceux-ci étant solvatés, lors de l'application du champ électrique, il se produira une migration de ces cations vers la cathode entraînant les molécules d'eau qui les solvatent. C'est ainsi que les molécules neutres, entraînées par cet écoulement d'eau, migreront et pourront être détectées mais sans séparation (57).

D'un point de vue relations fondamentales, cela se traduit au travers des équations suivantes :

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi r\eta}$$

$\mu$  : mobilité électrophorétique ( $\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )  
 $v$  : vitesse de migration ( $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ )  
 $E$  : champ électrique ( $\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$ )  
 $q$  : charge (coulomb)  
 $\eta$  : viscosité du milieu ( $\text{Pa} \cdot \text{s}^{-1}$ )  
 $r$  : rayon de Stokes (m)

Pour l'analyse des glycanes, les techniques utilisées préférentiellement seront l'électrophorèse capillaire avec fluorescence induite par laser (CE- LIF). Des bases de données expérimentales pour le temps de rétention, exprimées en valeurs GU (glucose unit), des différentes espèces de glycanes existent et permettront leur identification.

### 5.1.2. Chromatographie en phase liquide (CL)

La chromatographie est une technique de séparation et d'analyse quantitative. Elle consiste en une séparation des composés, entraînés par un liquide (phase mobile) au travers d'un solide (phase stationnaire). Elle peut prendre des formes simples comme la chromatographie sur couche mince ou des formes plus complexes, comme les colonnes chromatographiques haute performance.

En fonction de la composition des phases mobiles et stationnaires, la séparation pourra s'effectuer selon différents paramètres physico chimiques :

- L'affinité et la polarité avec le solvant (Chromatographie d'affinité)
- L'absorption (Chromatographie par absorption)
- La taille (Chromatographie d'exclusion stérique)
- La charge (Chromatographie échangeuse d'ions)

Au cours de son déplacement au travers de la phase stationnaire, les différents composants de l'échantillon seront plus ou moins retenus en fonction des propriétés mises en jeu par la phase mobile. Les composants ayant une forte interaction avec la phase stationnaire et peu avec la phase mobile mettront plus de temps à être élués, c'est-à-dire à traverser la phase stationnaire. A l'inverse, les composants ayant moins d'interaction avec la phase stationnaire seront élués plus rapidement (Fig 14).

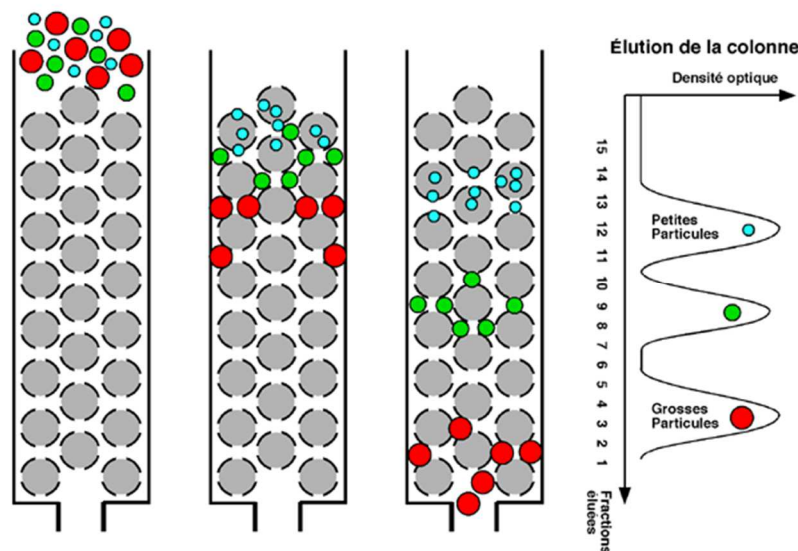


Figure 14: Chromatographie liquide d'exclusion , principe de fonctionnement (58)

Les deux méthodes les plus utilisées dans les analyses des glycoprotéines sont la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC).

L'HPLC se différencie d'une chromatographie en phase liquide « classique » par la granulométrie plus petite de sa phase stationnaire et la mise sous pression de la phase liquide. Ceci permet d'améliorer la résolution, les seuils de détection et la rapidité de la méthode.

L'HILIC est une variation de la chromatographie en phase normale. Elle se caractérise par l'utilisation d'une phase stationnaire polaire (similaire aux analyses en phases normales) mais en combinaison avec les éluants et une phase mobile similaire à ceux utilisés en phase inverse (eau et tampon). Dans le cas de l'HILIC, les conditions initiales de la phase mobile seront à fort pourcentage de solvant organique ce qui engendrera la formation d'une couche aqueuse à la surface la phase stationnaire. Grâce à cet effet, il sera possible de séparer les différents composants selon leurs interactions hydrophilie/hydrophobe en plus de leur adsorption sur la phase stationnaire.

La séparation par HILIC est devenue une des méthodes utilisées préférentiellement pour l'analyse des glycanes notamment grâce une meilleure rétention, une résolution et une sensibilité plus importante (59). Ceci permet en effet une séparation des isomères structuraux, particulièrement compliqué à réaliser via d'autres techniques. Comme pour l'électrophorèse capillaire, des bases de données recensant les différents temps de rétention en fonction des espèces de glycanes permettront leur identification.

### 5.1.3. Spectrométrie de masse (MS)

La spectrométrie de masse (MS) est une technique d'analyse qui permet la détermination des masses moléculaires des échantillons analysés. De ces profils analytiques, il sera possible d'identifier et de quantifier les différents composants de l'échantillon.

L'analyse par spectrométrie de masse s'effectue en deux temps. Premièrement, l'échantillon sera ionisé et vaporisé. Puis ces ions seront séparés selon leur rapport masse/charge et analysés. Plusieurs techniques d'ionisation et d'analyse existent, pouvant être combinées en fonction de l'analyse souhaitée. Il en résulte plusieurs appellations et plusieurs propriétés résumées sur le tableau 3.

IONISATION		ANALYSEUR	
Chimique	CI	Quadripole	Q
Electronique	EI	Pièges à ions	IT
Thermique	TIMS	linéaire	LIT
Bombardement d'atomes rapide	FAB	Temps de vol	TOF
Electronébulisation ou electrospray	ESI	Résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier	FTICR
Désorption-ionisation laser assistée par matrice	MALDI		

*Tableau 3 : Techniques d'ionisation et d'analyse en spectrométrie de masse*

Pour affiner les analyses, il est possible de coupler les différents types d'analyseurs entre eux. On parle alors de spectroscopie de masse en tandem (MS/MS).

Dans le cas de l'analyse des glycanes, la spectrométrie de masse est souvent couplée à la chromatographie en phase liquide ou l'électrophorèse capillaire. Le spectromètre de masse fonctionne alors comme un détecteur. Du fait de sa forte résolution la spectroscopie de masse s'est imposée comme l'un des outils d'analyses des profils glycosidiques les plus utilisés. Les glycanes absorbent peu les ultraviolets, ce qui complique leur analyse par des moyens spectroscopiques UV-Visible. La spectroscopie de masse permet au contraire de mettre en lien la masse et la composition des glycanes.



Les ionisations MALDI et ESI sont les deux principales techniques utilisées dans l'étude des glycanes. La spectroscopie MALDI-TOF a été appliquée à des analyses à haut débit dans une étude de 2013 (60). Cette technique est très souvent utilisée comme première étape et permet d'estimer la diversité des glycanes présents, et cela avec une faible dépense d'échantillon. Cependant pour une analyse précise de la séquence des glycanes, il faudra utiliser des techniques combinées comme la spectroscopie de masse en tandem ou en association avec l'électrophorèse capillaire (CE-MS) et la chromatographie liquide (LC-MS).

## 5.2. Applications

### 5.2.1. Analyse directe des glycoformes et des glycoprotéines

Le premier niveau d'analyse se fera à l'échelle de la glycoprotéine entière. L'analyse directe des glycoformes est une méthode rapide qui ne demande pas de préparation. L'analyse s'effectue sur des échantillons issus directement du produit à analyser et permet donc une étude facile du schéma global de glycosylation des glycoprotéines de l'échantillon. On s'intéressera dans ces cas-là à la glycoprotéine dans son intégralité, protéine et sucres greffés.

De nombreux outils analytiques existent pour caractériser les glycoprotéines intactes. Les techniques les plus utilisées pour ce type d'analyse sont l'électrophorèse capillaire ou la chromatographie en phase liquide.

C'est un moyen rapide et robuste de déterminer l'homogénéité entre les lots. En effet, elle permet de quantifier les différences de glycosylation entre les glycoprotéines d'un échantillon ou les absences de glycosylation. Ces caractéristiques ont été démontrées sur une méthode associant électrophorèse capillaire, ionisation par électrospray et spectrométrie de masse. (61)

Si l'absence de préparation de l'échantillon est l'avantage principal de cette approche, il s'agit aussi de sa limite. Il sera compliqué de détecter des glycoformes peu abondantes ou bien de caractériser les différents glycanes présents dans l'échantillon. Il faudra pour cela utiliser des traitements enzymatiques et adopter une analyse des glycopeptides et des glycanes libres.

### 5.2.2. Analyse des glycopeptides et de l'hétérogénéité

Pour permettre une analyse plus précise et la caractérisation des glycopeptides (séquence peptidique et composition en glycanes), l'échantillon sera dans un premier temps digéré par des enzymes protéolytiques (ex : trypsine) puis analysé directement ou après séparation (HPLC ou CE) par spectrométrie de masse.

L'analyse des glycopeptides et de leur hétérogénéité fournit des informations sur les propriétés de la glycosylation, sur le degré d'occupation des sites de glycosylation et sur les structures oligosaccharidiques. Elle permettra d'identifier les sites de glycosylation, la fréquence des différentes glycoformes et de les caractériser. Ceci permet de comprendre les apports structurels

des glycanes sur les protéines et lien avec la sécurité et l'efficacité du produit. L'avantage de cette méthode est de conserver les informations en lien avec le site de glycosylation. Il est alors possible de surveiller l'hétérogénéité des glycopeptides spécifiquement d'un site de glycosylation même si la glycoprotéine en présente plusieurs (62). Par exemple, le chromatogramme de la figure 15 permet une identification séparée des glycopeptides présents sur un anticorps monoclonal qui possède deux sites de glycosylation (un sur la partie Fc et un sur la partie Fab).

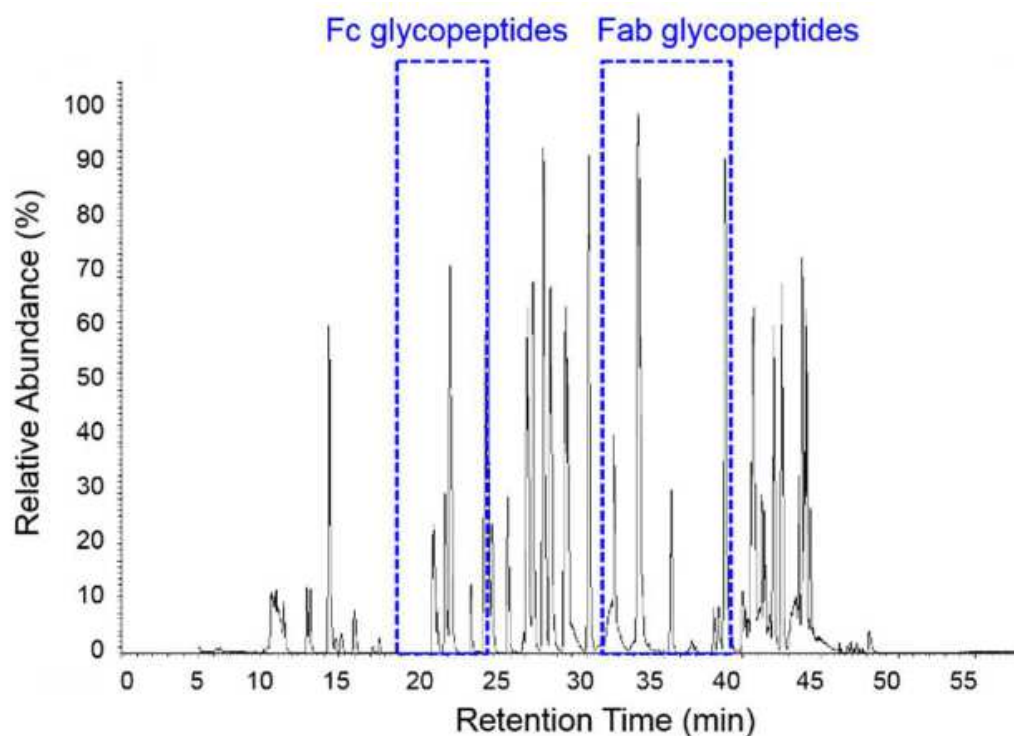


Figure 15: Chromatogramme HILIC identifiant des glycopeptides présents sur les 2 sites de glycosylation (62)

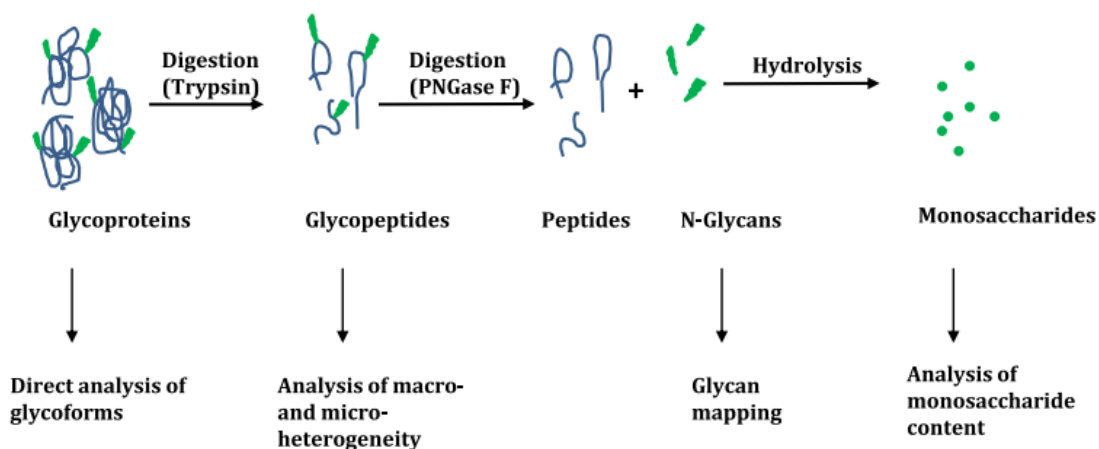
La difficulté dans ce type d'approche sera liée à la préparation de l'échantillon et au traitement enzymatique. En effet celui-ci peut allonger grandement la durée d'analyse (plusieurs heures) ou diminuer la sensibilité lors de la détection par spectroscopie de masse, ce qui n'est pas compatible avec une analyse rapide et sur de nombreux échantillons.

Cependant plusieurs études cherchent à standardiser cette méthode pour une utilisation plus commune. Un article publié dans *Analytical Chemistry* (63) par Matthew Lauber *et al.* propose, quant à lui, une préparation rapide de l'échantillon, couplé à une analyse HILIC. Dans cette étude, les glycoprotéines peuvent être déglycosylées en 10 minutes puis directement analysées.

Ces travaux permettent d'envisager des phases de développement simplifiées où le temps d'analyse pourra être réduit sans perdre en précision dans les analyses.

### 5.2.3. Analyse des glycanes libres et glycan-mapping

Il est possible, en appliquant un traitement enzymatique supplémentaire, de libérer complètement les glycanes des peptides auxquels ils sont liés sur la glycoprotéine (*Figure 16*). Un des traitements les plus utilisés est une digestion par l'enzyme glycolytique PNGase F (peptide-N-glycosidase F) qui catalyse la séparation des N-acétylglucosamine et des asparagines. Il est ainsi possible d'effectuer l'analyse de la composition et de la quantité de monosaccharides d'un produit thérapeutique, ainsi que la détermination de la structure exacte des glycanes présents. Ceci permet d'obtenir des informations sur les différentes populations de glycanes présentes sur la protéine. Une cartographie précise permettra de s'assurer de la sécurité, de l'efficacité du produit et de l'homogénéité inter lot.



*Figure 16 : Schéma des différentes stratégies d'analyse des glycoprotéines (64)*

Les glycanes libérés seront ensuite séparés par HPLC en utilisant des agents ciblant fluorescents ou via électrophorèse capillaire par fluorescence induite (CE- LIF) comme sur la figure 17. L'usage de techniques de fluorescence est nécessaire pour la détection des différents glycanes libres, du fait de l'absence de chromophore au sein de ces derniers. La spectrométrie de masse couplée à ces techniques de séparation haute performante permet de passer outre la pluralité des formes et d'analyser dans le détail la composition quantitative de l'échantillon.

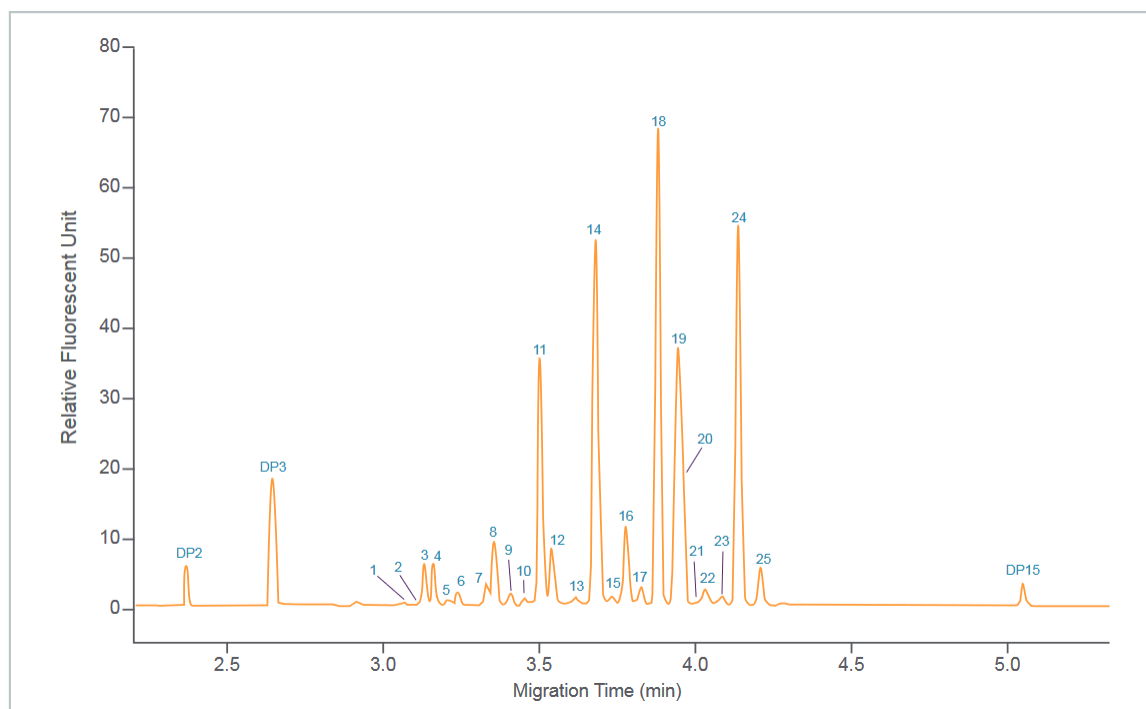


Figure 17 : Analyse rapide via CE-LIF d'un échantillon après digestion par PNGase F (65)

La figure 17 représente une analyse par électrophorèse capillaire par fluorescence induite (CE-LIF). L'axe des abscisses indique les différentes espèces de glycanes libéré à la suite du traitement par PNGase F, chaque pic représentant une structure en fonction de son temps de migration. L'intensité des pics est associée à un index relatif de fluorescence en ordonné. Plus celui-ci est important, plus l'espèce est présente dans l'échantillon.

Des kits de préparations et des équipements automatisés, comme le développe la société SCIEX (65) permettent de réaliser ces analyses rapidement et d'identifier les différents glycanes via des bases de données validées reposant sur les valeurs d'unité de glucose (GU) comme présenté sur la figure 18.

Peak	Structure / Abbreviation Oxford	Migration Time (min)	GU Value	Monoisotopic Mass [Da] NIBRT	Peak	Structure / Abbreviation Oxford	Migration Time (min)	GU Value	Monoisotopic Mass [Da] NIBRT
–	DP2	2.104	2.00	–	13	A2B	3.540	6.94	1519.57
–	DP3	2.367	3.00	–	14	FA2	3.620	7.37	1462.54
1	A2G2S2	3.070	4.70	2222.78	15	A2(3)G1	3.680	7.68	1478.54
2	A2BG2S2	3.110	4.87	2425.86	16	FA2B	3.730	7.97	1665.62
3	FA2G2S2	3.130	5.02	2368.84	17	A2B(3)G1	3.780	8.21	1681.62
4	FA2BG2S2	3.160	5.10	2571.92	18	FA2(6)G1	3.820	8.46	1624.60
5	A2(6)G1S1	3.210	5.35	1769.64	19	FA2(3)G1	3.880	8.75	1624.60
6	A2(3)G1S1	3.240	5.47	1769.64	20	FA2B(6)G1	3.940	9.09	1827.68
7	FA2(6)G1S1	3.290	5.70	1915.69	21	A2G2	4.000	9.40	1640.59
8	FA2(3)G1S1	3.330	5.91	1915.69	22	FA2B(3)G1	4.030	9.55	1827.68
9	A2G2S1	3.350	6.01	1931.69	23	A2BG2	4.080	9.83	1843.67
10	A2BG2S1	3.410	6.29	2134.77	24	FA2G2	4.140	10.13	1868.70
11	FA2G2S1	3.450	6.50	2077.75	25	FA2BG2	4.210	10.50	1989.73
12	FA2BG2S1	3.500	6.76	2280.83	–	DP15	5.049	15.00	–

Figure 18: Identification des glycanes libérés et séparés par CE-LIF selon leur temps de migration, et leur valeur GU (65)

Si cette méthode permet une caractérisation et une analyse qualitative précise, elle présente aussi quelques inconvénients. Le problème principal de l'analyse des glycanes libres proviendra des structures isomériques. Il faudra dans ces cas précis, utiliser des exoglycosidases, des enzymes rompant spécifiquement les liaisons glycosidiques terminales. En effet la PNGase F ne peut pas détacher les glycanes situés en position N terminal ou C terminal (64). Les changements sur les profils chromatographiques obtenus après digestion permettent ensuite de reconstituer la structure.

Si l'analyse des glycanes libres permet d'identifier et quantifier les différents monosaccharides d'une glycoprotéine, l'information sur le site de glycosylation sera perdue du fait de l'absence de partie protéique dans l'analyse. Bien souvent, on analysera l'échantillon à différents niveaux afin d'avoir une vision complète de la glycoprotéines (analyse des glycopeptides et des glycanes libres).

Si la détermination de la structure exacte des glycanes est principalement recherchée dans les phases R&D, pour déterminer la protéine et la cellule usine idéale, elle peut être maintenant attendue dans la libération de certains lots de protéines thérapeutiques critiques.

## **Conclusion**

Le but de ce travail était de comprendre les différents impacts que peut avoir la glycosylation en étudiant ses mécanismes et ses effets biologiques.

La glycosylation est l'une des modifications post traductionnelles les plus fréquentes, conditionnant de nombreuses fonctions des protéines humaines. Sa maîtrise lors de la production d'une protéine recombinante est essentielle afin de garantir un traitement efficace et de qualité. Les principales caractéristiques de ces traitements biologiques impactées par la glycosylation sont :

- La biodisponibilité et la diffusion cellulaire
- La durée de demi-vie et le métabolisme
- La stabilité
- La fonctionnalité et l'efficacité
- L'immunogénicité

Ces différentes propriétés font de la glycosylation une caractéristique qualité critique du biomédicament (CQA) qui doit être pensée et intégrée au processus de production en amont dans les phases de recherche et développement.

La glycosylation des protéines recombinantes est déterminée par de nombreux facteurs à chaque étape de la conception du processus de production. Le gène recombiné, dans un premier temps devra être constitué des bonnes séquences d'acides aminés pour permettre cette modification post traductionnelle : les motifs Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr pour une N-glycosylation et la présence d'une serine ou d'une thréonine dans les cas de l'O-glycosylation.

Cependant si la séquence du gène recombiné est essentielle pour permettre ou non la greffe des glycanes, le schéma glycosidique sera quant à lui conditionné par la cellule usine. En effet, il repose sur des glycosyltransférases qui sont des enzymes dépendant de l'origine (végétal, insectes ou mammifère) et de la complexité de la cellule hôte choisie.

Lors du procédé de production, la composition du substrat et les conditions de cultures pourront être à l'origine de modulation dans les schémas de glycosylation effectués par la cellule usine.

Bien que la maîtrise de ces paramètres soit possible, la bioproduction implique un certain degré d'hétérogénéité inter et intra lot.

A ce titre, le contrôle des profils glycosidiques est donc un enjeu important pour l'industrie pharmaceutique. Plusieurs techniques, présentant différents avantages et inconvénients garantissent l'homogénéité d'un lot et permettent de caractériser les glycanes présents à différentes échelles :

- La glycoprotéine dans son intégralité
- Les glycopeptides obtenus après digestion enzymatique
- Les glycanes libres issus d'un second traitement enzymatique

Pour effectuer ces analyses, les méthodes les plus utilisées sont l'électrophorèse capillaire, les chromatographies en phase liquide (HPLC, HILIC) et la spectroscopie de masse.

Le marché du médicament biologique étant aujourd'hui l'un des secteurs les plus importants de l'industrie pharmaceutique, la maîtrise et le contrôle de la glycosylation des protéines recombinantes thérapeutiques est donc amenée à prendre de plus en plus d'importance dans les années à venir.

Ce développement est aussi accentué par la fin des brevets de certaines spécialités et la commercialisation des biosimilaires. En date de février 2022, 67 spécialités biosimilaires étaient autorisées dans l'Union Européenne. Parmi ces spécialités on retrouve des protéines recombinantes mais aussi depuis 2013 des anticorps monoclonaux. L'Humira® (Adalimumab) par exemple présente 10 spécialités biosimilaires. (66)

La démonstration de la bioéquivalence passe notamment par la comparaison de l'efficacité clinique et la tolérance, deux paramètres impactés par la glycosylation. La description précise de celle-ci et des moyens de production pouvant l'affecter est primordiale pour permettre à l'industriel de commercialiser un biosimilaire et pour faire la différence sur ce marché.

L'importance des biosimilaires va augmenter dans les années à venir, et avec eux l'importance de l'étude des profils glycosidiques des protéines recombinantes.



## **Bibliographie**

1. Arundel A. INDICATEURS DES BIOTECHNOLOGIES ET POLITIQUES PUBLIQUES (DOCUMENTS DE TRAVAIL STI 2003/5). 2003;45.
2. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT.pdf [Internet]. [cité 18 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.oecd.org/sti/inno/34935605.pdf>
3. Chapitre 1. Chronologie de la découverte et de l'étude des enzymes - PDF Free Download [Internet]. [cité 4 janv 2023]. Disponible sur: <https://docplayer.fr/173827308-Chapitre-1-chronologie-de-la-decouverte-et-de-l-etude-des-enzymes.html>
4. The Nobel Prize in Chemistry 1907 [Internet]. NobelPrize.org. [cité 1 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1907/buchner/facts/>
5. Best CH, Scott DA. THE PREPARATION OF INSULIN. J Biol Chem. 1 oct 1923;57(3):709-23.
6. Bateson W. The Mechanism of Mendelian Heredity. By T. H. Morgan, A. H. Sturtevant, H. J. Muller and C. B. Bridges. Henry Holt and Company, New York. 1915. Science [Internet]. 13 oct 1916 [cité 1 janv 2023]; Disponible sur: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.44.1137.536>
7. Molecular Structure of Nucleic Acids | Learn Science at Scitable [Internet]. [cité 18 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.nature.com/scitable/content/Molecular-Structure-of-Nucleic-Acids-16331/>
8. Quianzon CC, Cheikh I. History of insulin. J Community Hosp Intern Med Perspect. 16 juill 2012;2(2):10.3402/jchimp.v2i2.18701.
9. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. nov 1973;70(11):3240-4.
10. Itakura K, Hirose T, Crea R, Riggs AD, Heyneker HL, Bolivar F, et al. Expression in Escherichia coli of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. Science. 9 déc 1977;198(4321):1056-63.
11. Goeddel DV, Heyneker HL. Method of constructing a replicable cloning vehicle having quasi-synthetic genes [Internet]. US4342832A, 1982 [cité 29 déc 2022]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US4342832A/en>
12. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. déc 1977;74(12):5463-7.
13. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. août 1975;256(5517):495-7.
14. Smith SL. Ten Years of Orthoclone OKT3 (Muromonab-CD3): A Review. J Transpl Coord. 1 sept 1996;6(3):109-21.
15. Recommandations Biomédicaments immunomodulateurs (et autres anticorps et protéines de fusion) [Internet]. VIDAL. [cité 18 sept 2022]. Disponible sur:

<https://www.vidal.fr/maladies/recommandations/biomedicaments-immunomodulateurs-et-autres-anticorps-et-proteines-de-fusion-4042.html>

16. Article L5121-1 - Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 18 sept 2022]. Disponible sur: [https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article\\_lc/LEGIARTI000037950971/](https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000037950971/)
17. biomedicaments1.pdf [Internet]. [cité 18 sept 2022]. Disponible sur: <https://mabimprove.univ-tours.fr/wp-content/uploads/biomedicaments1.pdf>
18. Ghannam JY, Wang J, Jan A. Biochemistry, DNA Structure. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cité 4 janv 2023]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538241/>
19. 3.3 The Nucleus and DNA Replication - Anatomy and Physiology | OpenStax [Internet]. [cité 18 sept 2022]. Disponible sur: <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/3-3-the-nucleus-and-dna-replication>
20. Merrick WC, Pavitt GD. Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. Cold Spring Harb Perspect Biol. déc 2018;10(12):a033092.
21. Ramazi S, Zahiri J. Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. Database J Biol Databases Curation. 7 avr 2021;2021:baab012.
22. Gomes Ferreira I, Pucci M, Venturi G, Malagolini N, Chiricolo M, Dall'Olio F. Glycosylation as a Main Regulator of Growth and Death Factor Receptors Signaling. Int J Mol Sci. 15 févr 2018;19(2):580.
23. Glycosylation et glycation : quelles différences ? [Internet]. Planet-Vie. [cité 8 nov 2022]. Disponible sur: <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/cellules-et-molecules/molecules/glycosylation-et-glycation-quelles-differences>
24. Strasser R. Plant protein glycosylation. Glycobiology. sept 2016;26(9):926-39.
25. Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J. Exploring the Biological Roles of Glycans [Internet]. Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1999 [cité 18 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20726/>
26. Varki A. Biological roles of glycans. Glycobiology. 1 janv 2017;27(1):3-49.
27. Marth JD, Grewal PK. Mammalian glycosylation in immunity. Nat Rev Immunol. nov 2008;8(11):874-87.
28. O'Flaherty R, Bergin A, Flampouri E, Mota LM, Obaidi I, Quigley A, et al. Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing. Biotechnol Adv. 1 nov 2020;43:107552.
29. Dumont J, Euwart D, Mei B, Estes S, Kshirsagar R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. Crit Rev Biotechnol. 1 nov 2016;36(6):1110-22.
30. Faye L, Landry N, Lerouge P, Gomord V, Vézina L. La production de protéines à usage biopharmaceutique dans les plantes. médecine/sciences. 1 août 2012;17:867.

31. Q 5 D Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products. 2006;
32. Sobolewska-Ruta A, Zaleski P. Cell Banks Preparation In Biopharmaceuticals Production. undefined [Internet]. 2019 [cité 8 nov 2022]; Disponible sur: <https://www.semanticscholar.org/paper/Cell-Banks-Preparation-In-Biopharmaceuticals-Sobolewska-Ruta-Zaleski/8e149d06bd9982b9eddf37b1095dd7c5721219b1>
33. Serum-Free Media and Applications. Cell Cult.
34. Wang L, Fan D, Chen W, Terentjev EM. Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Sci Rep*. 14 oct 2015;5(1):15159.
35. Chuang GY, Asokan M, Ivleva VB, Pegu A, Yang ES, Zhang B, et al. Removal of variable domain N-linked glycosylation as a means to improve the homogeneity of HIV-1 broadly neutralizing antibodies. *mAbs*. 12(1):1836719.
36. Sinclair AM, Elliott S. Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *J Pharm Sci*. août 2005;94(8):1626-35.
37. Zhou Q, Shankara S, Roy A, Qiu H, Estes S, McVie-Wylie A, et al. Development of a simple and rapid method for producing non-fucosylated oligomannose containing antibodies with increased effector function. *Biotechnol Bioeng*. 15 févr 2008;99(3):652-65.
38. Hamilton SR, Gerngross TU. Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. *Curr Opin Biotechnol*. oct 2007;18(5):387-92.
39. Zhang P, Woen S, Wang T, Liao B, Zhao S, Chen C, et al. Challenges of glycosylation analysis and control: an integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs. *Drug Discov Today*. 1 mai 2016;21(5):740-65.
40. SOLÁ RJ, GRIEBENOW K. Effects of Glycosylation on the Stability of Protein Pharmaceuticals. *J Pharm Sci*. avr 2009;98(4):1223-45.
41. Halstenson CE, Macres M, Katz SA, Schnieders JR, Watanabe M, Sobota JT, et al. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa and epoetin beta. *Clin Pharmacol Ther*. déc 1991;50(6):702-12.
42. Sasayama S, Moriya K, Chiba T, Matsumura T, Hayashi H, Hayashi A, et al. Glycosylated human interleukin-1alpha, neoglyco IL-1alpha, coupled with N-acetylneuraminic acid exhibits selective activities in vivo and altered tissue distribution. *Glycoconj J*. juin 2000;17(6):353-9.
43. Varasteh Moradi S, Varamini P, Steyn F, Toth I. In vivo pharmacological evaluation of a lactose-conjugated luteinizing hormone releasing hormone analogue. *Int J Pharm*. 10 nov 2015;495(1):106-11.
44. Flintegaard TV, Thygesen P, Rahbek-Nielsen H, Lavery SB, Kristensen C, Clausen H, et al. N-Glycosylation Increases the Circulatory Half-Life of Human Growth Hormone. *Endocrinology*. 1 nov 2010;151(11):5326-36.
45. Ceaglio N, Etcheverrigaray M, Kratje R, Oggero M. Novel long-lasting interferon alpha derivatives designed by glycoengineering. *Biochimie*. mars 2008;90(3):437-49.

46. Castilho A, Gruber C, Thader A, Oostenbrink C, Pechlaner M, Steinkellner H, et al. Processing of complex N-glycans in IgG Fc-region is affected by core fucosylation. *mAbs*. 2015;7(5):863-70.
47. Raju TS. Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Curr Opin Immunol*. août 2008;20(4):471-8.
48. Priem B, Perez S. L'apport de la glycobiotechnologie au domaine de la santé The contribution of glycobiotechnology to the main stream of biomedical field. 4 nov 2018;
49. Pereira NA, Chan KF, Lin PC, Song Z. The "less-is-more" in therapeutic antibodies: Afucosylated anti-cancer antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *mAbs*. 7 mai 2018;10(5):693-711.
50. Padler-Karavani V, Yu H, Cao H, Chokhawala H, Karp F, Varki N, et al. Diversity in specificity, abundance, and composition of anti-Neu5Gc antibodies in normal humans: Potential implications for disease. *Glycobiology*. 1 oct 2008;18(10):818-30.
51. Zhou Q, Qiu H. The Mechanistic Impact of N-Glycosylation on Stability, Pharmacokinetics, and Immunogenicity of Therapeutic Proteins. *J Pharm Sci*. avr 2019;108(4):1366-77.
52. Hypersensibilité au cétuximab et réaction croisée ? [Internet]. RFCRPV. [cité 18 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.rfcrpv.fr/hypersensibilite-au-cetuximab-et-reaction-croisee/>
53. Breves-67-1.pdf [Internet]. [cité 18 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.rfcrpv.fr/wp-content/uploads/2020/08/Breves-67-1.pdf>
54. EMA. ICH Q8 (R2) Pharmaceutical development [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cité 18 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q8-r2-pharmaceutical-development>
55. Council of Europe. 2.2.59 - Analyse glycanique des glycoprotéines. In: *European Pharmacopoeia*.
56. Principle of Capillary Electrophoresis, Figure created by Sami El Deeb [Internet]. ResearchGate. [cité 5 janv 2023]. Disponible sur: [https://www.researchgate.net/figure/Principle-of-Capillary-Electrophoresis-Figure-created-by-Sami-El-Deeb\\_fig1\\_351868322](https://www.researchgate.net/figure/Principle-of-Capillary-Electrophoresis-Figure-created-by-Sami-El-Deeb_fig1_351868322)
57. FILLET M, BECHET I, HUBERT P, CROMMEN J. L'électrophorèse capillaire principes, mises en oeuvre et applications. *L'électrophorèse Capillaire Principes Mises En Oeuvre Appl*. 1999;9(3):225-43.
58. Biochimie des protéines BCM514 [Internet]. [cité 18 sept 2022]. Disponible sur: <https://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/5e.html>
59. Thaysen-Andersen DM. Analysis of Protein Glycosylation using HILIC.
60. Baković MP, Selman MHJ, Hoffmann M, Rudan I, Campbell H, Deelder AM, et al. High-throughput IgG Fc N-glycosylation profiling by mass spectrometry of glycopeptides. *J Proteome Res*. 1 févr 2013;12(2):821-31.
61. Balaguer E, Neusüss C. Glycoprotein Characterization Combining Intact Protein and Glycan Analysis by Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 1 août 2006;78(15):5384-93.

62. Wang T, Chu L, Li W, Lawson K, Apostol I, Eris T. Application of a Quantitative LC–MS Multiattribute Method for Monitoring Site-Specific Glycan Heterogeneity on a Monoclonal Antibody Containing Two N-Linked Glycosylation Sites. *Anal Chem*. 21 mars 2017;89(6):3562-7.
63. Lauber MA, Yu YQ, Brousmiche DW, Hua Z, Koza SM, Magnelli P, et al. Rapid Preparation of Released N-Glycans for HILIC Analysis Using a Labeling Reagent that Facilitates Sensitive Fluorescence and ESI-MS Detection. *Anal Chem*. 19 mai 2015;87(10):5401-9.
64. Planinc A, Bones J, Dejaegher B, Van Antwerpen P, Delporte C. Glycan characterization of biopharmaceuticals: Updates and perspectives. *Anal Chim Acta*. 19 mai 2016;921:13-27.
65. Guttman A, Szigeti M, Lou A, Gutierrez M. Fast Glycan Labeling and Analysis: High-Resolution Separation, Quantification and ID.
66. 20220511-rs-biosimilaires-vf-06052022.pdf [Internet]. [cité 13 nov 2022]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/uploads/2022/05/11/20220511-rs-biosimilaires-vf-06052022.pdf>

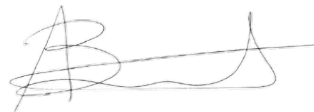
## ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné (e) Alexandre Bradier

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



**SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN**

N° Étudiant : 21203991

N° Thèse : 2

Nom et Prénom : Bradier Alexandre

Sujet : Production des protéines recombinantes : un focus sur la glycosylation

Tours, le : 12 mai 2023

Le(s) Directeur(s) de Thèse :



**Vu et Transmis :  
Le Doyen**

POUR LE PRÉSIDENT  
et par délégation  
Le directeur de la Faculté

Pr Denys BRAND



NOM, PRÉNOM de l'étudiant : ALEXANDRE BRADIER

N°2

### TITRE DE LA THÈSE

Production des protéines recombinantes : un focus sur la glycosylation

### RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Les protéines recombinantes sont un type de médicaments largement utilisé dans la médecine moderne.

Leur processus de fabrication permet la conception d'une protéine humaine via une cellule d'une autre espèce. Cependant la glycosylation qui accompagne cette synthèse protéique ne sera pour autant pas identique à celle d'une protéine humaine produite par l'organisme humain. Cette différence trouve son origine dans plusieurs étapes du procédé de fabrication et peut impacter les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de la protéine recombinante thérapeutique produite.

Afin de maîtriser au mieux la qualité de cette dernière, il est important d'identifier les étapes clés du processus, la meilleure manière d'orienter la glycosylation comme souhaité et de définir une méthode de contrôle en adéquation avec les attributs qualités recherchés.

MOTS-CLÉS SIGNIFICATIFS DE SON CONTENU, ATTRIBUÉS PAR LE CANDIDAT EN LIAISON AVEC LA BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE ET LES MEMBRES DU JURY

Biotechnologie ; glycosylation; impacts; CQA; attributs qualités; bioproduction; électrophorèse capillaire

### JURY

PRÉSIDENT : Marc CLASTRE ; Professeur des Universités, Tours

MEMBRES :

Laurence DOUZIECH-EYROLLES ; Pharmacien, MCU, Tours

Emilie LEFEBVRE ; Pharmacien, GSK Saint Amand-Les-Eaux

Yoann BERLOT SCHMITT ; Pharmacien, Merck Group Aubonne (Suisse)

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE : 23 Janvier 2023 à Tours