Province de Liège
Enseignement

HAUTE ECOLE DE LA PROVINCE DE LIEGE

COBRA

Grétry Jean, Lenzini Mauro *et al.*

Conditions Optimales pour le Broyage et la Récolte cellulaires ainsi que pour la pré-purification d'Agrégats protéiques d'intérêt

Les cultures de bactéries et de levures recombinantes sont très souvent utilisées dans l'industrie biotechnologique afin de produire des protéines d'intérêt, notamment des vaccins.
Ces protéines sont en général surexprimées et s'accumulent en grandes quantités à l'intérieur des cellules hôtes soit sous forme d'agrégats amorphes ou de corps d'inclusion, soit associées à des membranes ou localisées dans un compartiment cellulaire particulier.

Objectifs

- La caractérisation et l'optimalisation du broyage cellulaire de manière à faciliter les étapes de pré-purification qui suivent et augmenter leur efficacité,
- L'étude de la solubilité de protéines d'intérêt dans l'homogénat cellulaire,
- La mise au point d'une batterie de tests génériques pour identifier la composition optimale du tampon d'homogénéisation,
- La prise en compte des aspects d'efficacité, robustesse, reproductibilité et transfert à l'échelle industrielle ont été considérés.

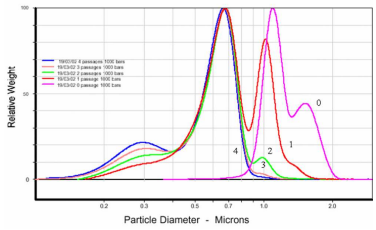
L'insolubilité des protéines surexprimées peut être la conséquence d'un niveau extrêmement élevé de traduction, de l'accumulation de concentrations protéiques intracellulaires très élevées, d'un environnement intracellulaire défavorable comme un potentiel rédox faible ou encore de déficiences du système de folding ou du processus post-traductionnel de l'organisme hôte.
La purification de ces protéines sous une forme soluble constitue une difficulté majeure et nécessite le développement de procédés complexes. La protéine d'intérêt doit tout d'abord être libérée dans le milieu extracellulaire par broyage des cellules. La pré-purification consiste alors à séparer le plus efficacement possible la protéine recherchée des débris cellulaires indésirables. La répartition de la protéine d'intérêt entre les fractions soluble et insoluble de l'homogénat dépend entre autres de la nature du tampon de broyage. L'efficacité des étapes constituant la pré-purification sera donc prépondérante pour le bon déroulement de toutes les étapes de purification qui suivront.

Méthode

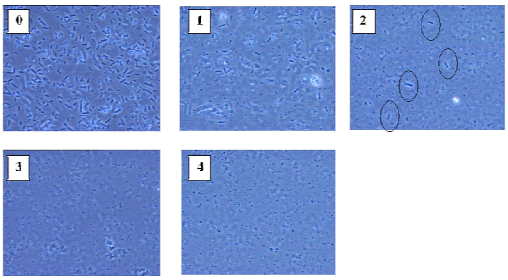
- Caractérisation des broyats par mesure de la taille des particules, séparabilité et filtrabilité
- Test d'équipements pour l'homogénéisation

Les broyeurs utilisés

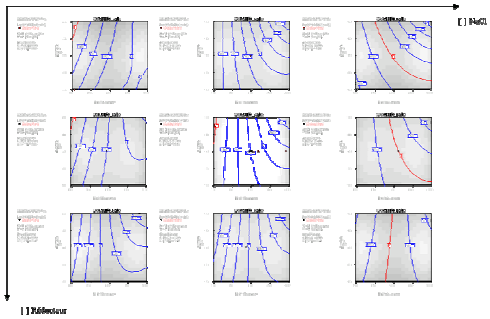
Caractérisation des broyats



- plus le nombre de passages augmente, plus la taille des particules diminue
- la population est de taille homogène à partir de deux passages

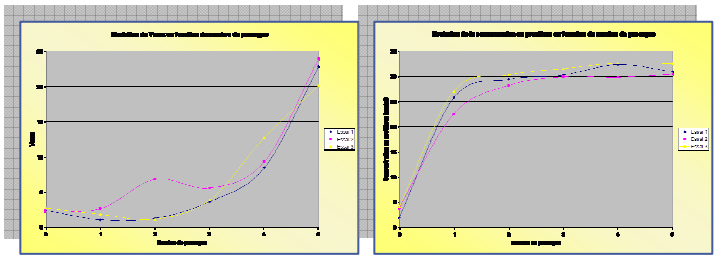


Optimisation de la solubilité de l'antigène



- On observe l'effet de salting-in et salting-out.
- Le réducteur permet l'augmentation de la solubilité de l'antigène.
- Le réducteur influence l'effet salting-in et salting-out.
- Les graphiques ont été obtenus à partir de 30 expériences à petite échelle (20 ml sur Presse de French).
- Les meilleures conditions de tampon ont été identifiées à partir des graphiques.

- Confirmation des meilleures conditions pour les deux antigènes à plus grande échelle (Rannie).



Conclusion

Pour le broyage d'*E. coli* nous recommandons le Rannie comme broyeur. Nous le conseillons pour plusieurs raisons : il permet d'obtenir une stabilité de température, une meilleure réduction de la taille des particules et une meilleure vitesse de filtrabilité malgré que le Microfluidiseur montre des résultats fort proches et qu'il a une vitesse de broyage plus importante. L'autre raison est que le Rannie est facilement transposable à l'échelle industrielle.

Pour le broyage de *S. cerevisiae* le Microfluidiseur est déconseillé, car il ne permet pas de broyer efficacement les cellules. Il est conseillé dans ce cas d'utiliser le Dyno Mill.

Les graphiques générés lors des expériences sur les différents tampons nous ont permis de mettre en évidence les conditions donnant les meilleures solubilités pour les antigènes étudiés. Après avoir testé ces conditions à grande échelle, nous avons déterminé que le meilleur tampon pour le premier antigène est le tampon diéthanolamine avec une concentration de 80 mM, à pH 9.3 et avec 5 mM en NaCl en l'absence de réducteur et pour le second c'est le tampon tris 125 mM à pH 9.

Cet experimental design nous a permis de mettre au point une batterie de tests génériques permettant de déterminer de manière systématique et exhaustive les meilleures conditions de tampon d'homogénéisation cellulaire.

gsk GlaxoSmithKline