



Optimisation de la phase de lyse cellulaire pour l'extraction de protéines recombinantes

En savoir plus : www.bertin.fr - www.precellys.com

La disponibilité de protéines recombinantes purifiées constitue un élément important pour le développement de nombreux projets de recherche. La Plateforme de Production de Protéines Recombinantes (PFPR) de l'Institut Pasteur dirigé par le Docteur Jacques Bellalou, assure la production de protéines recombinantes en systèmes bactériens ou en levures, pour des projets de diverses natures : biologie structurale, enzymologie, étude biochimique ou encore production d'antigènes pouvant servir au diagnostic, à la vaccination ou au criblage de nouveaux agents thérapeutiques.

Une étape essentielle avant la phase de production des protéines « difficiles » en bioréacteur de grand volume est l'optimisation des procédés de culture en batterie de 8 à 12 micro-fermenteurs. Cette étape, qui permet de définir les conditions optimales de production de la protéine d'intérêt sous forme soluble, génère un très grand nombre de prélèvements de culture. Le processus d'extraction des fractions protéiques, à partir des culots cellulaires issus de la phase d'optimisation ou suite à des prélèvements réalisés sur les cultures en fermenteurs, est une étape primordiale pour l'évaluation des niveaux de production par électrophorèse sur SDS-Page. La technique d'extraction doit être automatisée, facilement applicable à un grand nombre d'échantillons (série de 24 à 48 culots de 1 ml à traiter) et efficace même sur des suspensions cellulaires concentrées. Elle doit aussi respecter l'intégrité des protéines en évitant une élévation de la température en cours de traitement.

Depuis plus de 10 ans, cette plateforme de l'Institut Pasteur utilise la technologie « bead-beating » mise en œuvre dans l'équipement Precellys® pour lyser les culots bactériens afin d'en extraire les fractions protéiques. En juillet 2014, le module de production de protéines recombinantes en microorganismes a pu tester l'efficacité du nouveau Precellys® Evolution sur des culots de culture d'*Escherichia coli*. Ce nouveau produit s'ajoute à la gamme Precellys® existante et propose de nouvelles fonctionnalités telles que des volumes d'échantillons plus grands ou encore des vitesses de broyage plus importantes.

1- Protocole

Les prélèvements de cultures sont transférés dans les tubes de broyage (1 ml de culture + 650 mg de billes en verre de 0.1 mm de diamètre) pour réaliser l'extraction des fractions protéiques totales par lyse mécanique des cellules à l'aide de l'homogénéisateur d'échantillons biologiques Precellys®. Cet appareil permet de traiter 24 échantillons en même temps. Des essais d'optimisation des conditions de cassage ont été réalisés pour définir la vitesse et la durée de cassage ainsi que les intervalles de refroidissement des échantillons à appliquer pendant les cycles de traitement. L'efficacité du processus de lyse a un impact direct sur le rendement d'extraction des protéines. De même, si un échauffement se produit lors du traitement des échantillons, celui-ci peut entraîner une dégradation irréversible des protéines d'intérêt. Le choix de la méthode de lyse et la maîtrise des paramètres associés ont un impact majeur sur l'efficacité globale du processus d'extraction des protéines recombinantes cibles.

Une fois le cycle de cassage terminé (~ 8 minutes), les tubes de cassage contenant les échantillons sont centrifugés. Les fractions protéiques solubles contenant les protéines recombinantes d'intérêt se



Precellys Evolution, équipement testé lors de ces essais

retrouvent dans le surnageant alors que les fractions protéiques insolubles et les débris cellulaires sont dans les culots de centrifugation. Une analyse de ces fractions protéiques solubles est ensuite réalisée par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE pour estimer le niveau de production des protéines d'intérêt.

2 – Résultat des essais effectués avec le nouveau Precellys® Evolution

Des essais préliminaires de lyse cellulaire ont été effectués avec le nouveau broyeur d'échantillons, Precellys® Evolution (utilisé en chambre froide) sur une culture d'*Escherichia coli*. L'efficacité du cassage a été évaluée sur des tubes de volumes différents : 2 ml, 7 ml et 15 ml, contenant tous la même suspension bactérienne et des billes en verre de diamètre 0.1 millimètre. Les paramètres des cycles de cassage ainsi que la quantité de billes ont été adaptés à chacun des différents volumes. Les fractions protéiques solubles récupérées après centrifugation des tubes de cassage ont été déposées sur un gel SDS-page d'électrophorèse présenté ci-dessous.

Il apparaît sur ce gel que la lyse des cellules est très efficace indépendamment du type de tubes utilisés. Il a ainsi été montré que l'augmentation de la quantité de billes, de la durée et de la vitesse de cassage en fonction des volumes de suspensions cellulaires à traiter constituent des facteurs déterminants dans l'efficacité de la lyse et ont un impact direct sur le rendement final d'extraction.

3 – Les avantages de cette technologie pour la lyse cellulaire

Le Precellys® Evolution se présente comme un outil efficace pour les laboratoires de microbiologie travaillant sur des cultures de bactéries ou de levures. Il permet de réaliser l'extraction de constituants biologiques tels que l'ADN, l'ARN ou les protéines avec un rendement élevé sans les dénaturer. Par ailleurs, son mouvement d'agitation spécifiquement optimisé pour limiter l'échauffement de l'échantillon permet de préserver ces éléments sensibles à la chaleur. En effet, une élévation de la température lors de l'agitation de l'échantillon peut entraîner, par exemple, une dénaturation des protéines ou une dégradation du matériel génétique. Dans certains cas, l'utilisation en chambre froide du Precellys est une possibilité. Cependant, le Precellys® Evolution peut également être associé à une unité de refroidissement brevetée (option Cryolys®) qui, par injection d'air refroidi au niveau de chaque tube, limite la montée en température à l'intérieur des tubes. Celle-ci reste alors en dessous de

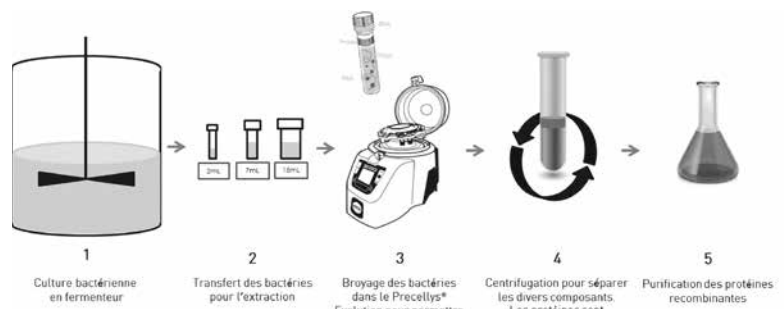


Schéma process 1

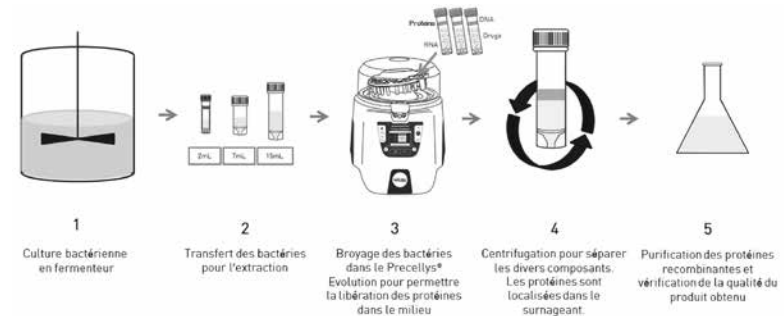
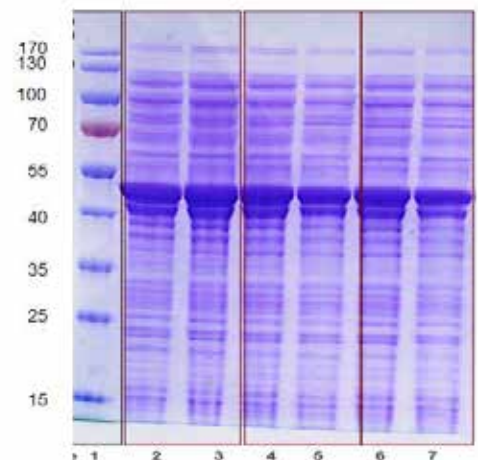


Schéma process 2



Lane 1: Molecular weight standard / Lanes 2 and 3: 1mL E.coli prep/0.7g glass beads_2mL / Lane 4: 5mL E.coli prep/3.5g glass beads_7mL / Lane 5: 5mL E.coli prep/2.4g glass beads_7mL / Lane 6: 10mL E.coli prep/7.0g glass beads_15mL / Lane 7: 10mL E.coli prep/4.8g glass beads_15mL

Résultat



La lyse rapide et efficace des culots bactériens, élément clé dans l'évaluation des procédés d'optimisation des cultures

4°C avant, pendant et après la lyse des cellules.

Les essais réalisés par l'équipe de la PFPR ont également démontré que l'efficacité de lyse reste élevée même sur des échantillons très concentrés (présentant une DO_{600nm} de 45 à 50).

« Cet appareil allie l'efficacité, la reproductibilité des cassages et la facilité d'utilisation », précise le docteur Bellalou. En plus des nombreuses demandes

punctuelles d'optimisation et de production de protéines recombinantes, la plateforme est impliquée dans des collaborations scientifiques, des programmes de génomique structurale, ou encore des projets dont la finalité est le criblage de nouveaux agents thérapeutiques. Dans le cadre de ces collaborations, l'utilisation en routine du broyeur d'échantillons Precellys® a apporté un réel gain de temps de par sa capacité à casser de façon automatique et simultanée un très grand nombre de culots cellulaires.