

Production et sécrétion de protéines recombinantes par des chevelus racinaires

François Guérineau ¹, Yoann Huet ², Katiba Mezreb ¹, Jean-Pierre Elé-Khouana ¹ Florian Cardon² et Michèle Boitel-Conti¹

¹ Université de Picardie Jules Verne, BIOPI, UFR des Sciences, Ilot des poulies, 33 rue Saint Leu, 80039 Amiens cedex, France

² Société Root Lines Technology, CRRBM, 33 rue Saint Leu, 80039 Amiens Cédex

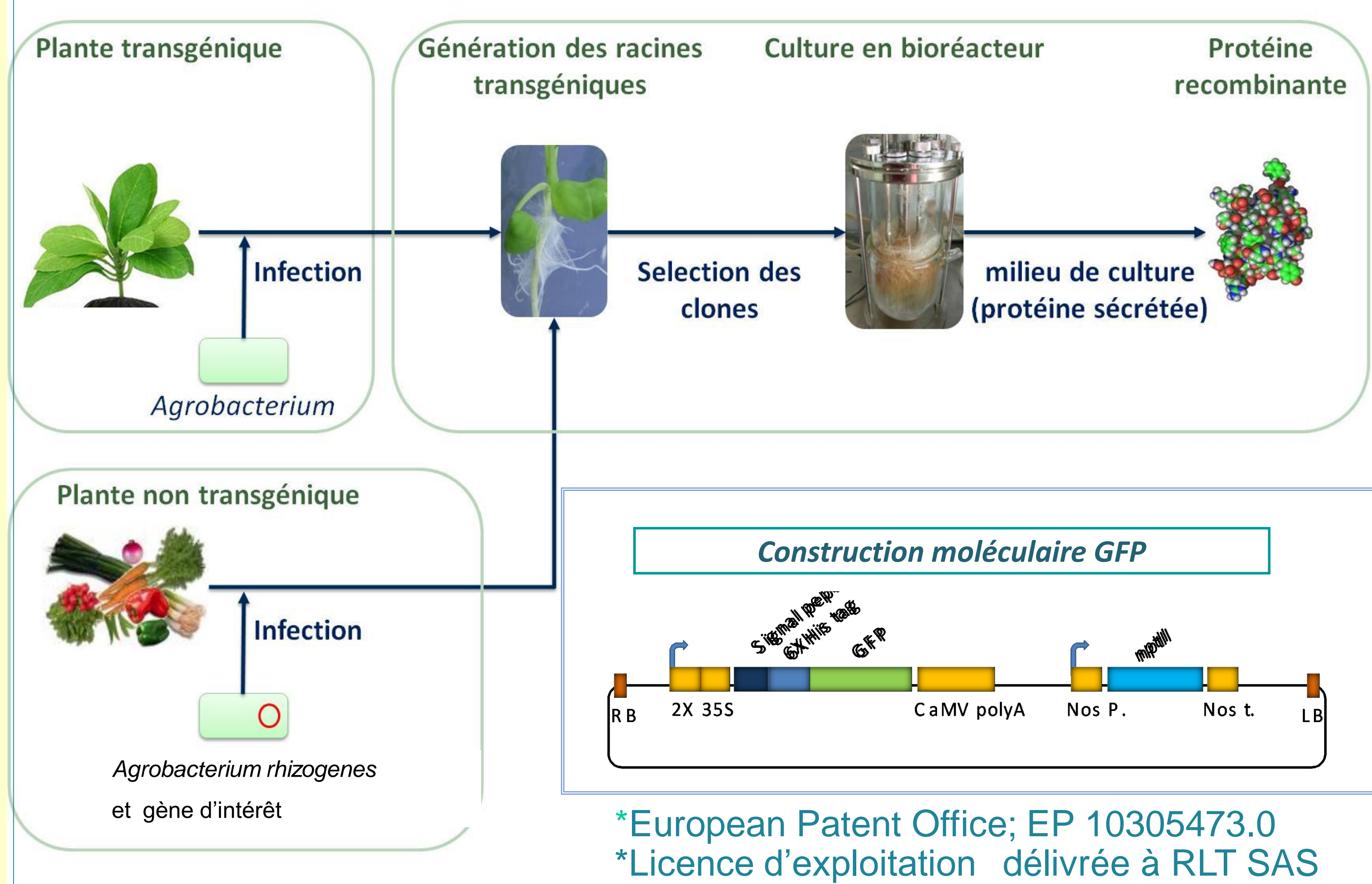
CONTEXTE

Dans le domaine des biotechnologies végétales, l'un des enjeux majeurs actuels concerne la production de protéines à usage thérapeutique. En effet, si de nombreux polypeptides d'intérêt sont actuellement produits dans des organismes unicellulaires (bactéries, levures) ou des cellules animales, la production de certaines protéines dans des cellules de plantes présente plusieurs avantages : des coûts de production et d'extraction réduits, l'absence de pathogènes humains (prions, virus...) et une meilleure capacité que le système bactérien à réaliser des modifications post-traductionnelles. Les progrès récents obtenus avec la culture d'organes racinaires transgéniques en milieu confiné et contrôlé en font une voie de recherche très pertinente (Huet *et al.*, 2013). A partir d'une suspension de bactérie *Agrobacterium rhizogenes*, on transfère dans la plante des gènes conduisant à l'obtention de racines transgéniques, ainsi que le gène d'intérêt ; les clones racinaires sont récoltés et la protéine d'intérêt est récoltée au cours de la culture en fioles d'Erlenmeyer puis en bioréacteur.

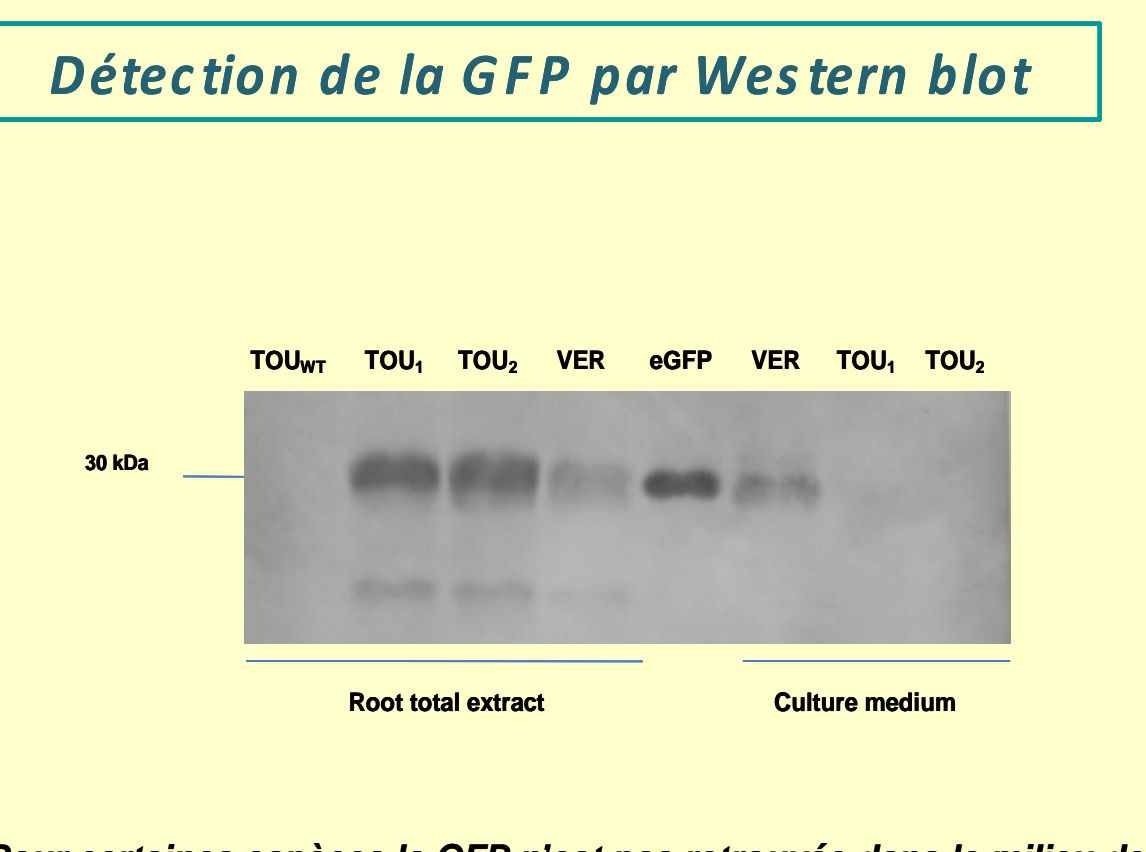
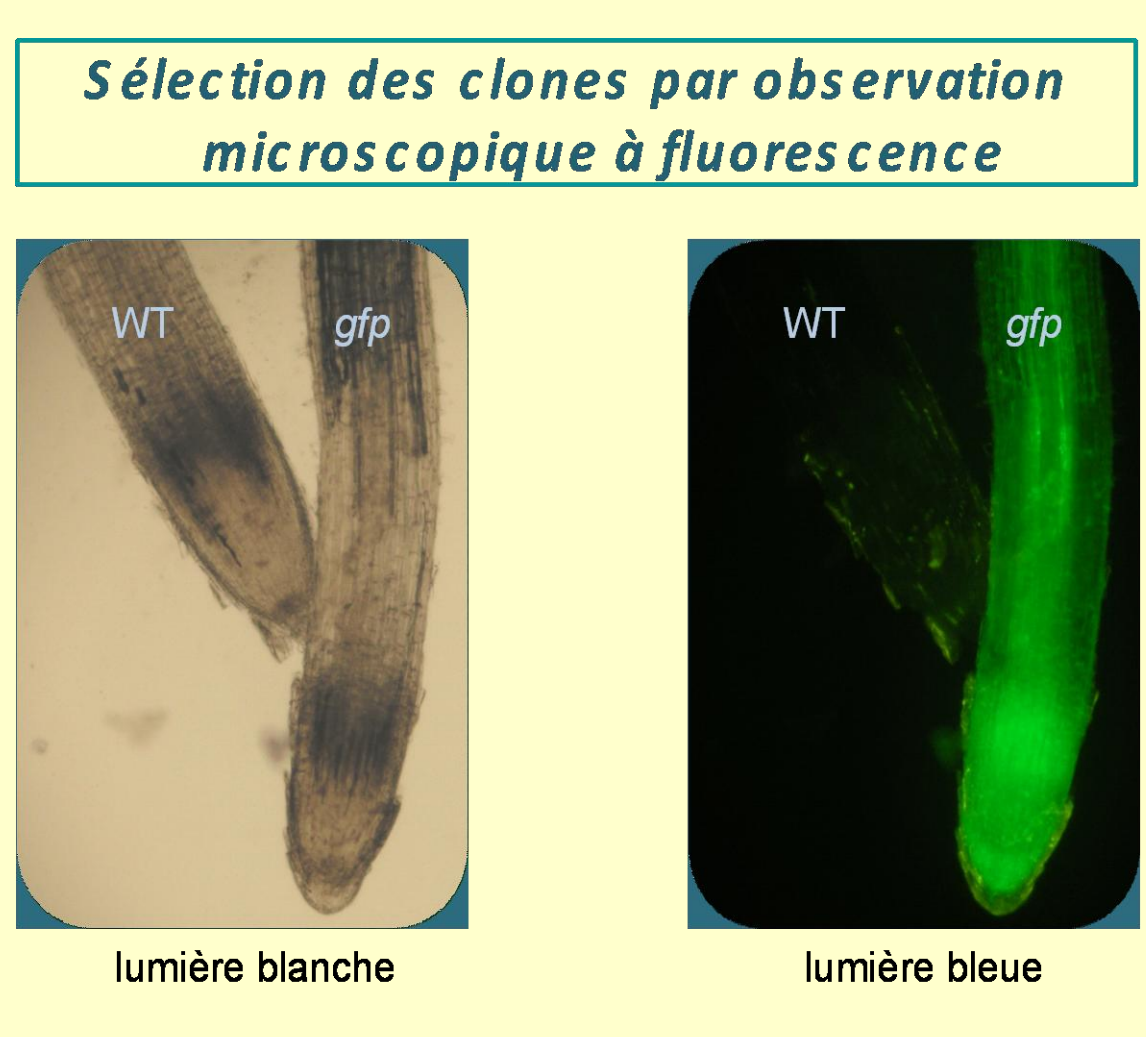
Ce procédé de culture d'organes, *in vitro*, apparaît particulièrement intéressant en raison du faible coût du milieu de culture, de la facilité de contrôle des paramètres tels que le pH, la pO₂ et la température (Mairet *et al.*, 2010), ainsi qu'en terme de sécurité face aux contaminations virales pour l'homme (Shih *et al.*, 2009).

Dans cette étude, nous présentons le procédé de production d'une protéine recombinante modèle la eGFP par des racines transgéniques de *Brassica rapa* cultivées stérilement *in vitro*.

Principe du procédé de production de protéines: RhizoProt*



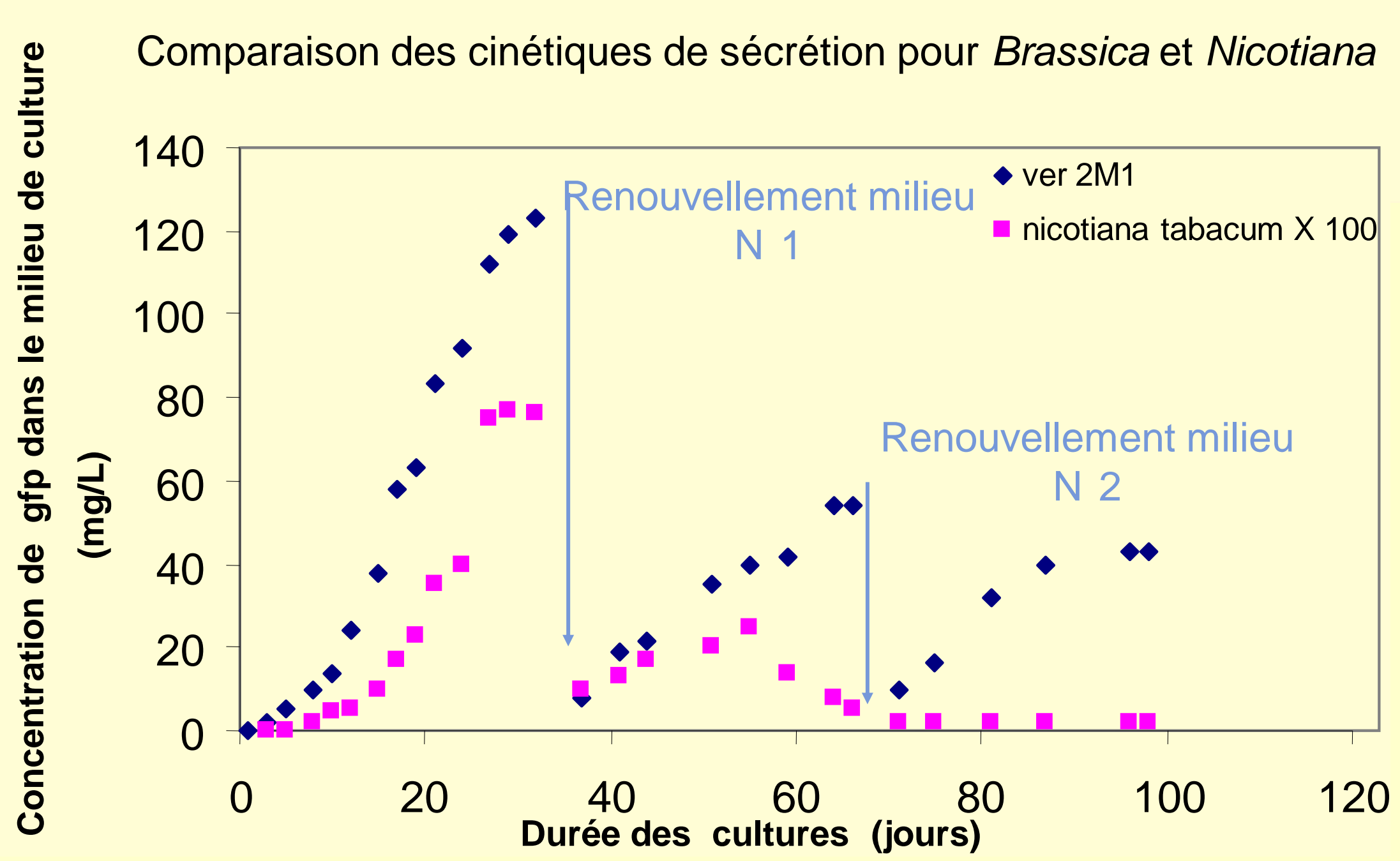
15 espèces de plantes appartenant à 5 familles différentes ont été transformées



Pour certaines espèces la GFP n'est pas retrouvée dans le milieu de culture



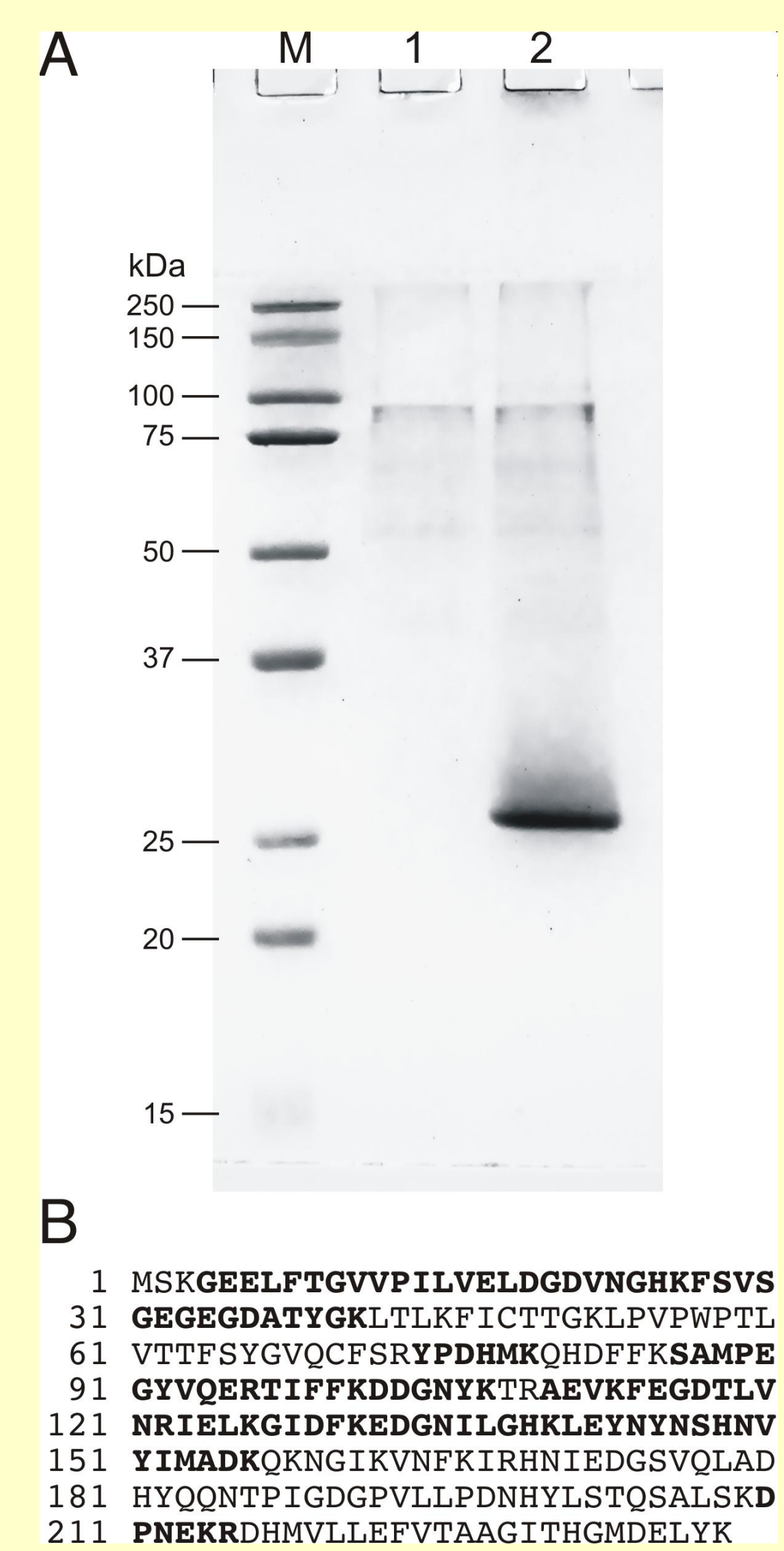
La lignée racinaire de *Brassica rapa* la plus productrice (Ver2M1) a été cultivée dans une fiole avec du milieu de Gamborg B5-30 (100 ml) et comparée à la lignée Contrôle (clone racinaire sans le gène GFP). Les concentrations de protéines totales dans les milieux de culture de la lignée Contrôle (1) et de la lignée GFP (2) ont été respectivement de 88 4,5 ng / ml et 210 6 pg / ml (n = 5). Ceci indique que la GFP représente jusqu'à 60 % des protéines totales sécrétées.



Une culture de 100 jours a été réalisée en renouvelant le milieu aux 33^{ème} et 67^{ème} jour. Les capacités de sécrétion ont été comparées à celles du meilleur clone de *Nicotiana*. On observe une sécrétion constante pour Ver2M1 et un arrêt d'activité au 55^{ème} jour pour *Nicotiana*.

Le clone sélectionné Ver2M1 est entretenu au laboratoire BIOPI depuis 3 ans sans perte d'activité.

Des échantillons bruts de milieux de culture obtenus après 21 jours de culture ont été déposés sur gel d'électrophorèse. Une seule bande d'environ 27 kDa est observée sur des gels PAGE avec le milieu des racines GFP (2), alors qu'aucune bande de cette taille n'est observée avec la lignée Contrôle (1) (figure A). L'identité de la GFP a été confirmée par LC-MS-MS: onze peptides, identifiés suite à une digestion trypsique de la bande extraite du gel PAGE, correspondaient à la séquence GFP de l'espèce *Aequorea victoria*, assurant ainsi une couverture de 50% (figure B)



- La eGFP recombinante (flèche rouge) représente plus de 60% du total des protéines sécrétées dans le milieu de culture.
- 700 mg de eGFP sont sécrétés par unité de production
- La pléiotrophine (15 kDa) est actuellement en cours d'étude dans le cadre d'un programme Interreg

