

# Ingénierie métabolique des souches d'expression d'*E.coli*

Virginie Courtois - Sanofi Pasteur

Adebiotech

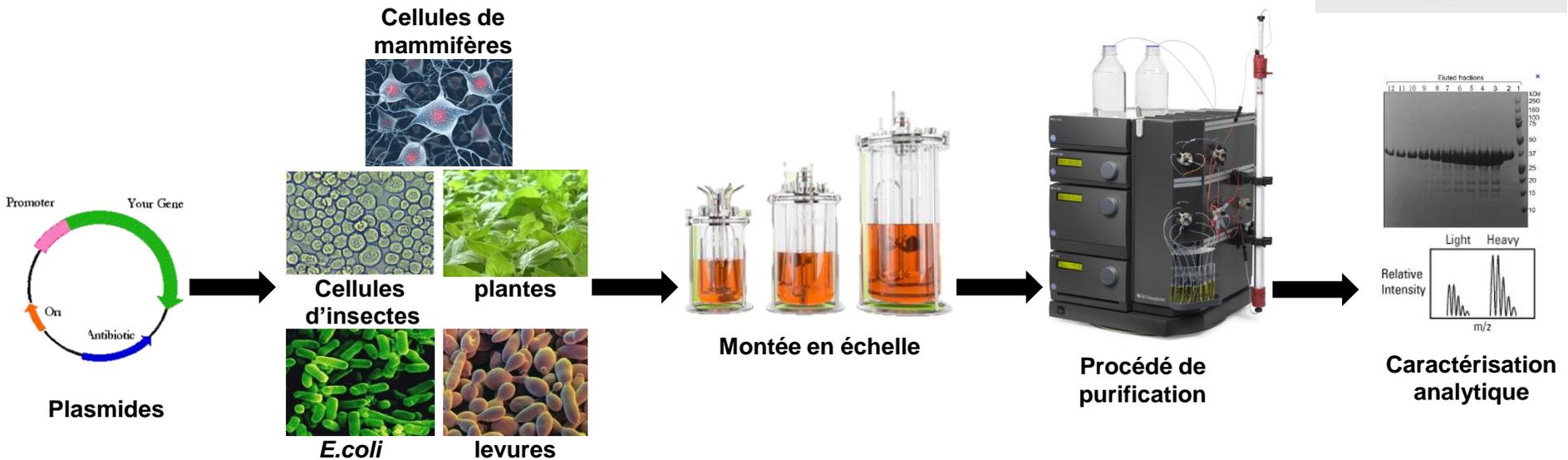
Proteinov2016

Proteines : Impacts des Procédés

28 Novembre 2016

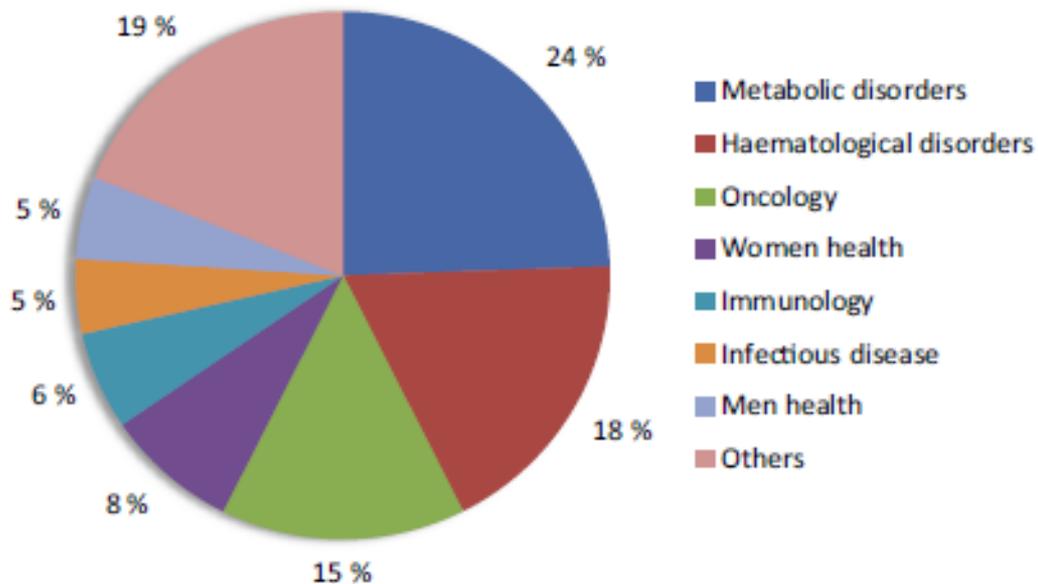
# La production de protéines recombinantes

= protéines produites dans un organisme différent de celui dont il est originaire ou dont l'ADN a été modifié pour être exprimé différemment

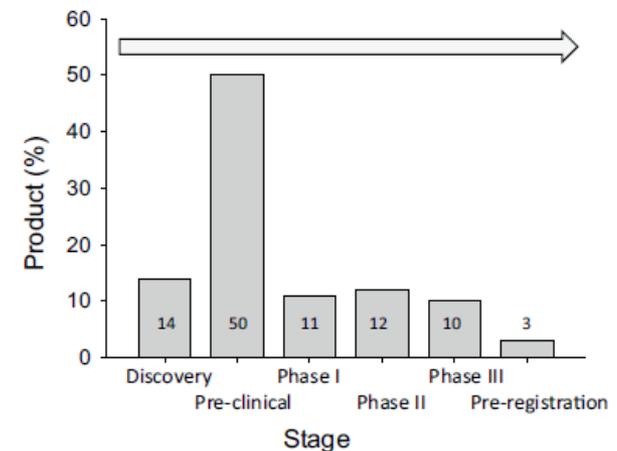


- > substituer la protéine native
- > le plus similaire de la protéine native avec les mêmes fonctionnalités
- > grande pureté

# Le marché des protéines recombinantes à usage thérapeutique



**Fig. 3** Amount of marketed recombinant proteins (expressed in percentages) applied to each therapeutic area. Coloured in pink, other therapeutic areas (<5 % each) include diseases related to cardiology, central nervous system, ophthalmology and dermatology among others



**Fig. 2** Workflow involved in the development of a new drugs and approximate percentage (bars and numbers) of recombinant proteins currently in each step [9]

Sanchez-Garcia *et al. Microb Cell Fact* (2016) 15:33  
DOI 10.1186/s12934-016-0437-3

# Les challenges de la production de protéines recombinantes

---

- Une expression soluble pour simplifier le procédé de purification et de formulation
  - Une conformation conforme à ce qui est ciblé
    - Une efficacité de production avec un rendement suffisant à un coût souhaité
      - Une pureté de la protéine produite en fin de procédé

# Le développement des systèmes d'expression a démarré dans les années 80

**Table 1 Recombinant biopharmaceuticals approved in the 1980s**

Product	Cell factory	Therapeutic Indication	Year
Humulin	<i>E. coli</i>	Diabetes	1982
Protropin	<i>E. coli</i>	hGH deficiency	1985
Roferon A	<i>E. coli</i>	Hairy cell leukaemia	1986
IntronA	<i>E. coli</i>	Cancer, genital warts and hepatitis	1986
Recombivax	<i>S. cerevisiae</i>	Hepatitis B	1986
Orthoclone OKT3	Hybridoma cell line	Reversal of acute kidney and transplant rejection	1986
Humatrope	<i>E. coli</i>	hGH deficiency	1987
Activase	CHO	Acute myocardial infarction	1987
Epogen	CHO	Anaemia	1989

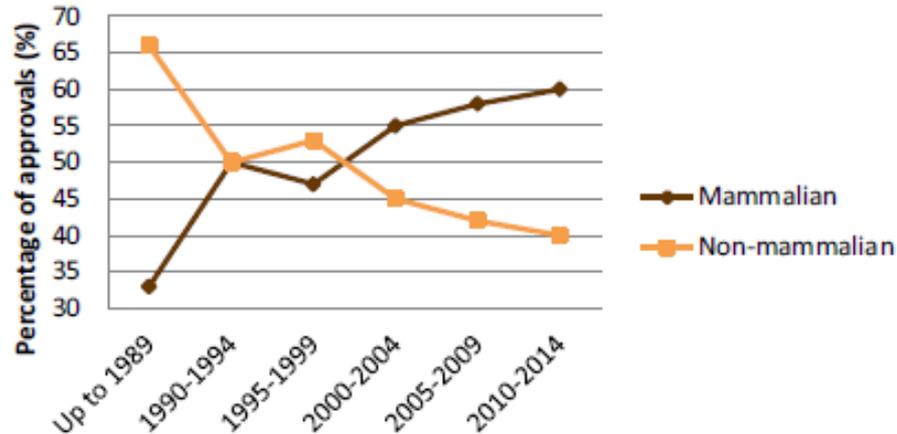
Sanchez-Garcia *et al. Microb Cell Fact (2016) 15:33*  
DOI 10.1186/s12934-016-0437-3

# Les intérêts d'*E.coli* comme système d'expression

---

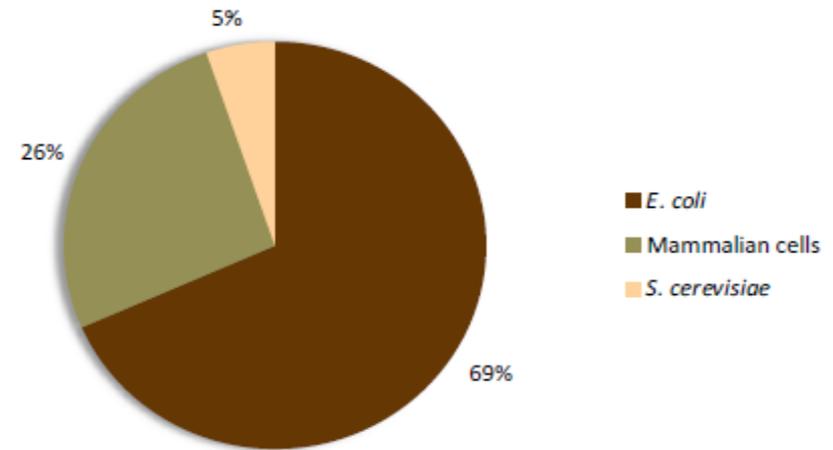
- **Le 1<sup>er</sup> système utilisé pour la production de bio-thérapeutique**
- **Nombreux produits approuvés par les autorités de santé**
  
- **Haut niveau d'expression qui peut être supérieur à 30% des protéines totales**
- **Faible coût de production**
  
- **Génétique et métabolisme bien connus**
- **Outils de biologie moléculaire disponibles**
  
- **Mais**
  - Absences de modifications post-traductionnelles complexes
  - Insolubilité des protéines

# Evolution de l'utilisation d'*E.coli* comme système d'expression



**Fig. 1** Number of recombinant protein products approved for use as drugs in humans, depending on the type of production platform

Sanchez-Garcia *et al. Microb Cell Fact* (2016) 15:33  
DOI 10.1186/s12934-016-0437-3

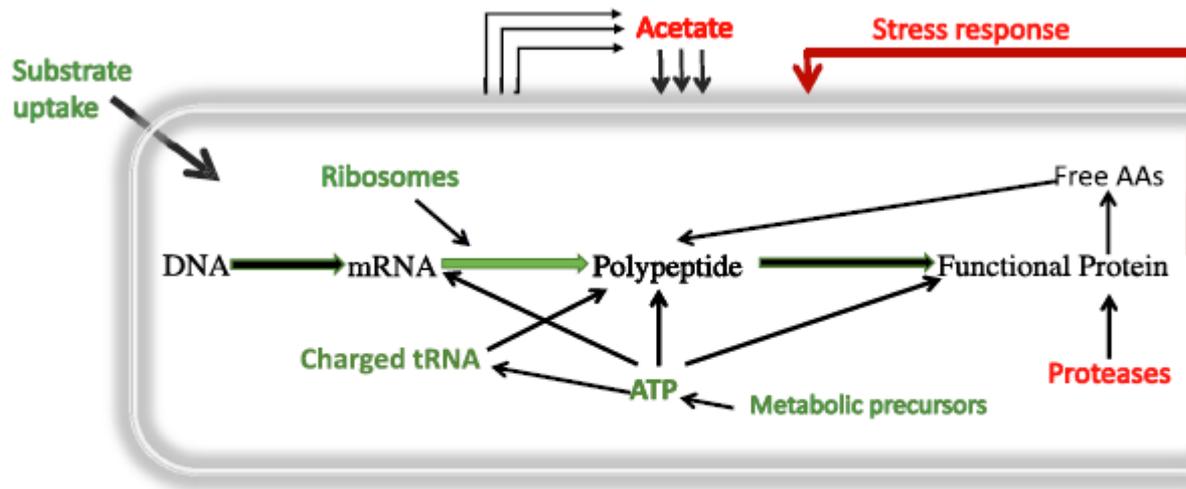


**Fig. 4** Cell factories used for the production of recombinant biopharmaceuticals against cancer (expressed in percentages)

- *E.coli* reste un système d'expression très compétitif
  - approches OMICS
  - l'ingénierie moléculaire
  - la biologie synthétique

# Impact de la production de protéines recombinantes sur *E.coli*

- La production de protéines recombinantes est un challenge pour la cellule
  - réduction de la biomasse, de la productivité et de la viabilité cellulaire
- La cellule réagit en induisant un mécanisme de réponse au stress
  - pour adapter et réajuster le métabolisme pour restaurer la viabilité



**Figure 2** Simplified schematic of the cellular stress response on various factors affecting recombinant protein synthesis. The down-regulated pathways are shown in green (substrate uptake, ribosomes, translation rates, tRNA and ATP) and up regulated pathways (Proteases, acetate formation and stress response) are shown in red.

Mahalik *et al.* 2014

# Impact de la production de protéine recombinantes sur *E.coli*

---

- La production de protéines recombinantes est un challenge pour la cellule
  - réduction de la biomasse, de la productivité et de la viabilité cellulaire
- La cellule réagit en induisant un mécanisme de réponse au stress
  - pour adapter et réajuster le métabolisme pour restaurer la viabilité
- La charge métabolique doit être prise en compte quand on souhaite optimiser la production de protéine recombinante
  - **Approche empirique:**
    - le vecteur d'expression,
    - les conditions de culture
    - L'hôte et le métabolisme de l'hôte
  - **Approche au niveau des systèmes**

# Approche empirique pour optimiser la production de protéines recombinantes

## ● Vecteur d'expression

- Nombre de copie
- taille du plasmide
- marqueur de sélection
- force du promoteur

Consommation d'énergie, de ressources induisant un ralentissement de la croissance

## ● L'hôte et métabolisme de l'hôte

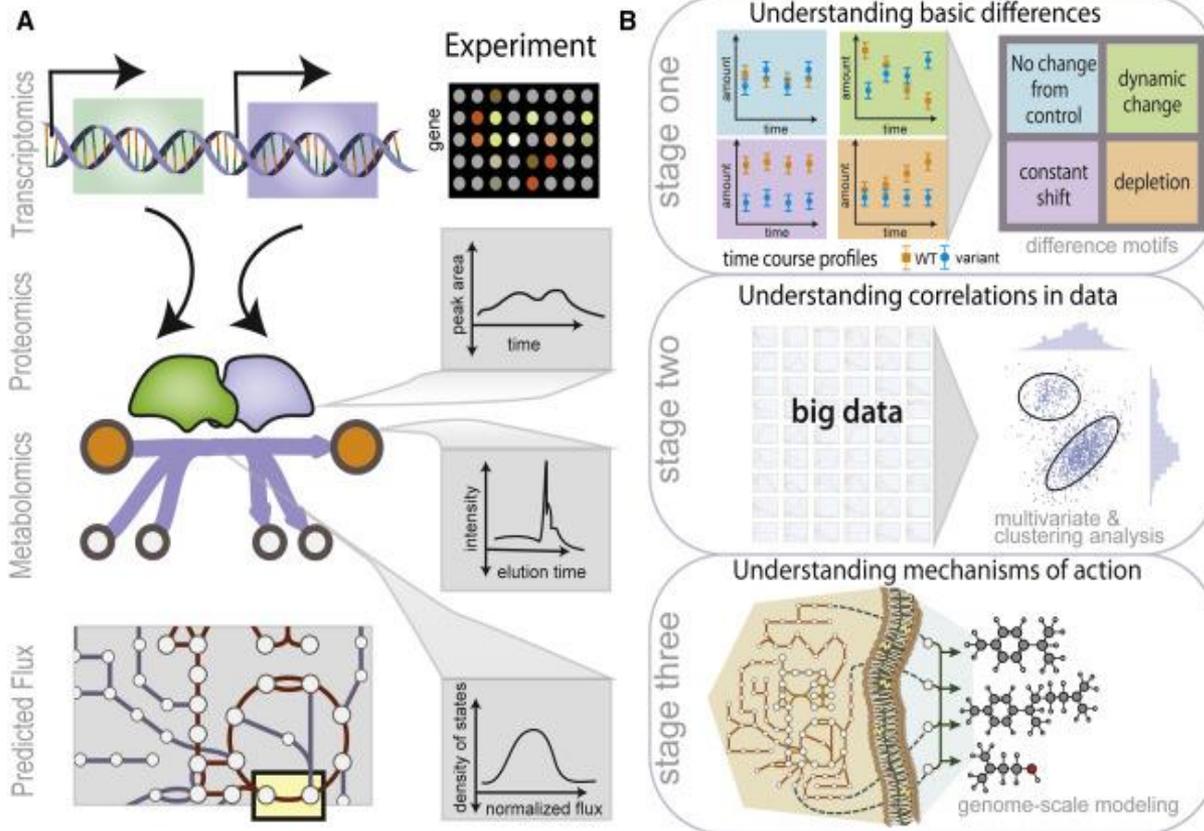
- Choix de l'hôte
- Production d'acétate
  - BL21DE3: avantage de produire un niveau faible d'acétate
- Charge métabolique
- **Caractérisation du stress métabolique par la détermination des paramètres physiologiques comme le rendement de croissance ou l'accumulation d'acétate: indicateur de l'état de la cellule**
  - Mais ne révèle pas l'étendue de la perturbation métabolique

## ● Conditions de culture

- Supplémentation en AA
- Paramètres de culture contrôlés
- Milieu défini

Les résultats obtenus ne sont pas toujours à la hauteur de ce qui est attendu

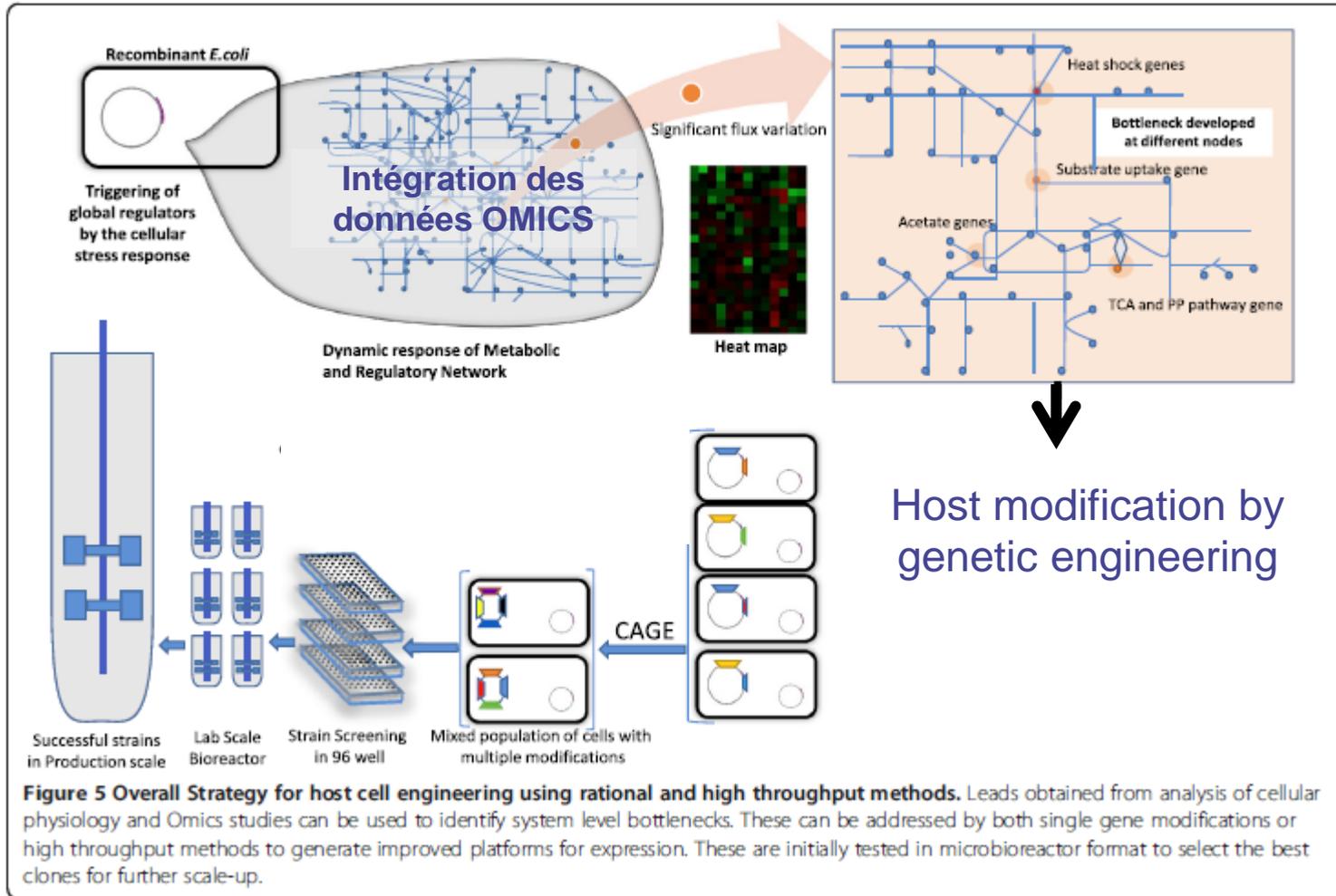
# Approche au niveau des systèmes



- Evaluation de l'abondance des constituants principaux impliqués dans les voies métaboliques
- Evaluation d'une manière plus large de l'altération dans l'expression d'une enzyme ou le changement du niveau d'une métabolite
- Evaluation de la réponse métabolique pendant la production de protéines recombinantes
- Identifier des facteurs cibles pour augmenter la production de protéines recombinantes

Adapté de Brunk *et al* 2016

# Approche au niveau des systèmes



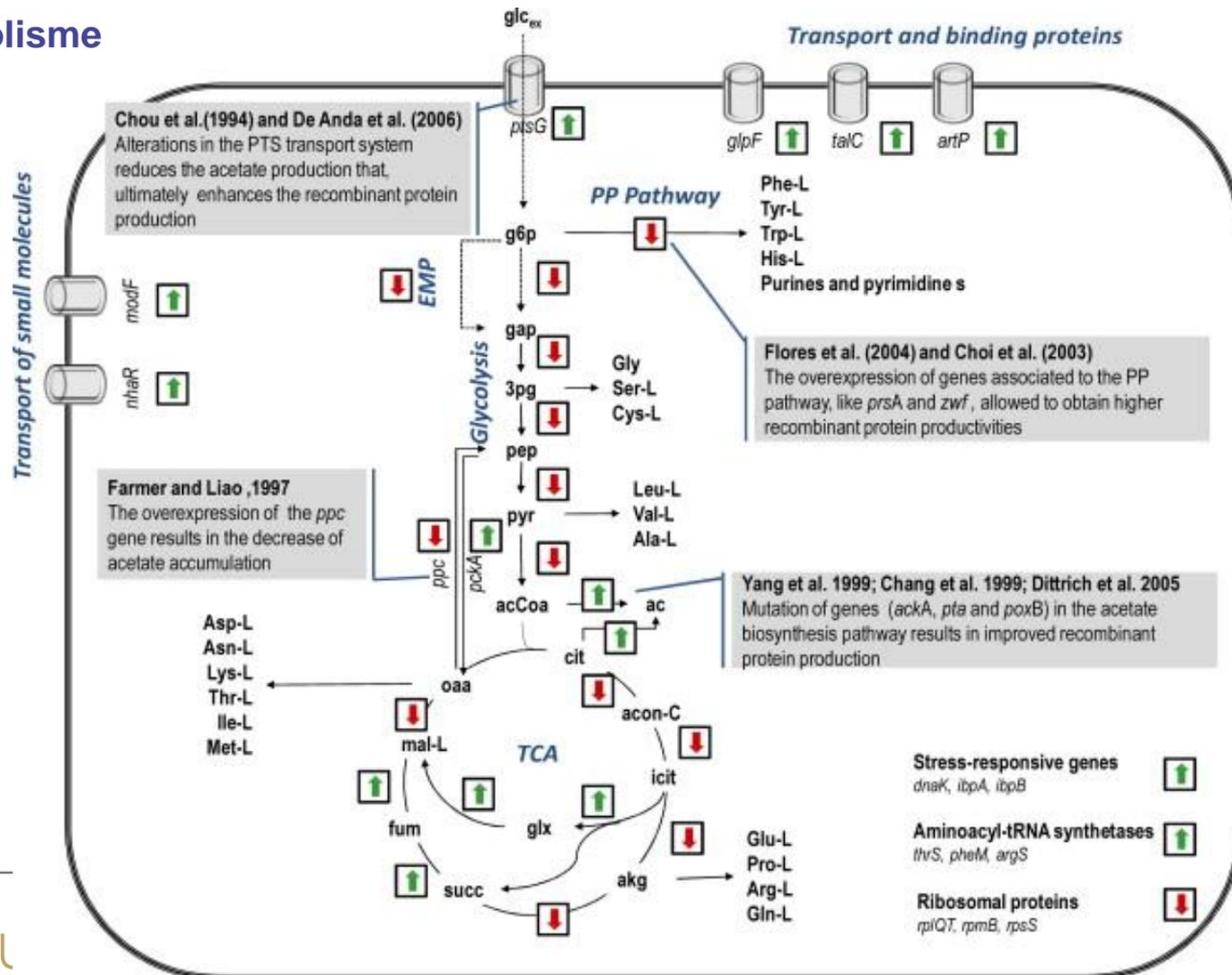
Adapté de Mahalik *et al* 2014

# Principaux résultats des analyses OMICS dans *E.coli* en réponse à l'induction de protéines recombinantes

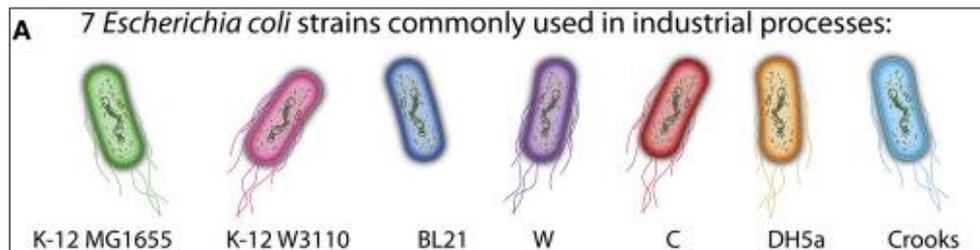
## Cartographie du métabolisme du carbone

**Flèches:** régulation observées en proteomiques et /ou transcriptomiques

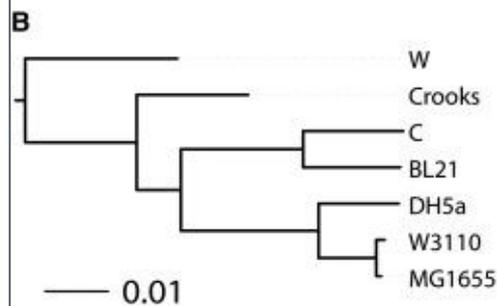
**En gris:** ingénierie génétiques évaluées



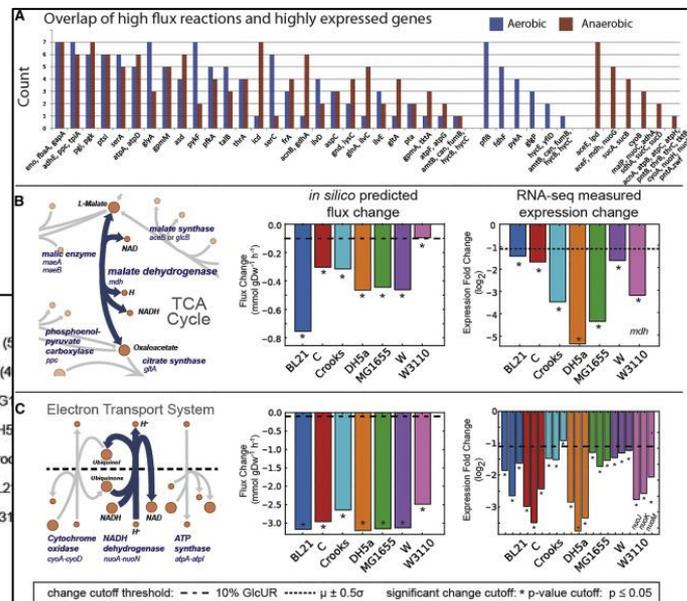
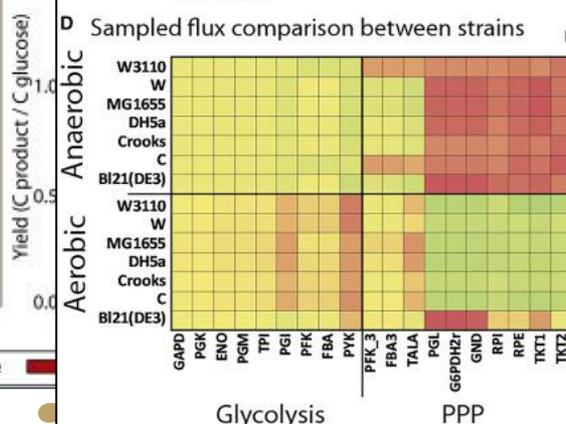
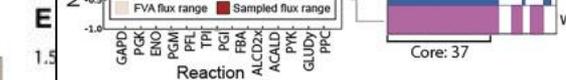
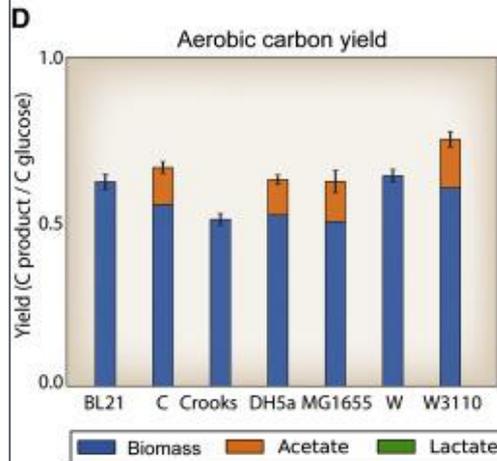
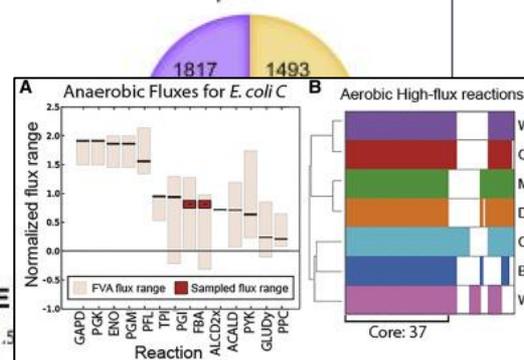
# Quantification des différences entre des souches de production



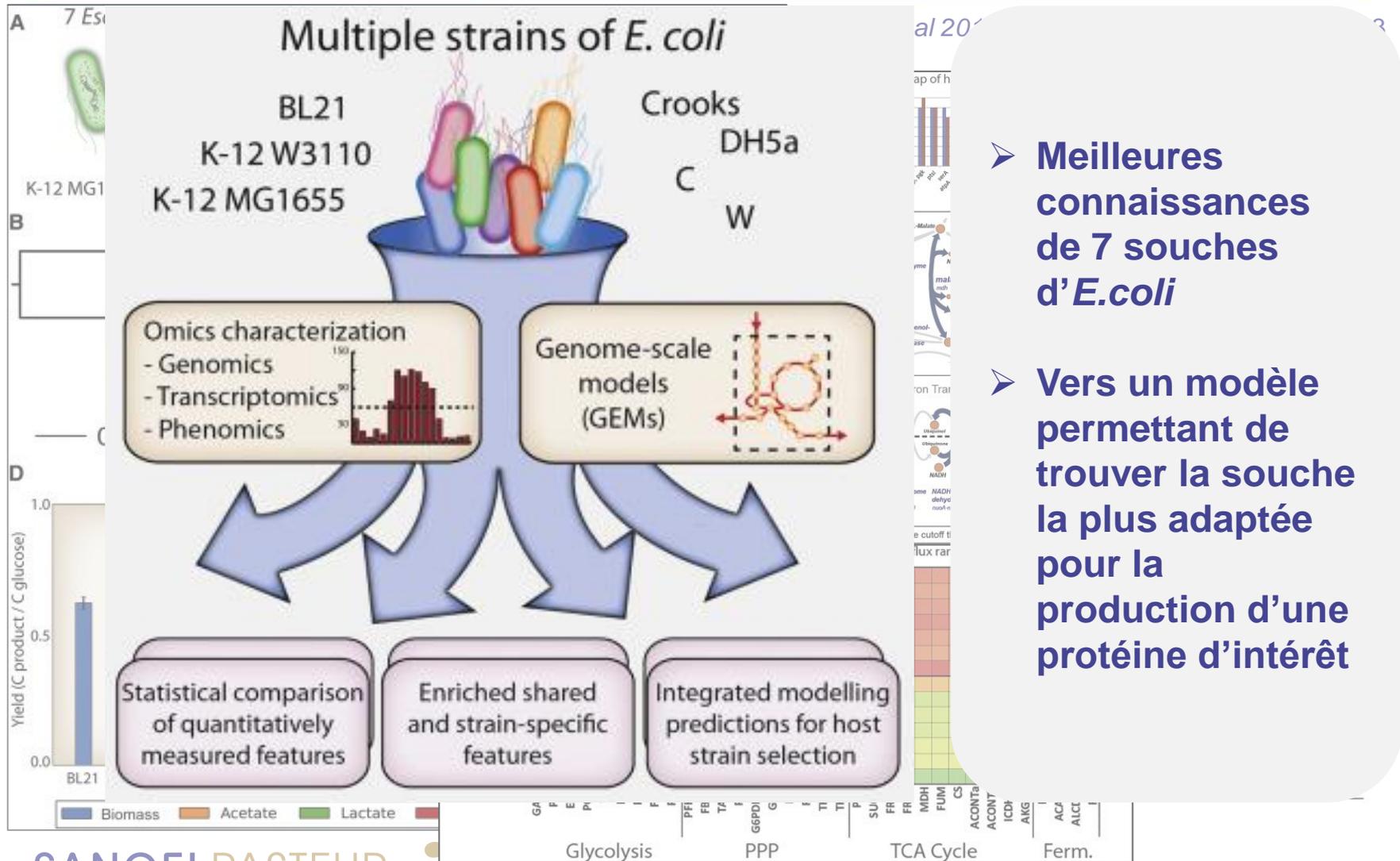
Monk et al 2016 - DOI: 10.1016/j.cels.2016.08.013



**C** Total 6626 protein families



# Quantification des différences entre des souches de production



- **Meilleures connaissances de 7 souches d'*E. coli***
- **Vers un modèle permettant de trouver la souche la plus adaptée pour la production d'une protéine d'intérêt**

# Emergence de la biologie synthétique

---

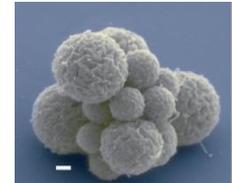
- C'est la combinaison de la biologie et des principes d'ingénierie dans le but de concevoir, de construire, de synthétiser de nouveaux systèmes et fonctions biologiques

- Construction d'un organisme contenant un génome minimal – C.Venter

SYNTHETIC BIOLOGY

## Design and synthesis of a minimal bacterial genome

Hutchison *et al.* 2016



- Réduction du génome d'*E.coli* (Kolisnychenko *et al.* 2002)
- Utilisation d'organisme comme châssis biologique avec de l'ADN synthétique comme bio-brique: un jeu de légo

# Vers le design d'*E.coli* pour une production optimisée de protéines recombinantes

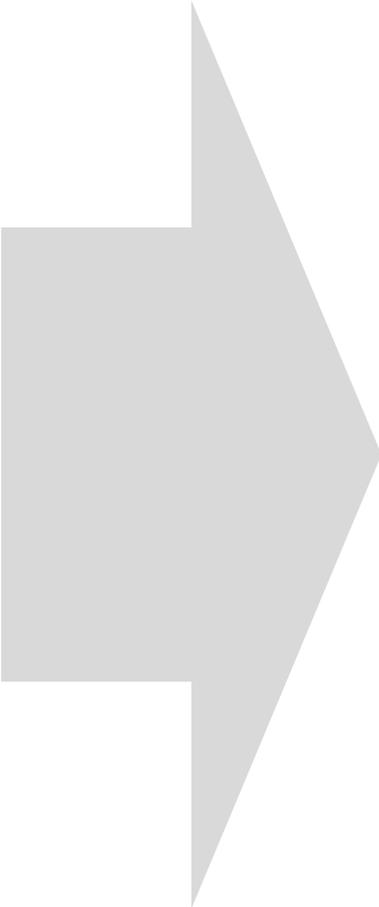
---

Meilleures connaissances  
des souches de production  
d'*E.coli*

Approche au niveau des  
systèmes avec intégration  
des données OMCIS

Développent des outils  
ingénierie moléculaire tels  
que CRISPR Cas9

Développement de la  
biologie synthétique:  
réduction des génomes,  
châssis biologiques



Design expérimental incluant  
tout le système  
&  
Génération de nouvelles  
souches d'*E.coli* optimisées  
pour la production d'une  
protéine d'intérêt

Merci