

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
25 avril 2002 (25.04.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/33065 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 13/00, 1/06, C12P 21/00

(74) Mandataires : VAILLANT, Jeanne etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/03261

(22) Date de dépôt international :
19 octobre 2001 (19.10.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(30) Données relatives à la priorité :
00/13415 19 octobre 2000 (19.10.2000) FR

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

Publiée :

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : TEISSIE, Justin [FR/FR]; 5, rue Signoret, F-31520 Ramonville (FR). GANEVA, Valentina [BG/BG]; Dépt. de Biophysique, Université de Sofia, 8, boulevard Dragan Tzankov, 1421 Sophia (BG). GALUTZOV, Bojidar [BG/BG]; Dépt. de Biophysique, Université de Sofia, 8, boulevard Dragan Tzankov, 1421 Sophia (BG).

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

WO 02/33065 A2

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PROTEINS BY ELECTROPORATION

(54) Titre : PROCEDE DE PRODUCTION DE PROTEINES PAR ELECTROPULSATION

(57) Abstract: The invention concerns a method for producing proteins which consists in subjecting a liquid medium flow comprising at least a yeast, bacterium or cell of mammals to electroporation, and recuperating the released proteins. The method comprises an electroporation step followed by an incubation step.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de production de protéines dans lequel un flux de milieu liquide comportant au moins une levure, bactérie ou cellule de mammifères, soumis à électropulsation, et les protéines libérées sont récupérées. Le procédé comporte une étape d'électropulsation, suivie d'une étape d'incubation.

PROCÉDÉ DE PRODUCTION DE PROTÉINES PAR ÉLECTROPULSATION

5

La présente invention concerne un procédé de production de protéines d'intérêt.

Les microorganismes que sont les bactéries, champignons, cellules végétales, cellules d'insectes et cellules animales, et notamment
10 les levures, peuvent produire des protéines, il est toutefois difficile de récupérer certains des produits de ces microorganismes, et en particulier de récupérer les macromolécules telles que les protéines.

Pour extraire des protéines d'intérêt de levure, qui sont des protéines naturellement produites, il est connu d'utiliser, d'une part, des
15 méthodes mécaniques, d'autre part, des méthodes chimiques.

Lorsque l'on utilise les méthodes mécaniques usuelles que constituent le broyage et la lyse sous pression, il est impossible de ne pas détruire les vacuoles des levures, et la libération des protéases contenues dans les vacuoles pose des problèmes de pureté et donc de purification du
20 produit fini.

Par ailleurs, les méthodes chimiques mènent également à la destruction des vacuoles et utilisent des détergents ou des agents de protéolyse qui s'ajoutent aux produits chimiques utilisés, comme contaminants du milieu. Ceci mène donc aussi à des problèmes de
25 purification ultérieurs.

De plus, certains des agents chimiques inactivent les enzymes.

La présente invention concerne une approche nouvelle où un traitement d'électropulsation est appliqué sur une suspension de cellules en écoulement, suivi d'une incubation dans un milieu adapté. Les cellules

peuvent être des levures, mais aussi des bactéries auxquelles peut être appliquée l'électropulsation d'une suspension dans de l'eau pure, par exemple, suivie d'une incubation relativement longue en milieu salin, et ce sans qu'aucun pré-traitement de la culture bactérienne visant à la modifier
5 mécaniquement, chimiquement ou biologiquement n'ait eu lieu. Elle peut également être adaptée aux cellules de mammifères, comme cela apparaîtra dans la description détaillée.

La présente invention concerne un procédé de production de protéines dans lequel un flux de milieu liquide comportant au moins une
10 levure, une bactérie ou une cellule de mammifères est soumis à électropulsation, et les protéines libérées sont récupérées. Comme cela apparaîtra par la suite, on entend par électropulsation un procédé où les cellules sont soumises à un train d'impulsions électriques.

Ainsi la présente invention résout les problèmes évoqués ci-dessus. En effet, selon l'invention, le traitement électrique ne provoque pas
15 la désintégration des cellules et on n'obtient donc pas de fragments cellulaires dans le milieu, après traitement. Tout le contenu de la cellule n'est pas libéré : les organites ainsi que la plupart des grosses protéines cytoplasmiques sont retenus par la paroi cellulaire. Les vacuoles ne sont
20 pas affectées et les protéases ne sont pas libérées. La purification des protéines d'intérêt en est simplifiée et le procédé de l'invention permet une plus grande sélectivité des produits libérés.

Des travaux portant sur l'électropulsation en lit fixe ont été effectués, mais les conditions décrites V. Ganeva, B. Galutzov FEMS
25 Microbiology Letters 174 (1999) 279-284 ne permettent pas la réalisation du présent procédé avec les résultats escomptés.

En effet, le procédé en lit fixe ne permet pas la perméabilisation irréversible de toutes les cellules traitées. Ainsi, la demanderesse a constaté que certaines conditions de mise en œuvre, dans le procédé en lit
30 fixe, pouvaient présenter certains inconvénients en flux.

Il s'agit notamment des conditions relatives à la conductivité du milieu d'électropulsation. Enfin, les traitements d'électropulsation appliqués provoquent des effets différents sur les levures, selon qu'ils ont lieu en lit fixe d'une part, et en flux d'autre part, et notamment leurs effets sur le niveau de perméabilisation des cellules.

Par ailleurs, l'inactivation des enzymes peut être évitée dans le procédé en flux, qui permet d'éviter l'échauffement notable de la suspension cellulaire. Ceci présente un grand intérêt notamment du point de vue du rendement en évitant une étape ultérieure de refroidissement et l'utilisation des dispositifs nécessaires à cette étape.

Ainsi, selon l'invention, le traitement d'une suspension des cellules à haute concentration permet d'obtenir une libération optimale sans provoquer d'échauffement du milieu.

Enfin, il est possible d'appliquer le processus selon l'invention sur des volumes importants, et d'obtenir de grandes quantités de protéines d'intérêt à un degré de pureté impossible à obtenir jusqu'ici par d'autres méthodes, et en particulier sans l'ajout d'inhibiteurs de protéase, en utilisant des milieux de composition simple.

Dans le procédé de l'invention, l'application d'un champ électrique externe de haute densité sur les cellules, et notamment les cellules en suspension, provoque l'apparition d'un potentiel qui s'ajoute au potentiel transmembranaire. Lorsqu'un certain seuil critique est dépassé, la membrane cellulaire devient perméable. Quand les cellules sont en mouvement (en flux), leur position par rapport aux électrodes change. Les impulsions auront comme cible différentes régions de la surface. Il en résulte une plus large surface perméabilisée et un niveau local du changement structural différent que celui des cellules en statique (en batch). A des paramètres définis du champ électrique appliqué, comme l'intensité, la durée ou le nombre des impulsions, les changements de la membrane provoqués par les pulsations peuvent devenir irréversibles et il s'ensuit une libération du contenu intracellulaire.

Pour les levures qui ont une paroi, cet efflux est contrôlé par la porosité de la paroi, la perméabilité pour les différentes molécules dépendant de leur dimension.

5 Les inventeurs ont observé que les membranes des bactéries se perméabilisent pour des valeurs du champ électrique similaires aux valeurs employées pour les levures.

La perméabilisation est un processus très rapide qui se développe pendant les quelques millisecondes de l'application des impulsions électriques, et demeure pendant un laps de temps allant de
10 quelques minutes à des heures après le traitement électrique.

On a pu constater que le traitement imposé aux *levures* peut provoquer la libération de l'enzyme invertase, située dans l'espace périplasmique. Il apparaît que la paroi cellulaire voit sa porosité augmenter, en plus de l'influence du champ sur la membrane plasmique.

15 Le procédé selon l'invention permet l'efflux et ainsi la libération, et la récupération ultérieure de protéines secrétées par la cellule et qui s'accumulent dans l'espace périplasmique.

Selon d'autres aspects, l'invention concerne également les protéines obtenues par le procédé décrit ici et les compositions en
20 comportant.

Du point de vue des cellules que l'on peut traiter par le procédé d'invention, toutes les espèces susceptibles de produire des protéines hétérologues ou homologues peuvent être traitées, les exemples ci-après n'étant pas limitatifs.

25 Pour les levures, on peut citer notamment *Saccharomyces*, *Kluyveromices*, *Pichia*, *Candida* et *Hansenula*.

Du point de vue des bactéries, on peut citer entre autres des bactéries Gram-négatives, et notamment *E.coli*.

Du point de vue des cellules de mammifères, on peut citer entre autres des fibroblastes, et notamment des cellules d'hamsters chinois.

Selon l'invention, les cellules sont mises en culture, elles sont alors lavées pour éliminer les ions du milieu, puis elles subissent le traitement électrique et sont mises à incuber dans un milieu d'incubation. Ces cellules sont alors séparées du surnageant. La purification des protéines est réalisée selon les moyens usuels.

Selon la présente invention, l'étape d'électropulsation est précédée d'une étape de culture. La croissance peut y être maintenue jusqu'à la phase exponentielle ou jusqu'à la phase stationnaire. De préférence, la phase de culture est exponentielle mais des résultats positifs ont été obtenus aussi en phase stationnaire. Le milieu de culture peut donc être choisi pour permettre une expression maximum de la protéine recherchée qu'elle soit homologue ou hétérologue. La Demanderesse a mis en évidence que l'efficacité de l'électroextraction n'est pas influencée par la composition du milieu de culture.

Le transfert des cellules du milieu de culture au milieu de pulsation s'effectue après une centrifugation des suspensions.

De préférence, les cellules sont en suspension dans le milieu liquide soumis à électropulsation. La concentration de levures ou de bactéries en suspension dans le milieu liquide d'électropulsation est comprise entre environ 10^6 et 5×10^9 cellules/ml, de préférence entre environ 5×10^8 et environ 2×10^9 cellules/ml. La concentration en cellules de mammifères est de préférence environ 50 fois plus faible.

Du point de vue des conditions du traitement d'électropulsation, celui-ci peut être réalisé avec des intensités du champ d'au moins 1 kV/cm, notamment 1 et 10 kV/cm, de préférence comprise entre 1 et 5 kV/cm, et notamment 2 et 4 kV/cm.

La durée des impulsions est de préférence choisie pour être supérieure à 0,01 ms, notamment supérieure à 1 ms. Elle peut atteindre jusqu'à 100 ms. Elle est de préférence choisie entre environ 0,5 et 15 ms, notamment 1 et 15 ms.

Lorsqu'on applique des champs électriques de haute densité, on applique en général une seule impulsion. On peut aussi appliquer une série d'impulsions consécutives, ladite série ayant une durée allant de quelques micros à quelques millisecondes. Ainsi, le traitement appliqué à chaque
5 cellule dure environ de 0,01 à 100 s, de préférence de 0,15 à 15 s.

Le nombre d'impulsions reçues par chaque cellule de levure, de bactérie ou de mammifère est de l'ordre de 1 à 100, de préférence entre 5 et 20, de façon préférée entre 12 et 20, par exemple de l'ordre de 10.

Par exemple, dans le cas de 2 Hz, la durée de l'impulsion serait
10 de 3 ms et l'intensité du champ de 3 kV/cm, dans le cas de 6 Hz, la durée est de 2 ms et l'intensité de 3,2 kV/cm, ou de 1 ms pour 4,3 kV/cm.

Comme cela apparaîtra dans les exemples, on peut ainsi appliquer les impulsions en série, et par exemple une série d'une quinzaine d'impulsions, une impulsion pouvant durer de 0,1 à 4 ms, notamment de 2
15 à 4 ms.

En ce qui concerne, la fréquence d'impulsions, elle est de préférence selon l'invention supérieure à 0,1 Hz, de préférence 1 Hz. Elle peut atteindre 100 Hz, voire 500 Hz. De façon plus particulièrement préférée, elle est comprise entre 1 et 100 Hz, notamment 1 et 10 Hz. Par
20 ailleurs, le produit de la durée de chaque impulsion par la fréquence doit rester inférieur à 1.

En ce qui concerne les cellules de mammifères, l'intensité du champ électrique appliquée doit être suffisante pour permettre la sortie des protéines cytoplasmiques. Il faut, dans le cas des paramètres électriques
25 illustrés dans l'exemple, utiliser des intensités de champ électriques supérieures à 1kV/cm pour qu'il ait libération des protéines cytoplasmiques dans le milieu extérieur. Il a été remarqué que la viabilité des cellules est de 50% dans les conditions de meilleur relargage (1,25 kV/cm).

Pour ce qui concerne le profil des impulsions de champ
30 électrique, on peut envisager des vagues carrées, trapézoïdales,

triangulaires, sinusoïdales, sinusoïdales redressées mono et bialternance, ou à déclin exponentiel, unipolaires, bipolaires, symétriques, asymétriques ; on utilise de préférence des vagues carrées.

5 Selon l'invention, le milieu d'électropulsation a une conductivité basse, de préférence inférieure à 2 mS/cm. Il est ainsi choisi pour limiter l'amplitude de l'effet Joule associé aux impulsions électriques. Il peut donc être un milieu salin simple. Le milieu d'électropulsation peut aussi être de l'eau déionisée, pour les levures et bactéries.

10 Après le traitement au champ électrique, le milieu liquide comportant les cellules traitées est mis à incuber pour favoriser la fuite des protéines d'intérêt.

Le milieu d'incubation peut être le même que le milieu de pulsation mais il peut être également modifié. La transition du milieu de pulsation à celui d'incubation peut être réalisée par transfert des cellules pulsées dans un tampon contenant un stabilisateur osmotique.

15 Comme milieu d'incubation, on peut utiliser selon l'invention, un milieu salin simple, comportant au moins un sel, par exemple un phosphate de potassium. Ainsi on peut utiliser un milieu d'incubation comportant au moins un tampon comme le phosphate de potassium à raison de 10 mM à 0,2 M, de préférence 50-150 mM, un stabilisateur osmotique comme le glycérol à raison de 0,05 à 1 M, de préférence 0,2-0,5 M, il peut aussi comporter un réducteur comme du dithiothreitol à raison de 0,01 à 0,2 mM –à titre d'agent conservant la stabilité des protéines extraites– on peut utiliser aussi d'autres produits contenant des groupes thiol (sulfhydrique)

20

25 comme du mercaptoéthanol ou de la mercaptoéthylamine.

Le glycérol est souvent utilisé comme protecteur osmotique mais dans des concentrations de 10 à 20%. Dans le présent procédé, sa présence vise à la préservation des vacuoles intactes, sa concentration est beaucoup plus basse (par exemple 2,8%), ce qui facilite la purification

30 ultérieure des protéines libérées.

A la fin de l'incubation, on peut purifier les protéines par tout moyen connu de séparation des protéines d'un milieu liquide, et par exemple par centrifugation de volume fixe, ou en flux continu, filtration, décantation ou précipitation, de préférence centrifugation ou filtration.

5 Pour ce qui est du choix des milieux de culture, d'incubation et d'extraction, notamment le spécialiste du traitement des levures, des bactéries et des cellules mammifères pourra adopter la composition de ces milieux au cas d'espèce.

10 Pour les levures et bactéries, le milieu soumis à l'électropulsation peut être de l'eau pure et le milieu de culture peut être salin. Pour les cellules de mammifères, le milieu de culture doit être équilibré du point de vue osmotique, de préférence, et le milieu de culture peut être similaire au milieu d'électropulsation. Ainsi on peut utiliser un milieu à faible contenu ionique, où du saccharose par exemple assure la
15 protection contre le choc osmotique.

Le procédé de l'invention peut être appliqué avec les levures à l'extraction d'enzymes cytoplasmiques telles que l'ADH (alcool déshydrogénase), PGK (phosphoglycérate kinase), HK (hexokinase), GAPDH (glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase), GLR (glutathion
20 réductase), SOD (superoxyde dismutase) ainsi que la bêta-galactosidase, dans le cas de *Kluiveromyces lactis*.

Selon l'invention, avec les levures les différentes étapes de culture, incubation et extraction peuvent notamment avoir des durées de l'ordre de :

- 25
- culture jusqu'à la phase exponentielle : environ 15h ;
 - culture jusqu'à la phase stationnaire : 24 à 48h ;
 - séparation des cellules du milieu de culture, lavage et dilution : 1h ;
 - traitement électrique de chaque volume traversant la
30 chambre de pulsation : quelques secondes ;

- incubation visant la libération de protéines après électropulsation pour obtenir un maximum : entre 3 et 8h ;
- séparation des protéines : 10 mn de centrifugation à 2000xg.

5 Selon l'invention, avec les bactéries les différentes étapes de culture, incubation et extraction peuvent notamment avoir des durées de l'ordre de :

- préculture pendant la nuit ;
- culture jusqu'à la phase exponentielle de 4 à 10 heures ;
- séparation des cellules du milieu de culture, lavage et dilution : 1h ;
- traitement électrique de chaque volume traversant la chambre de pulsation : quelques secondes ;
- incubation visant la libération de protéines après électropulsation pour obtenir un maximum : entre 2 et 8h ;
- 15 - séparation des protéines : 10 mn de centrifugation à 2000xg.

Selon l'invention, avec les cellules de mammifères les différentes étapes de culture, incubation et extraction peuvent notamment avoir des durées de l'ordre de :

- culture jusqu'à la phase exponentielle de plusieurs jours pour avoir une biomasse suffisante ;
- 20 - séparation des cellules du milieu de culture, lavage et dilution : 1h ;
- traitement électrique de chaque volume traversant la chambre de pulsation : quelques secondes ;
- 25 - incubation visant la libération de protéines après électropulsation pour obtenir un maximum : environ 30 min ;
- séparation des protéines : 10 mn de centrifugation à 100xg.

Du point de vue du matériel mis en œuvre pour la réalisation du procédé, une chambre d'électropulsation relie un réservoir où les cellules
30 après leur cultivation, lavage et dilution sont aspirées par la chambre,

l'écoulement les faisant passer entre les électrodes connectées à un électropulsateur. On peut adapter la chambre et matériel d'électropulsation : les impulsions électriques peuvent être appliquées à une fréquence qui est fonction de la vitesse d'écoulement, si bien que les
5 cellules reçoivent un nombre prédéfini d'impulsions adaptées en intensité et en durée, par exemple 2 à 5 kV/cm et d'une durée de 0,1 à 15 ms, par exemple de 1 à 15 ms.

Pour des durées similaires, des intensités plus faibles de 0,5 à 5 kV/cm, de préférence 1 à 4 kV/cm, peuvent être utilisées pour les cellules
10 de mammifères.

A la sortie de la chambre d'écoulement, le flux des cellules est dilué dans le milieu d'incubation et la fuite transmembranaire des protéines peut avoir lieu. Les protéines sont alors séparées des levures, bactéries ou cellules de mammifères par centrifugation ou filtration. Elles sont alors
15 purifiées.

La détection de la sortie des protéines du microorganisme peut être obtenue par le test au bleu de coomassie, qui permet une évaluation globale des protéines présentes dans l'extrait, méthode de référence pour faire un bilan des protéines solubles dans un extrait soluble. Dans les
20 exemples réalisés, les protéines membranaires ont sédimenté lors de la centrifugation. Elles ne sont plus présentes dans l'extrait.

Les enzymes peuvent être concentrées et purifiées ultérieurement par des méthodes connues. La séparation des enzymes libérées des cellules du surnageant est une étape usuelle avant de
25 procéder à une purification ultérieure. Dans le cas de l'électropulsation, comme il n'y a pas de fragmentation des cellules, une centrifugation à 1500-2000 xg est suffisante pour les levures et les bactéries, et à 100 x g pour les cellules de mammifères. A un échelon industriel, cette séparation peut être réalisée par centrifugation en continu ou par filtration.

30 La mise en œuvre du procédé d'électropulsation a été réalisée, sur des flux continus de culture cellulaire dans les conditions suivantes.

EXEMPLES DE PRODUCTION DE PROTÉINES PAR ÉLECTROPULSATION

DE LEVURES :

Exemple a) *Saccharomyces cerevisiae* (souche FY-86) a été
5 cultivé en milieu YPD (10 g/l d'extrait de levure, 20 g/l de peptone, 20 g/l de
glucose) à 30°C sous 240 rpm. La croissance y a été maintenue jusqu'à la
phase exponentielle et jusqu'à la phase stationnaire.

Après la culture des levures, les cellules ont été séparées du
milieu de culture par centrifugation à 2000 g pendant 5 mn, lavées deux
10 fois avec de l'eau déionisée et diluées en eau déionisée jusqu'à une
concentration de 10^9 cellules/ml.

Les paramètres de pulsation ont été choisis de la façon
suivante : une série de quinze impulsions, chacune d'une durée de 3 ms, à
une fréquence de 4 Hz, le débit étant de 3 ml/mn.

15 Juste après le traitement, la suspension a été diluée de 5 fois
dans le milieu d'extraction, qui est également dans le cas présent le milieu
d'incubation. Il comportait une concentration finale de tampon de
phosphate de potassium (0,1 M), du glycérol (0,3 M) et 1 mM DTT.

Le séjour dans le milieu d'extraction a été de l'ordre de 6 heures.
20 Le processus d'électropulsation et l'incubation suivante visant l'extraction
se sont déroulés à température ambiante.

L'activité des protéines récupérées a alors été évaluée par un
test spécifique. La totalité des protéines libérées a été évaluée par le test
Biorad.

25 Pour *Saccharomyces cerevisiae*, on a constaté que la libération
de 80% des protéines cytoplasmiques, telles que de la glyceraldéhyde
phosphate déshydrogénase, de l'hexokinase, de la phosphoglycérate
kinase, dans un milieu comprenant du phosphate de potassium (0,084 M),
du glycérol (0,24 M) et 0,8 mM DTT, a duré 4 heures.

Exemple b) On a réalisé un essai similaire, dans les mêmes conditions que ci-dessus, la croissance étant maintenue en phase stationnaire. On a obtenu des résultats similaires à ceux de a).

Exemple c) *Kluyveromyces lactis* (souche strain 2209 a été cultivée en milieu YPL (10 g/l d'extrait de levure, 20 g/l de peptone, 20 g/l de lactose) et dans les mêmes conditions.

Un protocole très similaire à celui de a) a été suivi.

Après la culture des levures, les cellules ont été séparées par centrifugation à 2000 g pendant 5 mn, lavées deux fois avec de l'eau déionisée et diluées en eau déionisée, jusqu'à une concentration de 10^9 cellules/ml.

Les paramètres de pulsation ont été choisis de la façon suivante : une série de quinze impulsions, chacune d'une durée de 3 ms, à une fréquence de 4 Hz, donc à un débit pouvant atteindre 3 ml/mn. Une augmentation du débit peut être obtenue par une simple modification des caractéristiques géométriques de la chambre de pulsation et des performances de l'électropulsateur.

Juste après leur traitement, la suspension est diluée de 5 fois dans le milieu d'extraction, qui est également dans le cas présent le milieu d'incubation, et comporte une concentration initiale de tampon de phosphate de potassium (0,1 M), du glycérol (0,3 M) et 1 mM DTT. Le séjour dans le milieu d'extraction est de l'ordre de 8 heures. Le processus d'électropulsation et l'incubation suivante visant l'extraction se sont déroulés à température ambiante.

Pour *Kluyveromyces lactis*, la libération de la beta-galactosidase cytoplasmique dans un milieu (Phosphate 0,084 M), du glycérol (0,24 M) et 1,6 mM DTT, a duré 7 à 8 heures.

Après l'incubation, les cellules sont séparées du liquide contenant les protéines libérées par centrifugation.

Exemple d) : dans les mêmes conditions, on a reproduit l'exemple a) avec des paramètres de pulsation suivants : une série de 15

impulsions, chacune d'une durée de 3 ms, à une fréquence de 50 Hz, le débit étant de 60 ml/mn.

Exemple e) : on a reproduit l'exemple c), à ceci près que les paramètres de pulsations ont été choisis de la façon suivante : une série de
5 15 impulsions, chacune d'une durée de 3 ms, à une fréquence de 6 Hz, donc un débit pouvant atteindre 7,2 ml/mn.

Ces données sont comparées avec les résultats d'une lyse classique des levures : on a constaté pour a), comme pour b), c), d) et e) l'absence de dégradation protéolytique, alors qu'elle a lieu avec les autres
10 procédés. Moins de 5 à 10 % des enzymes ont été désactivées. Ce résultat montre la supériorité de la méthode électrique par rapport à ce qui est actuellement utilisé à l'échelle du laboratoire ou en processus industriel.

Les profils après électrophorèse sur gel de polyacrylamine (PAGE) où des bandes nettes sans traînée sont présentes, ont confirmé
15 l'absence de dégradation protéolytique au cours du processus d'extraction.

Les résultats quantitatifs suivants ont été obtenus pour a), comme pour b), c), d) et e).

- le bilan des protéines récupérées représente de 45 à 50% de toutes les protéines cellulaires (qui peuvent être obtenues par lyse cellulaire
20 enzymatique ou désintégration mécanique) ;
- le bilan des enzymes libérées et analysées est : phosphoglycérate kinase, glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase et hexokinase de l'ordre de 80 à 90% de leur contenu dans les cellules.

L'activité spécifique des enzymes dans le surnageant des
25 cellules pulsées est de 1,7 à 2 fois supérieure que celle obtenue par broyage mécanique ou lyse enzymatique des cellules. On constate donc au stade de l'incubation, qu'une purification des enzymes fonctionnelles récupérées a lieu.

EXEMPLES DE PRODUCTION DE PROTÉINES PAR ÉLECTROPULSATION**DE BACTÉRIES**

– Culture

5 50 ml d'une culture de nuit d'E coli (BL 21) ont été resuspendus dans 450 ml de milieu LB. La culture a été incubée pendant 2 h à 37°C sous agitation.

La culture présentait une densité optique de $E_{660} = 0.7$. Elle a été centrifugée à 4 000 rpm pendant 10 min. Le culot a été resuspendu en 500 ml d'eau milliQ (Millipore). Une incubation de 30 min à la température ambiante (25°C) a suivi.

On a appliqué une centrifugation à 4 000 rpm pendant 10 min et le culot a été resuspendu dans 45 ml d'eau milliQ. Les deux lavages successifs ont permis d'éliminer une grande partie des ions du milieu où se trouvent les bactéries.

15 – Conditions de traitement:

La chambre de pulsation présente un volume de 0.3 ml et une distance de 3mm entre les électrodes (planes parallèles, en acier inoxydable).

Le débit a été fixé à 2,4 ml/min par une pompe péristaltique.

20 Des trains d' impulsions de durée individuelle de 2 ms à la fréquence de 3 Hz ont été appliqués en continu. Cela correspond à l'application de 22 impulsions à chaque bactérie.

La tension du générateur a été fixée à 1500 V, soit une intensité de champ de 5 kV/cm.

25 Après le traitement électrique, 100 microlitres de la suspension bactérienne électrotraitée ont été resuspendus dans 400 microlitres de tampon PBS 0.105 M, pH=7. L'échantillon a alors été soumis à une incubation à 37°C.

Les cellules contrôles ont été traitées de la même façon mais la tension du générateur est fixée à 0 V.

30

Après une incubation de 5 h, les cellules ont été centrifugées dans une centrifugeuse Eppendorf pour 3 min (13000 x g). On a déterminé le contenu de protéines dans le surnageant.

– Détermination des protéines

5 Un bilan global des protéines présentes dans le surnageant a alors été évalué par un test colorimétrique.

L'échantillon a été évalué en mesurant la densité optique à 595 nm du mélange de 100 microlitres de surnageant, 700 microlitres d'eau milliQ et 200 microlitres de réactif Bradford (Biorad, USA).

10 La référence du spectrophotomètre est le mélange de 800 microlitres d'eau milliQ et de 200 microlitres de réactif de Bradford.

Une gamme de référence de protéines a été réalisée avec de l'albumine bovine (Sigma, USA)

15 En conclusion, on a déterminé que le surnageant de l'échantillon essai possédait une densité optique de 0,570 soit 11,4 µg de protéine, alors que celui du contrôle était de 0,103 soit 2,4 µg de protéine. Dans ces conditions de mesure, 9 µg de protéines ont été extraites de l'échantillon de bactéries évalué par le traitement électrique suivi d'une incubation de 5h.

20 La quantité de protéines (9 µg) correspondait au volume de l'échantillon soit 0,1 ml de surnageant, soit 25 µl de la suspension bactérienne électrotraitée.

Aucun prétraitement de la culture bactérienne visant à modifier mécaniquement, chimiquement ou biologiquement n'a eu lieu.

25 **EXEMPLE DE PRODUCTION DE PROTÉINES PAR ÉLECTROPULSATION DE CELLULES DE MAMMIFÈRES**

– Culture :

30 Les cellules de hamsters chinois (CHO, clone WTT) sont des cellules partiellement transformées. Elles ont été cultivées à 37°C en suspension dans des flacons en verre du type spinner maintenus sous agitation douce (100 rpm) pour éviter l'adhésion des cellules au support. Le

milieu de culture utilisé était le milieu minimum essentiel de Eagle: MEM 0111 (Eurobio) complémenté avec, 8% de sérum foetal de veau (Seromed), des antibiotiques (pénicilline à 100 unités par ml, streptomycine à 100 µg par ml), de la L-glutamine (0,58 mg par ml).

5 – Electropulsation

Lors de l'électropulsation des cellules, le milieu de culture a été remplacé par du milieu de pulsation. Pour les cellules CHO, il est constitué de tampon phosphate (10mM, pH 7,2) de saccharose (250mM) et de MgCl₂ (1mM) ((Conductance 1400µS/cm±200µS/cm; osmolarité ~ 0,317osmol/kg)). Ce milieu iso-osmotique et de faible force ionique permet de limiter, grâce à sa faible conductance l'effet Joule associé aux impulsions électriques.

Les cellules ont été centrifugées à 100 xg pendant 5 minutes. Le surnageant a été éliminé puis le culot a été repris par du milieu de pulsation.

Les cellules ont été électropulsées à champs variables par 10 impulsions d'1ms, délivrées à la fréquence d'1Hz. Le débit de l'écoulement est 1,2ml/min. Dans la chambre, les électrodes étaient constituées par 2 lames parallèles séparées par une distance interélectrode de 0,4cm. Le volume de la chambre de pulsation était de 0,2ml, et la direction du champ perpendiculaire à celle de l'écoulement moyen.

Après l'électropulsation, les cellules ont été mises à température ambiante pour permettre aux membranes des cellules de retrouver leur état natif. 1,5 ml de suspension cellulaire (1.10⁶cellules/ml) ont été récupérés pour chaque essai. Les cellules ont été incubées 10 minutes à température ambiante puis placées à 4°C. Les cellules ont ensuite été centrifugées pendant 5 minutes à 100xg (800 rpm, centrifugeuse C500, Jouan). Le surnageant (~1ml) a été prélevé et conservé à 4°C.

30 – Dosage

Le dosage des protéines a été réalisé dans du tampon de pulsation avec le kit Biorad. Une gamme étalon est réalisée en parallèle en

utilisant de la Sérum Albumine Bovine (BSA, 1mg/ml). Une solution diluée de BSA (0,1mg/ml) a servi à préparer les différentes dilutions de la gamme étalon. 800µl des solutions de la gamme étalon et des différents essais ont été additionnés à 200µl de réactif de Biorad. La lecture de la densité optique (DO) a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à 595nm. On obtient un bilan global des protéines électroextraites.

– Bilan

Les résultats sur la libération de protéines intracellulaires en fonction de l'intensité du champ électrique E (kV/cm) ont montré que pour une intensité de champ de 1,25 kV/cm, la concentration de protéines libérées est de 25 µg/ml et 50% des cellules restent viables. La viabilité est évaluée 24h après le traitement électrique par la technique de coloration au crystal violet. L'ensemencement des boîtes de culture pour quantifier la viabilité a été réalisé avec le même nombre de cellules ($\sim 0,75 \cdot 10^6$ cellules/ml). Le 100% de viabilité est exprimé par rapport à la DO obtenue à 595nm pour des cellules n'ayant subi aucun traitement électrique mais ayant été traitées en flux continu.

REVENDECATIONS

- 5 1. Procédé de production de protéines dans lequel un flux de milieu liquide comportant au moins une levure, une bactérie ou une cellule de mammifère est soumis à électropulsation, et les protéines libérées sont récupérées.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape d'électropulsation est suivie d'une étape d'incubation.
- 10 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la ou les levure(s) bactérie(s) ou cellule(s) de mammifères sont en suspension dans le milieu liquide soumis à électropulsation.
- 15 4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la concentration en levure(s) ou en bactérie(s) en suspension dans le milieu liquide est comprise entre 10^6 et 5×10^9 cellules/ml, de préférence 5×10^8 et 5×10^9 cellules/ml, et la concentration de cellules de mammifères entre 2×10^4 et 10^8 cellules/ml, de préférence entre 10^7 et 10^8 cellules/ml.
- 20 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la levure est choisie parmi les espèces susceptibles de produire des protéines hétérologues et homologues, en particulier Saccharomyces, Kluyveromyces, Pichia, Candida et Hansenula.
- 25 6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les protéines libérées sont séparées des levures, bactéries ou cellules de mammifères par filtration ou centrifugation.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'électropulsation est réalisée avec des intensités du champ d'au moins 1 kV/cm.
- 5 8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'intensité du champ est comprise entre 1 et 10 kV/cm, de préférence 1 et 5 kV/cm.
9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la durée des impulsions est supérieure à environ 0,01 ms.
- 10 10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la durée des impulsions est inférieure à 100 ms.
11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la durée des impulsions est comprise entre 0,5 et 15 ms.
12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la durée du traitement d'électropulsation est d'environ 0,01 à 100 s, de préférence 0,15 à 15 s.
- 15 13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que la fréquence des impulsions est supérieure à 0,1, de préférence à 1 Hz.
14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que la fréquence des impulsions est comprise entre 1 et 500 Hz.
- 20 15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que le nombre d'impulsions reçues par chaque cellule de levure, de bactérie ou de mammifères est de l'ordre de 1 à 100, de préférence entre 5 et 20.

16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que le nombre d'impulsions reçues par chaque cellule de levure, de bactérie ou de mammifères est de l'ordre de 10.
- 5 17. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que le milieu d'incubation comporte au moins un sel, de préférence le phosphate de potassium.
18. Procédé selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que le milieu d'extraction comporte au moins un agent préservant la stabilité des protéines extraites.
- 10 19. Procédé selon l'une des revendications 1 à 18, caractérisé en ce que le milieu d'extraction comporte au moins un agent réducteur du dithiothréitol.
20. Procédé selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisé en ce que le milieu d'électropulsation est de l'eau déionisée pour les levures et les bactéries.
- 15 21. Procédé selon l'une des revendications 1 à 20, caractérisé en ce que le profil des impulsions de champ électrique est en vagues carrées, trapézoïdales, triangulaires, sinusoïdales, sinusoïdales redressées mono et bialternance, ou à déclin exponentiel, unipolaires, bipolaires, symétriques ou asymétriques.
- 20 22. Procédé selon l'une des revendications 1 à 21, caractérisé en ce que le profil des impulsions est en vagues carrées.
23. Protéines obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications de 1 à 22.
- 25 24. Compositions comportant au moins une protéine obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 22.