



UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III

« Site Maraîchers »

**PACES UE8
«INITIATION A LA RECHERCHE »**

Année 2020-2021

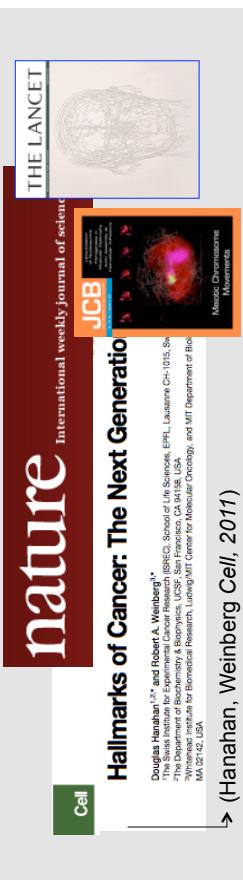


UE8 « Démarche expérimentale » 2019-2020

- Organisation des enseignements :
- 14,5 h Compléments de méthodes
 - 8 h Grandes découvertes recherche biomédicale « Histoires »
 - TD : 5 Présentiers +1 moodle en ligne
 - Forum moodle

Epreuve Concours : 15 QCMs exercices de réflexion

INITIATION A LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



- Démarche expérimentale :**
- Hypothèse ou Question posée
 - Méthodologie utilisée
 - Description des résultats
 - Interprétation des résultats

Objectif : être capable d'analyser des résultats expérimentaux

Les protéines dans les systèmes biologiques

Les protéines sont impliquées dans de nombreuses fonctions : structure cellulaire, catalyse enzymatique, transmission des signaux

UE8 « Démarche expérimentale »

Compléments de cours sur l'étude des protéines

- Introduction :** Pourquoi étudier et purifier les protéines ?
- I. Méthodes d'extraction des protéines
 - II. Méthodes de purification : Chromatographie
 - III. Protéines recombinantes
 - IV. Évaluation qualitative et quantitative des purifications
 - V. Stratégie de recherche autour des protéines

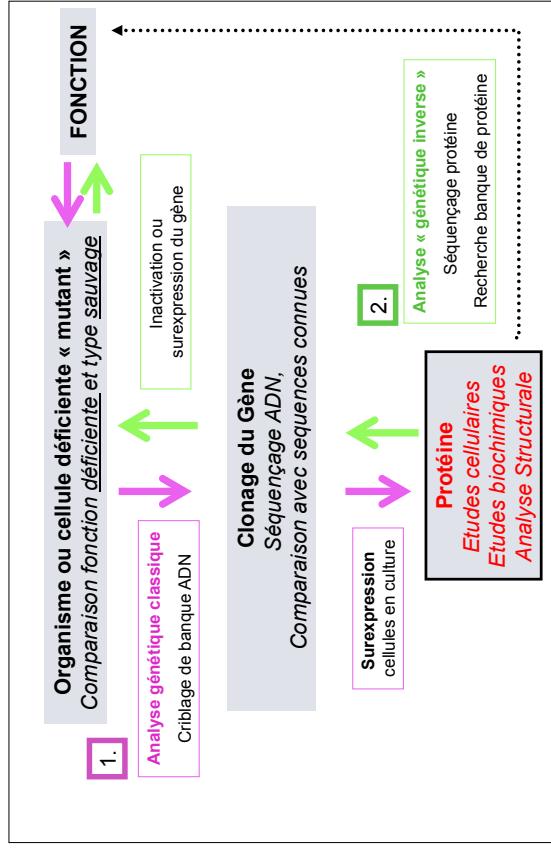
Protéine :
Fonction, Localisation, Structure, Modifications, Interactions ?



Protéine purifiée

Ingénierie moléculaire
Conception de composés pharmacologiquement actifs

Stratégie générale d'étude des fonctions cellulaires



Comment obtenir des protéines purifiées ?

- Soit par purification directe à partir d'une source biologique qui **contient naturellement la protéine** (cellules, organes, liquides biologiques, surnageant de culture)
- Soit par purification **après surexpression** de la protéine dans un système d'expression (protéines recombinantes)

---> **Mise en place de stratégie de purification**

But recherché : Obtention de la protéine sous **sa forme native**, avec un **haut degré de pureté** et un **bon rendement**

Difficulté : Propriétés physico-chimiques proches pour les protéines

Stratégie de purification des protéines

Stratégies dépendent :

- de la matière première disponible
- de la localisation de la protéine (Intra ou extra-cellulaire, membranaire)
- des propriétés physico-chimiques de la protéine d'intérêt (Masse moléculaire, point Isoélectrique (pI), Structure, Solubilité, Affinité/ligand)

La stratégie de purification sera définie en fonction des propriétés et caractéristiques de la protéine

Techniques d'extraction des protéines

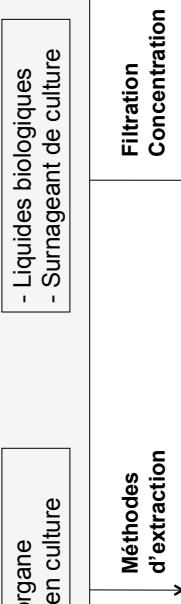
Techniques de purification : chromatographie

Analyse qualitative et quantitative des différentes étapes

I. Méthodes d'extraction des protéines

Matériel de départ :

- Tissus, organe
- Cellules en culture



Protéine d'intérêt « purifiable » → → **Protéines solubles**

I.1. Obtention des Homogénats

Mélange Tissu, Organe ou cellules avec un TAMPON DE LYSE

(sa composition dépend des propriétés physico-chimiques de la protéine)

Paramètres jouant sur la solubilité des protéines
(polarité du solvant, pH, concentration en sels)

Composition du tampon de lyse :

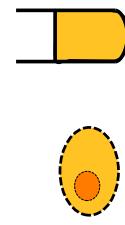
- Solution Tampon (pH=6,5 - 8)
- Sels (NaCl, MgCl₂)
- Agent anti-oxydant
- Anti-Protéases et anti-Phosphatases
- DNases
- (Déturgent)

Précautions : Conservation et travail à 4°C dans une solution qui permet de conserver la protéine sous forme soluble et native.

(! Exceptions corps d'inclusion, protéines thermostables)

Mélange Tissu, Organe ou cellules avec un TAMPON DE LYSE

«Rendre la protéine d'intérêt accessible»



+ Tampon de lyse

4°C

Méthodes physiques : Choc osmotique, Cycle Congélation/décongélation

Méthodes enzymatiques : Lysozyme

Méthodes chimiques : Détergents

Méthodes mécaniques : Mixeur, Homogénéiseur

Ultrasons, Agitation en présence de sable

OBTENTION DE L'HOLOGENAT

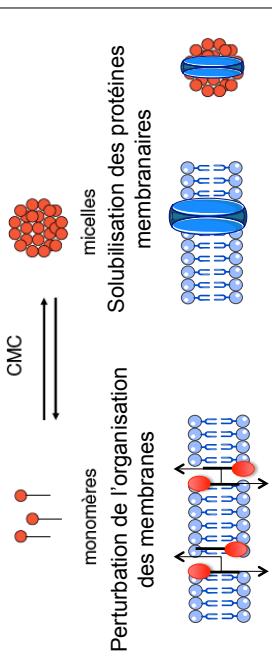
Utilisation des détergents dans les tampons de lyse

Détrangers = substances amphiphiles, utilisées pour solubiliser les membranes et/ou certaines protéines



En dessous de la CMC

Au dessus de la CMC



Ex : centrifugation



membrane Nylon/ Cellulose

FILTRATION



CENTRIFUGATION

EXTRAIT BRUT

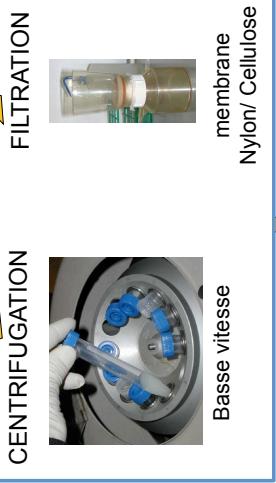
Non ioniques : Triton, Tween, Nonidet, N-octylglucopyranoside

(Détergent ionique : SDS Désoxycholate de sodium et Zwitterioniques : CHAPS)

I.2. Obtention de l'extrait brut

Ou séparation fraction soluble et fraction insoluble

HOMOGENAT



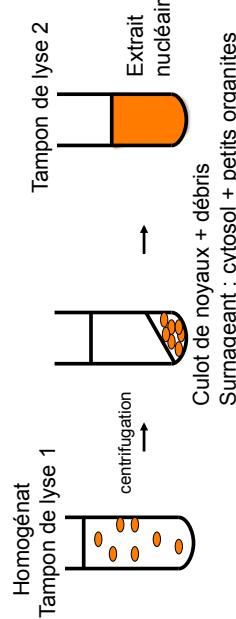
Utilisation pour études biochimiques ou purification

I.3 CAS PARTICULIER : Purification d'une protéine d'un compartiment cellulaire défini

Utilisation de la Centrifugation différentielle ou fractionnement (noyaux, mitochondries, membranes)

Ex : Purification d'une protéine nucléaire

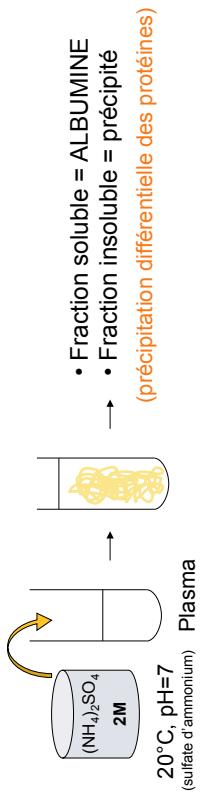
- Utilisation d'un tampon de lyse préservant l'intégrité des noyaux
- Obtention d'un homogénat à partir de cellules
- Purification des noyaux (fractionnement)
- Mélange de Noyaux dans un tampon de lyse solubilisant les noyaux
- Obtention d'un extrait nucléaire



I.3 CAS PARTICULIER : Concentration des protéines par précipitation

Ex : Purification de l'albumine plasmatique

Matériel de départ = plasma



Méthodes de précipitation :

- Précipitation acide : Acide Trichloroacétique (TCA)
- Précipitation par privation d'eau : (Sulfate d'ammonium ou Polymères hydrophiles : Dextrans, Polyéthylèneglycol)
- Précipitation iso-électrique : Minimum de solubilité au pl
- Précipitation à froid : Solubilité diminuée avec la température

II. Méthodes de purification : Chromatographie



EXTRAIT BRUT = Phase mobile
Interaction avec un support solide
Phase stationnaire
(colonne, «batch»)

Forces de rétention
Échange d'ions
Filtration sur gel
Affinité
Hydrophobe

Séparation ou fractionnement des différentes protéines contenues dans l'extrait

FRACTION PURIFIÉE

Obtention de fractions purifiées

I. MÉTHODES D'EXTRACTION

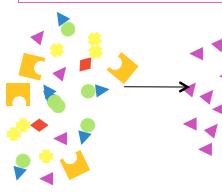
HOMOGENAT = matériel de départ remis en suspension dans le tampon de lyse

EXTRAIT BRUT = mélange de plusieurs protéines solubles

EXTRAIT PRE-PURIFIÉ = mélange dans lequel la protéine d'intérêt a été enrichie

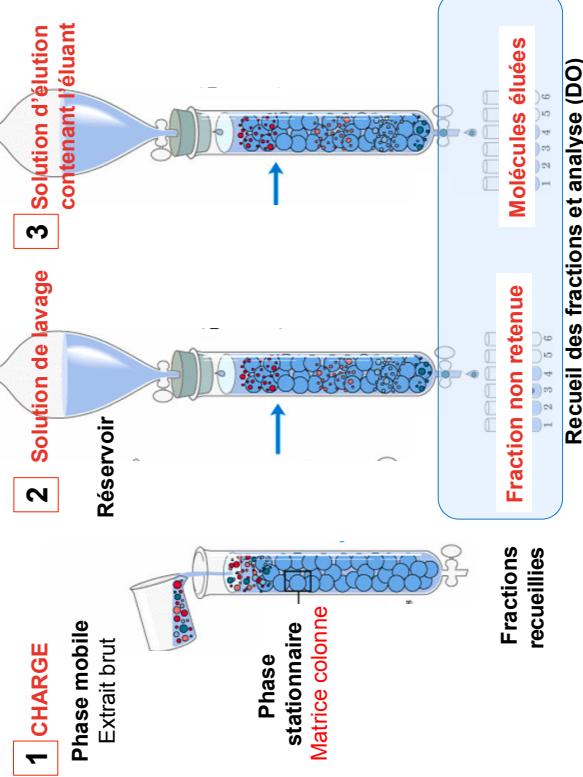
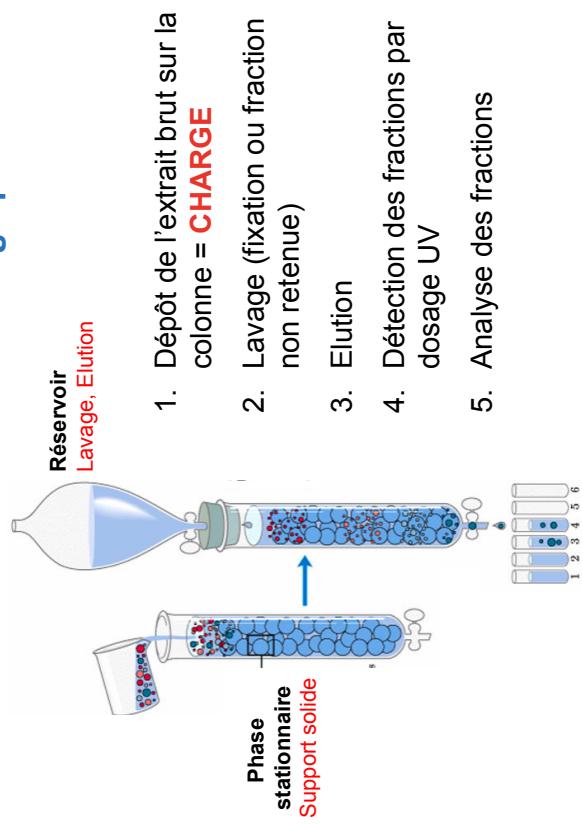
II. MÉTHODE DE PURIFICATION :

Techniques de CHROMATOGRAPHIE
(Phase MOBILE et Phase STATIONNAIRE)
appliquée aux protéines



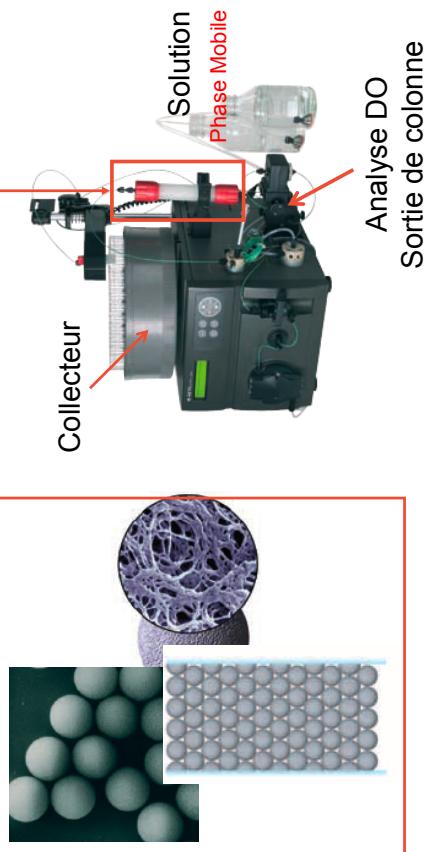
Généralités Chromatographie

Principe général Chromatographie

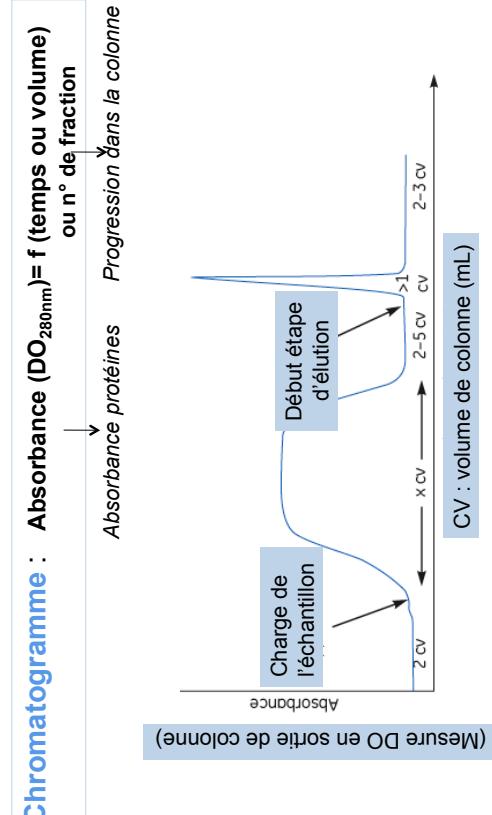


Matériel de chromatographie

Phase stationnaire : **Support solide**
Dextran, Agarose, Cellulose,
Polyacrylamide, Résines...



Suivi d'une purification par chromatographie sur colonne

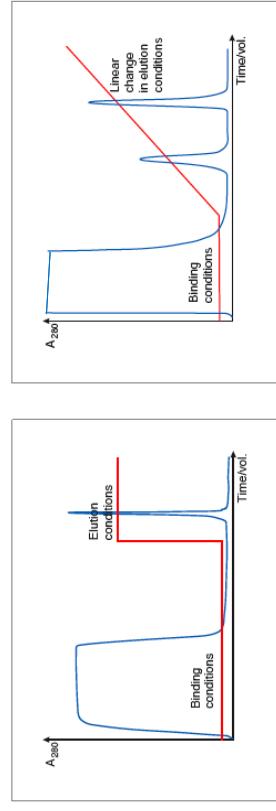


Chromatogramme : Absorbance ($\text{DO}_{280\text{nm}}$) = f (temps ou volume) ou n° de fraction

Suivi d'une purification par chromatographie sur colonne

Diagramme d'élution : % ou concentration de l'éluant = f(temps)

DO= f(temps)



Élution par palier
1 seule solution
d'élution

Élution par gradient
Modification progressive
de la concentration de la
solution d'élution

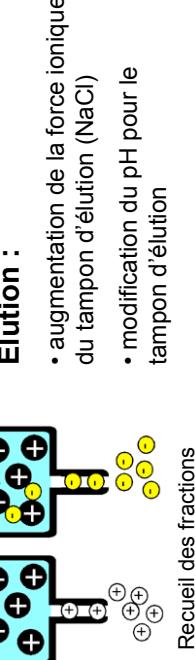
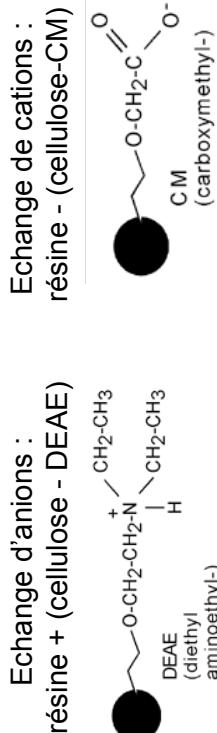
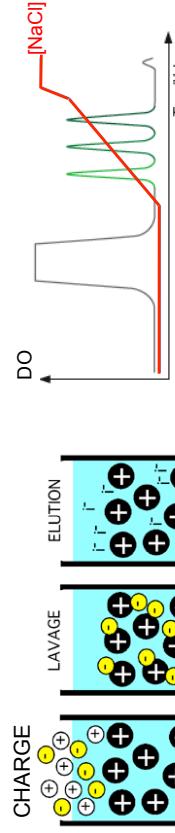
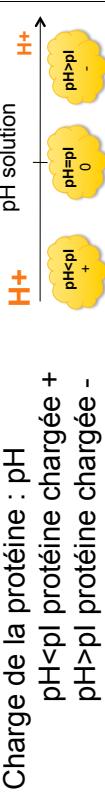
Choix de la chromatographie pour la purification des protéines

Utilisation des propriétés physicochimiques et biochimiques des protéines à purifier

Charge	Chromatographie par échange d'ions
Taille moléculaire	Chromatographie exclusion (gel filtration)
Spécificité de liaison	Chromatographie d'affinité
Caractère polaire	Chromatographie hydrophobe

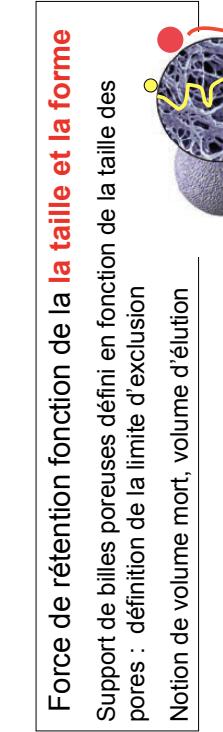
II.1.Chromatographie échangeuse d'ions

Ex : échangeuse d'anions



II.2.Chromatographie par exclusion

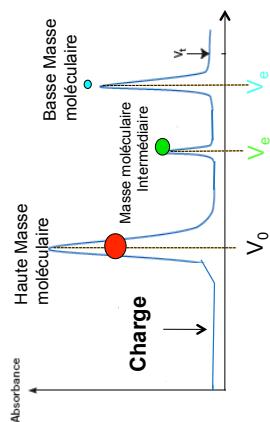
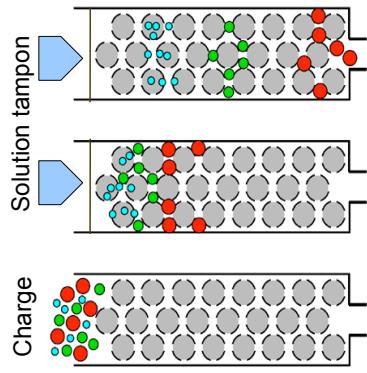
Filtration sur gel ou tamisage moléculaire



3 Applications Majeures :

- Etape de purification
- Détermination de la masse moléculaire (log masse V_e relatif)
- Désalage d'une solution

Chromatographie d'exclusion



Application chromatographie d'exclusion

Estimation de la masse moléculaire des protéines ou de complexes protéiques

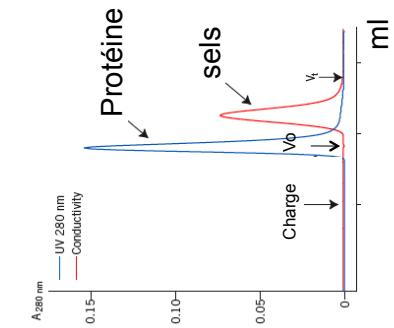
$$V_e/V_0 = f(\log \text{masse moléculaire})$$

Exemple :
 V_0 : Bleu Dextran (volume mort)
 Thyroglobuline (669 kDa)
 Ferritine (440 kDa)
 Catalase (232 kDa)
 Lactate déshydrogénase (140 kDa)
 Albumine (66 kDa)

Ve/Vo = volume d'élution relatif

► **Détermination**

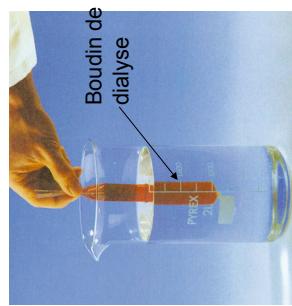
- Taille en kDa
- Monomères, Oligomères



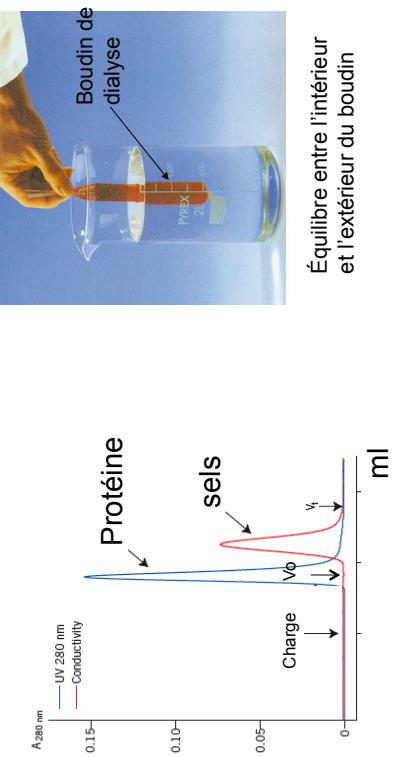
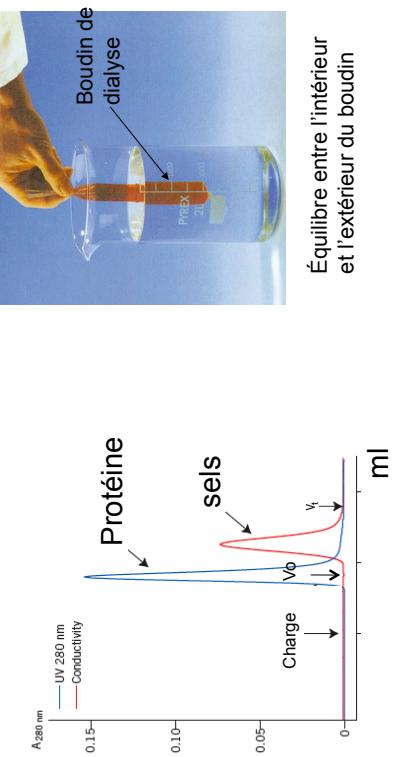
Application chromatographie d'exclusion

Techniques de désalage

Chromatographie d'exclusion



Équilibre entre l'intérieur et l'extérieur du boudin



Application chromatographie d'exclusion

Estimation de la masse moléculaire des protéines ou de complexes protéiques

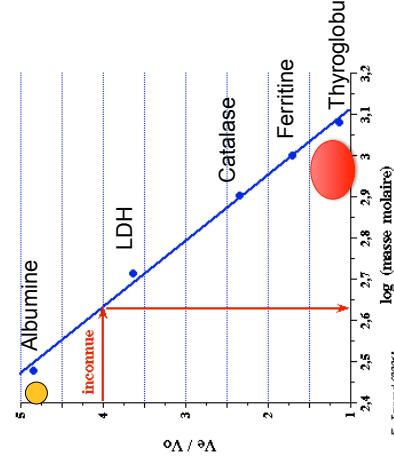
$$V_e/V_0 = f(\log \text{masse moléculaire})$$

Exemple :
 V_0 : Bleu Dextran (volume mort)
 Thyroglobuline (669 kDa)
 Ferritine (440 kDa)
 Catalase (232 kDa)
 Lactate déshydrogénase (140 kDa)
 Albumine (66 kDa)

Ve/Vo = volume d'élution relatif

► **Détermination**

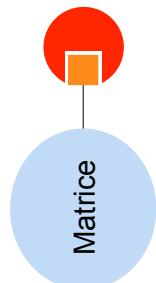
- Taille en kDa
- Monomères, Oligomères



II.3.Chromatographie d'affinité

Force de rétention : Interactions **fiables, réversibles**
Exploite les propriétés biochimiques uniques de la protéine d'intérêt

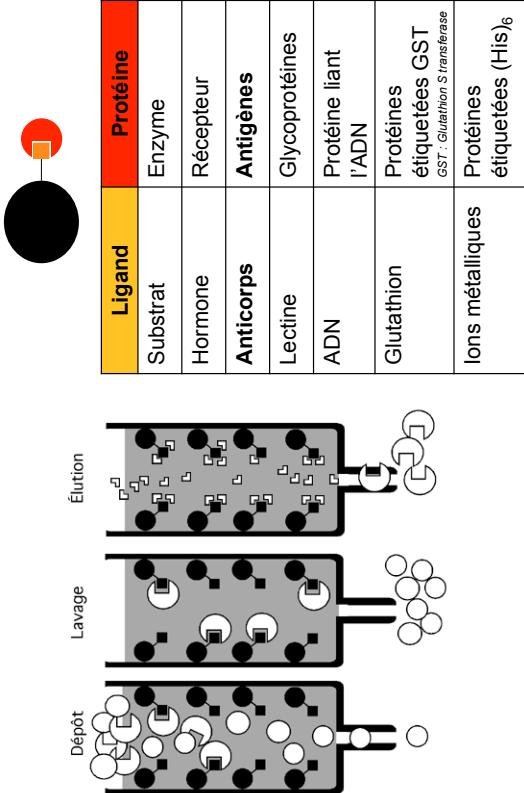
Ligand fixé sur une matrice se lie spécifiquement à **la protéine**



Interactions Ligand/protéine :
Liaison H, électrostatique, hydrophobe, Van de Waals

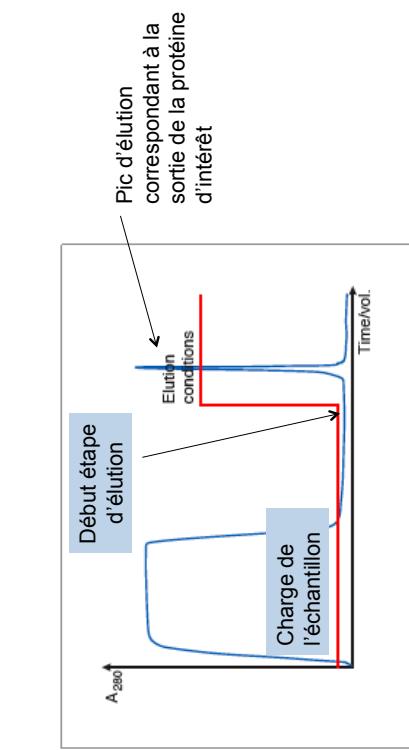
Avantage : Haute sélectivité et résolution, Concentration de la protéine sur la colonne ---> 1 seule étape !

Chromatographie d'affinité



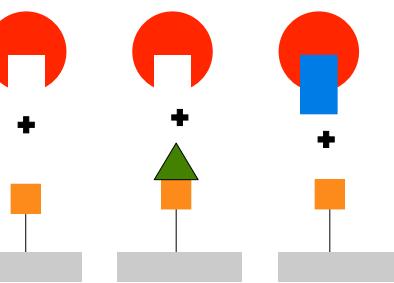
Chromatographie d'affinité : Elution

Chromatographie d'affinité : Elution



Sortie des protéines sans affinité pour le support

3 mécanismes d'élutions

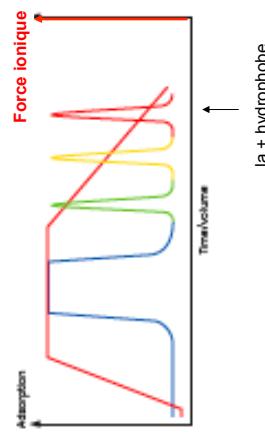
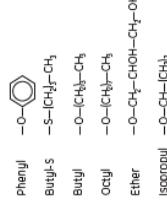


COMPETITION

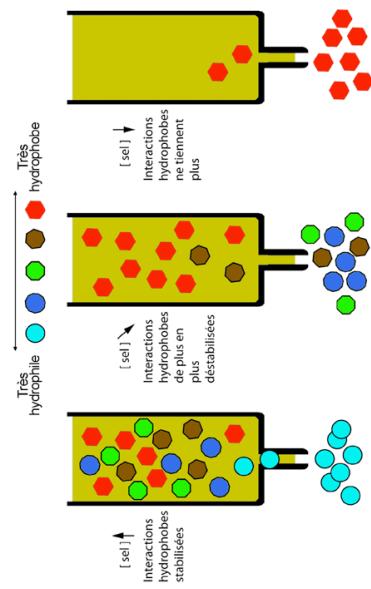
II.4. Chromatographie Hydrophobe

Force de rétention : Interactions hydrophobes
Séparation en fonction de la **Polarité des protéines**

Nature des groupes couplés à la matrice

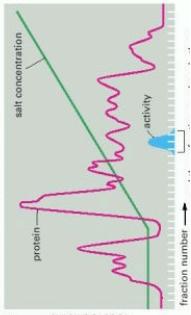


Chromatographie Hydrophobe

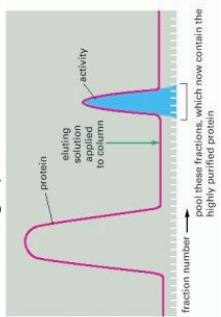


II.5 Protocoles de purification : multi-étapes

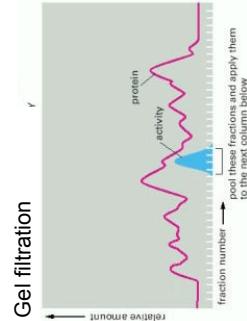
1. Echangeuse d'ions



3. Chromatographie affinité



2. Gel filtration



1 protéine = 1 protocole de purification

Suivi DO
Activité protéine d'intérêt

III. Evaluation de la quantité et de la qualité des fractions purifiées

Analyse du Chromatogramme : DO_{280nm}

Analyse quantitative sur les fractions :

- Dosage (mg de protéines) :
- Activité enzymatique (Unité spécifique)

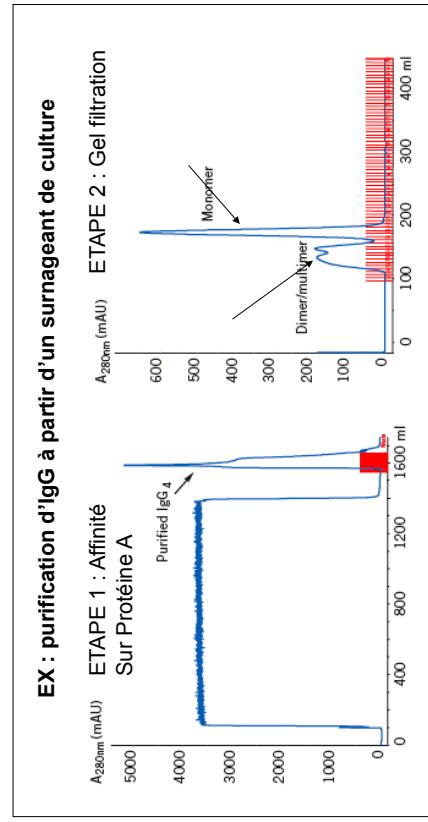
Tableau de purification

Analyse qualitative : SDS-PAGE, IEF

Techniques biophysiques

III.1. Analyse du Chromatogramme

Observation des Pics DO_{280nm} = Suivi des protéines en sortie de colonne



III.2. Analyse quantitative des fractions

Quantité dans les fractions purifiées

Dosage : détermination de la quantité de protéine

- DO 280
- Méthodes colorimétriques type Biuret, Bradford

quantité : mg/mL

Activité des protéines : protéine non dénaturée

- test enzymatique (utilisation substrat fluorescent)
- test spécifique

Unités d'activité (U)

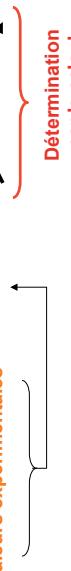
(Données utilisables et nécessaires pour établir le tableau de purification)

Tableau de purification

Ex : protéine avec une activité enzymatique mesurable

ETAPE DE PURIFICATION	Protéines totales (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg protéines)	Facteur de purification	Rendement (%)
Homogénat	600	6000	10	1	100
Etape 1	150	3750	25	2,5	62,5
Etape 2	40	2500	62,5	6,25	41,6
Etape 3	8	2000	250	25	33,3

Valeurs expérimentales



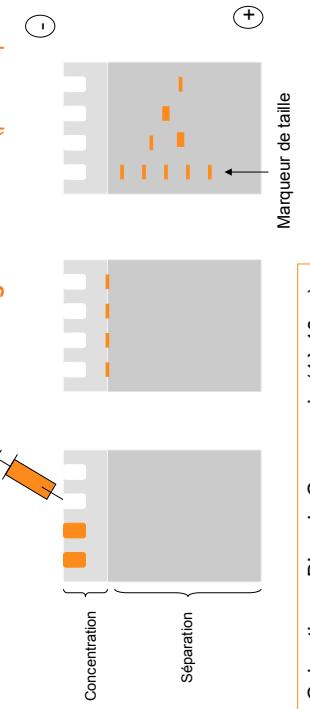
Calcul de la quantité purifiée /matériel de départ

III.3. Analyse qualitative : SDS-PAGE

PURETÉ DES fractions purifiées

Gel électrophorèse ou SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) :
Migration des protéines en fonction de leur taille/masse

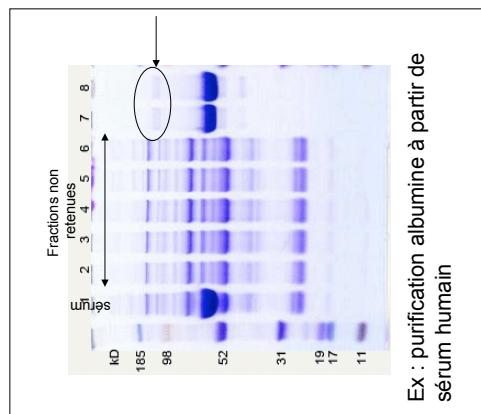
Echantillons = protéines chauffées en présence de SDS et d'un agent réducteur (β -mercaptoéthanol)



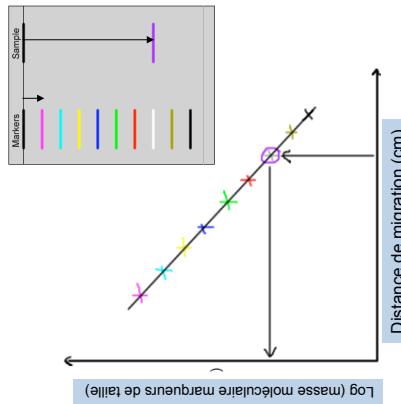
Coloration : Bleu de Coomassie (1 à 10 µg)
Nitrate d'argent (10 à 100 ng)

Ex : Gel SDS-PAGE conditions dénaturantes

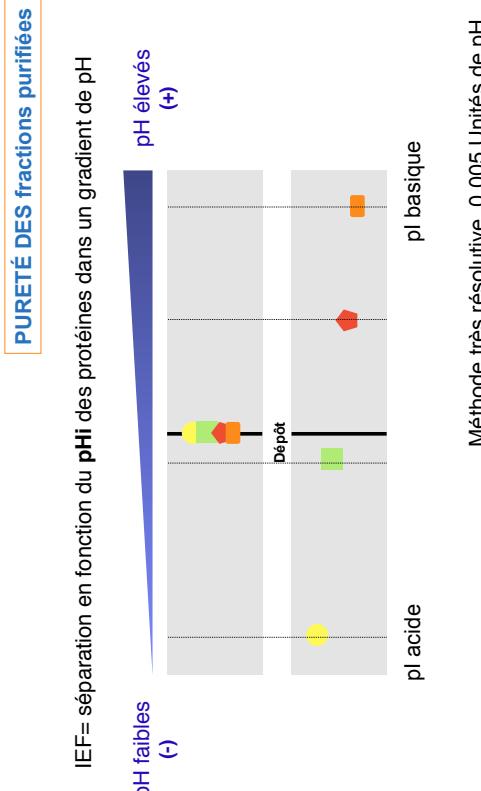
Analyse de la pureté



Détermination de la masse moléculaire



III.3. Analyse qualitative : IsoElectroFocalisation (IEF)

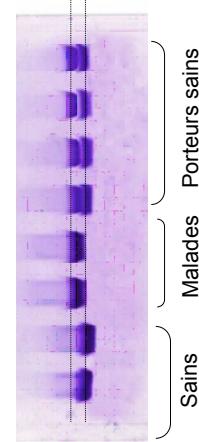


Ex: Analyse par IEF de deux formes d'hémoglobine

Mutation pathologique

β -hémoglobine **S** = E6V
Acide Glutamique \rightarrow Valine

Ex : DREPANOCYTOSE



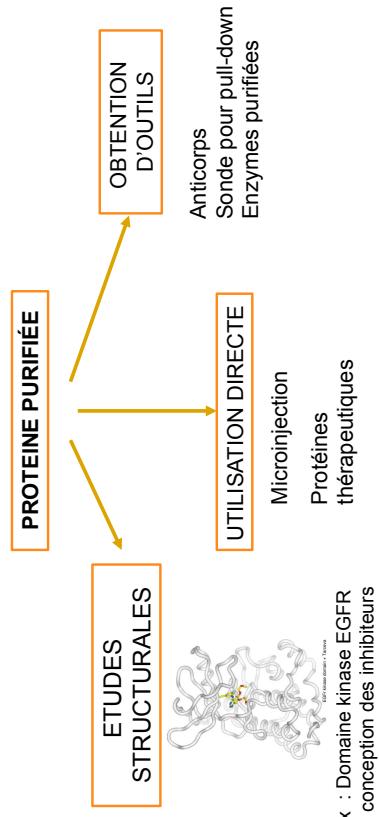
III.4. Analyse qualitative des protéines purifiées : Techniques Biophysiques

Mesure de paramètres physiques qui vont permettre en fonction des techniques de déterminer :

- Masse moléculaire
- Présence de modifications post-traductionnelles
- Le repliement de la chaîne polypeptidique
- La présence de formes oligomériques
- Analyse de la stabilité

----> Analyse des fractions purifiées ou Identification de protéines par rapport à des banques de données
(Spectrométrie de masse, RMN, dichroïsme circulaire, diffusion de la lumière)

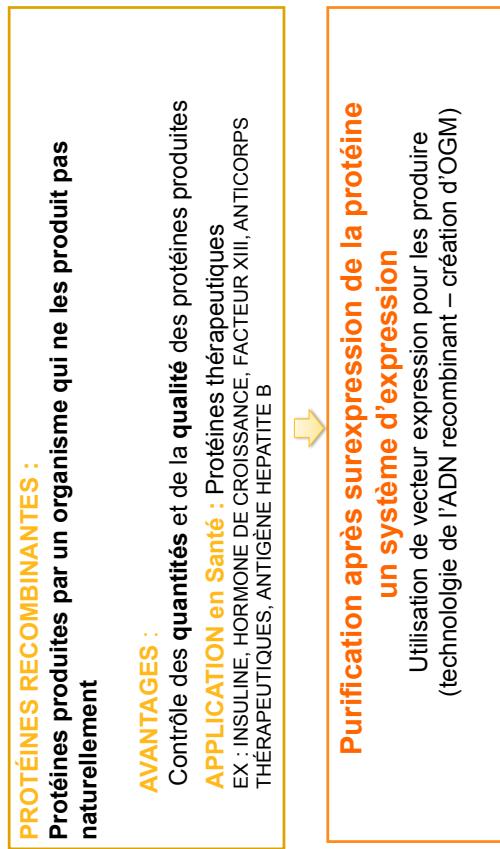
Utilisation protéine purifiée



**ETUDE BIOCHIMIQUE et CELLULAIRE
ANALYSE STRUCTURALE
INGENIERIE DES PROTEINES**

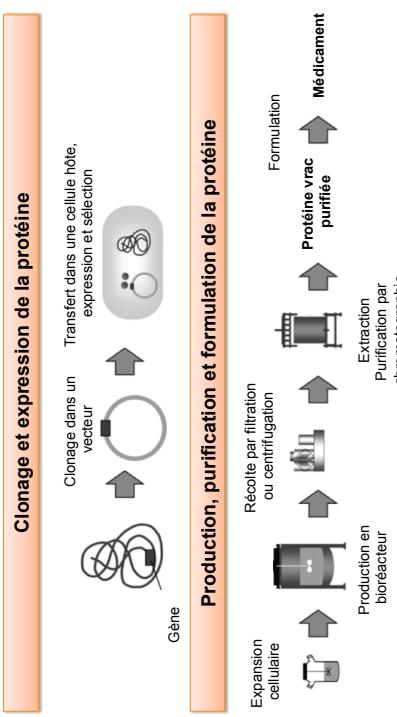


IV. Application : Production et purification de protéines recombinantes



Mise en place stratégie protéine recombinante

- 1. CHOIX DE L'HÔTE PRODUCTEUR et DU VECTEUR D'EXPRESSION**
Bactéries (*E. Coli*), Levures, Cellules mammifères, Cellules d'insecte, Cellules de plantes, Organismes transgéniques
- 2. OBTENTION DE L'ORGANISME PRODUCTEUR**
Modification génétique des organismes (OGM)
- 3. PRODUCTION DE LA PROTÉINE D'INTÉRÊT**
Conditions de production contrôlées
- 4. EXTRACTION ET PURIFICATION**
Optimisation des méthodes



IV.1.Choix de l'hôte producteur

Choix de l'hôte FONCTION PROTÉINE et des conditions de production

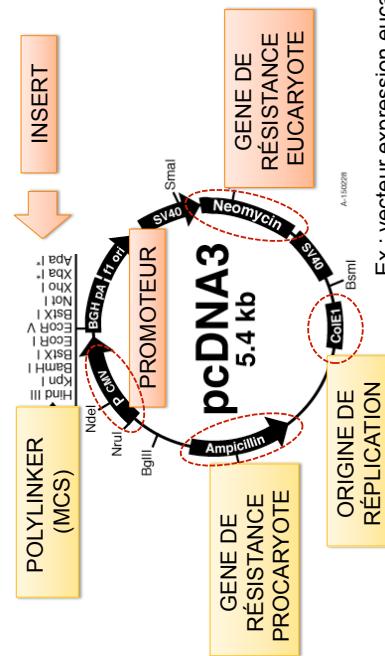
IV. 2. Obtention de l'organisme producteur



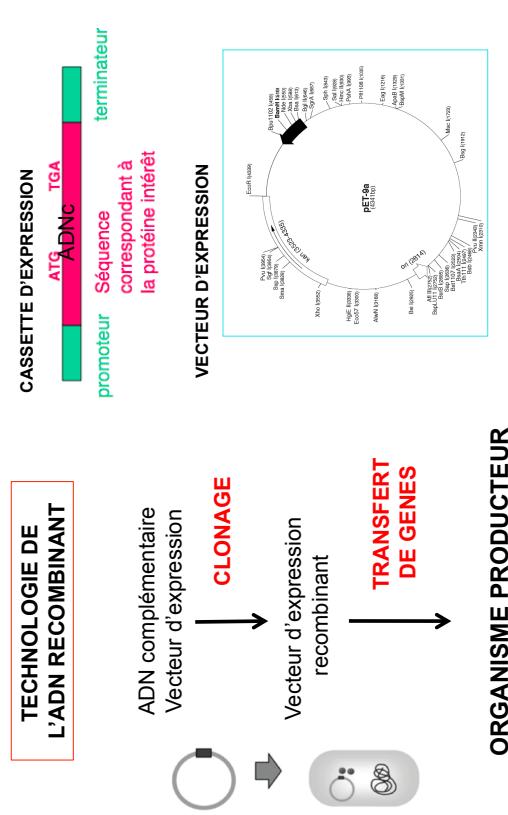
Adéquation vecteurs d'expression - Hôte producteur

Vecteur expression

- Séquences caractéristiques d'un vecteur d'expression (clonage, maintien dans l'hôte, transcription, traduction,)
 - Spécifique de l'organisme producteur (procaryote, eucaryote, cellules ou organismes transgéniques)



IV. 2. Obtention de l'organisme producteur



CF : cours B. Couderc

IV.3 .Production de la protéine recombinante

À partir de l'ORGANISME PRODUICTEUR



Beurre lait feuilles

- Séquences caractéristiques d'un vecteur d'expression (clonage, maintien dans l'hôte, transcription, traduction,)
- Spécifique de l'organisme producteur (procaryote, eucaryote, cellules ou organismes transgéniques)

A stylized illustration of a volumetric flask. The body of the flask is light blue, and the liquid inside is a vibrant orange color. The flask has a narrow neck with a slight flared opening at the top.



Culture conditions définies
(milieux, température, agitation ...)

IV. 4. EXTRACTION et PURIFICATION protéine recombinante

Extraction : méthodes classiques (cf chapitre I)
+ Optimisation des méthodes de production/purification

► Amélioration des cassettes d'expression pour la production/purification des protéines recombinantes (augmentation du rendement de purification)

3 exemples :

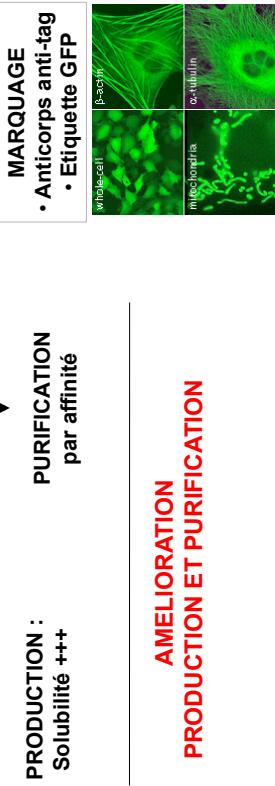
Ajout à la séquence de ADNc d'une séquence codant une étiquette ou tag

- une séquence de clivage pour éliminer l'étiquette
- une séquence d'adresse (ex : sécrétion)

! Nécessité de conserver le cadre de lecture de séquence codante
! Aux codons ATG et au TGA

Pourquoi ajouter des séquences ?

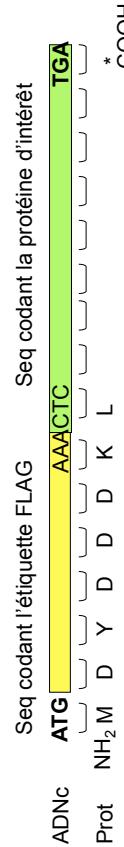
PROTÉINES ETIQUETÉES



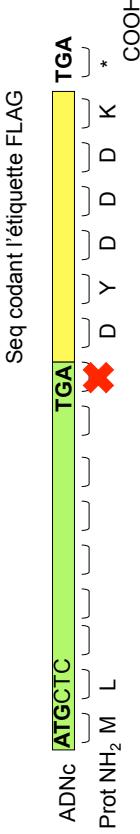
IV1. Ajout d'une étiquette



Etiquette en N-terminal de la protéine



Etiquette en C-terminal de la protéine



IV2. Ajout d'une séquence de clivage pour élimination de l'étiquette :



Coupe par PROTÉASE : ex THROMBINE

- Leu-Val-Pro-Arg/Gly-Ser

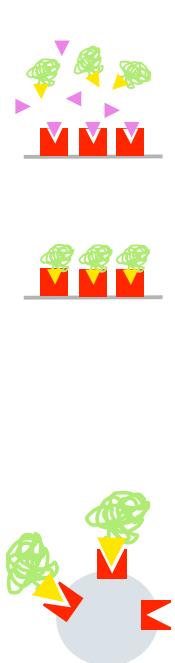
Coupe Chimique : BROMURE DE CYANOGÈNE

- méthionine (ex INSULINE recombinante)

Utilisation :

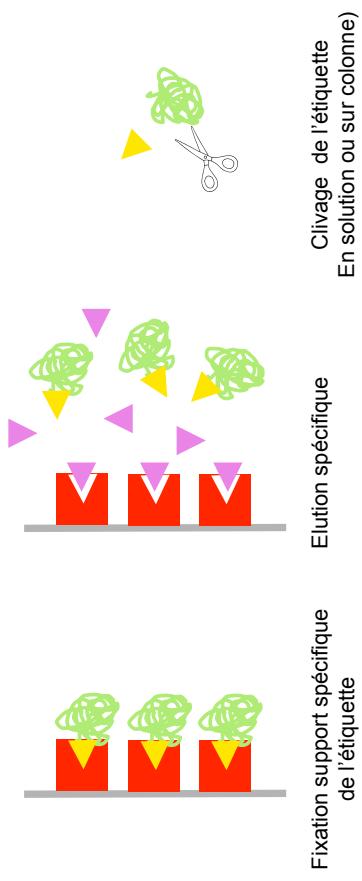
- Élimination de l'étiquette après purification
- Coupe pour élution sur colonne d'affinité

IV3. Protéines recombinantes étiquetées Purification par chromatographie d'affinité

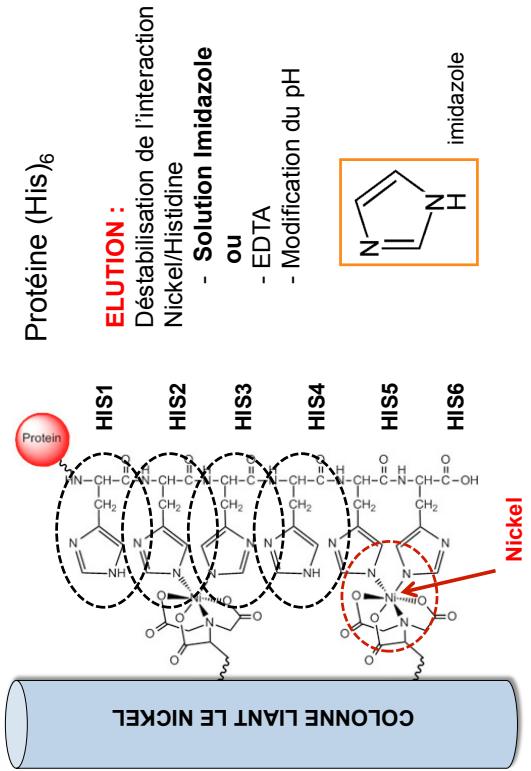


ETIQUETTES ou TAG = séquences codant pour :	SUPPORT de chromatographie recouvert de :	Elution
GST : Glutathion S-Transferase	Glutathion	Glutathion réduit
6-HIS : 6 x Histidine	Nickel, Cobalt	Imidazole
Epitopes protéiques •c-myc EEQKLISEEDL •FLAG D*DDDDK •HA YPYDVPDYA	Anticorps spécifiques	Diminution du pH

+ Clavage sur colonne

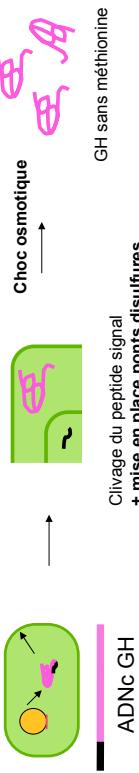


Ex : Purification protéines étiquetées Histidine

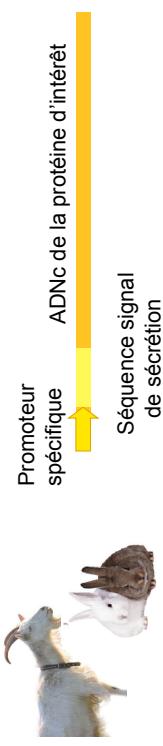


IV4. Ajout séquences d'adressage ou des séquences de sécrétion

EX 1 : Production dans le périplasme des bactéries (ex Hormone de croissance = GH avec peptide signal)



EX 2 : Production dans le lait d'animaux transgéniques (ex anti-thrombine III AttriN®)



IV5. Protéines recombinantes Médicaments

BIOMÉDICAMENTS (quantité non limitée et qualité sûre)

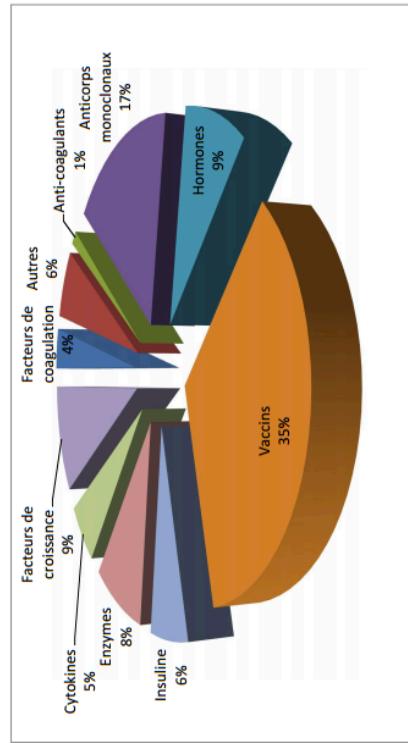


Figure 3 : Classification pharmaco-dogique des 168 biomédicaments commercialisés en France (au 31 mai 2013)



V.Stratégie de recherche autour des protéines

Quelle est sa fonction ?	Surexpression, Inhibition Modèle KO, Mutants
Est elle présente ?	Westernblotting Cytométrie
Où est elle localisée ?	Immunomarquage Fractionnement cellulaire
Est elle sécrétée ?	ELISA et méthodes associées
Quels sont ses partenaires protéiques ?	Immunoprecipitation Pull-down
Quels sont les domaines importants ?	Génie génétique (délétions, mutations)
Profil protéique présent dans une cellule ?	Electrophorèse bidimensionnelle

V.1. Etudes fonctionnelles des protéines (1) FONCTION D'UNE PROTEINE?

IN CELLO OU IN VIVO

- **Surexpression** de la protéine : **Transfection** de Vecteurs d'expression codant protéine sauve ou wt codant protéine mutée codant domaine de la protéine ou **Microinjection** des protéines purifiées

- **Inhibition** de la protéine :
 - utilisation Inhibiteurs pharmacologiques
 - utilisation d'acides nucléïques « inhibiteurs » (Oligonucléotides anti-sens, Technique ARN interférence)

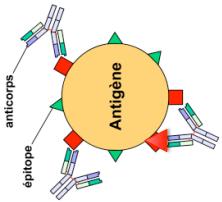
- **Modèles animaux**
 - Inactivation de gènes : modèles Knock Out (KO)

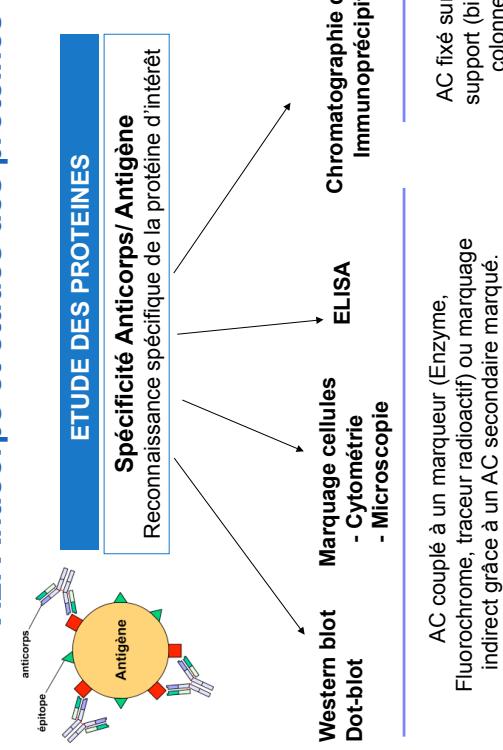
V.1. Etudes fonctionnelles des protéines (2)

IN VITRO

- Dosage activité enzymatique (ex activité kinase d'une protéine)
- Sélection de mutants (ex levures et mutants thermosensibles)
 - Construction de vecteurs d'expression procaryotes, eucaryotes
 - Modification de la séquence des protéines
 - Mutagenèse dirigée ponctuelle
 - Ajout ou retraits de séquences
- Obtention des animaux transgéniques (Knock-out, Knock-in)

V.2. Anticorps et études des protéines

PROTEINE	OUTIL : Anticorps
Est elle présente ?	- Dirigés contre la protéine d'intérêt - Polyclonaux ou Monoclonaux - Marqués ou non - Liés ou non à des supports
Où est elle localisée ?	- Détection directe ou indirecte
Est elle sécrétée ?	Cf techniques immunoanalyse B. Segui
Quelle est sa fonction ?	
Quels sont ses partenaires protéiques ?	
Quels sont les domaines importants ?	

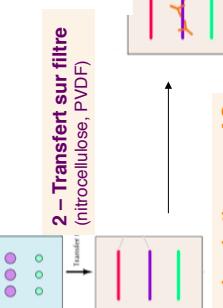


Western-blot ou Immuno-empreinte

Extrait cellulaire



1 - Electrophorèse PAGE-SDS

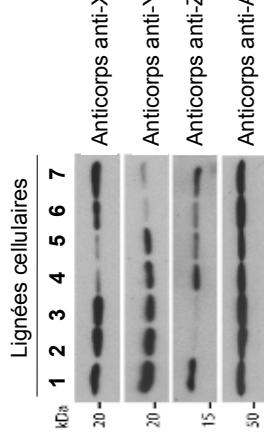


4 - Détection de l'AC par radioactivité ou marquage (luminescence)



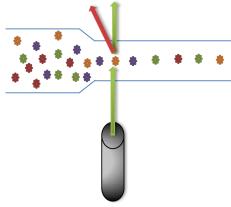
EX : Western Blot Expression des protéines X, Y, Z dans 7 lignées cellulaires

Des chercheurs comparent 7 lignées cellulaires, et veulent déterminer le profil d'expression des protéines X, Y, et Z. Pour cela, après extraction des protéines, ils ont réalisé une expérience de Western blot avec 3 anticorps dirigés contre les 3 protéines, et un anticorps reconnaissant l'actine.



Analyse par cytométrie en flux

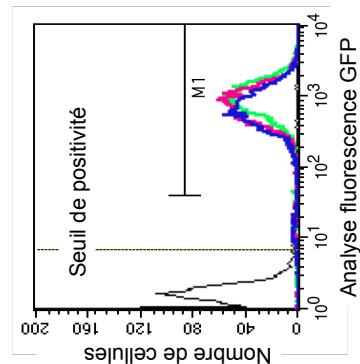
PROTEINE EST ELLE PRESENTE ?



Analyse cellule par cellule de la fluorescence d'une population cellulaire choisie

- Cellules marquées par des Anticorps fluorescents
- Cellules exprimant protéines fluorescentes (étiquette GFP)
- (+ marquages spécifiques : détermination phase du cycle cellulaire, mort cellulaire)

Analyse cellule par cellule de la fluorescence d'une population cellulaire choisie



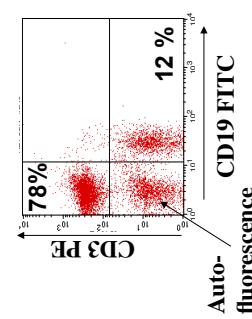
Cf Techniques UE1-UE2

EX1 : Cytométrie en flux

Des chercheurs ont transfecté des cellules avec un vecteur d'expression codant pour une protéine X étiquetée par la GFP (Green Fluorescent Protein) dans 3 lignées différentes. 48h après transfection, l'efficacité de la transfection est analysée par cytométrie en flux.

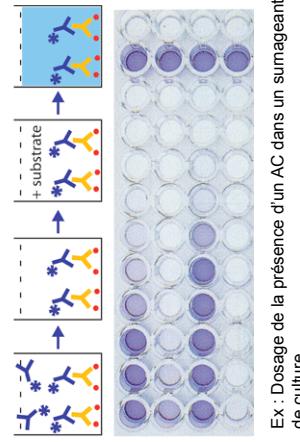
EX2 : Cytométrie en flux (analyse biparamétrique)

Afin de quantifier la proportion de lymphocytes B et T circulants, le sang total est incubé avec des anticorps anti-CD19 couplés au FITC (fluorescence verte) et des anti-CD3 couplés au PE (fluorescence rouge) permettant de marquer respectivement les lymphocytes B et les lymphocytes T. Le sang est lysé dans un tampon de lyse des GR avant d'être analysé par cytométrie.



EX3 : Analyse par ELISA (Enzyme Linked Immuno Assay)

DOSAGE SPECIFIQUE D'UNE PROTEINE

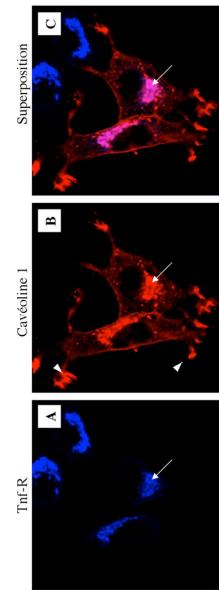


Ex : Dosage de la présence d'un AC dans un surnageant de culture

Microscopie Optique et électronique

Ex : Microscopie : expérience de Colocalisation

Des chercheurs étudient en microscopie confocale la localisation du récepteur à la transférine (TnF-R). Pour cela des cellules sont marquées par un anticorps anti-TnF-R et un anticorps dirigés contre la cavéoline, qui est localisée au niveau de la membrane plasmique et au niveau des endosomes. La localisation du TnF-R est observée à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à un « fluorochrome bleu » et la localisation de la cavéoline est observée à l'aide d'un « fluorochrome rouge »

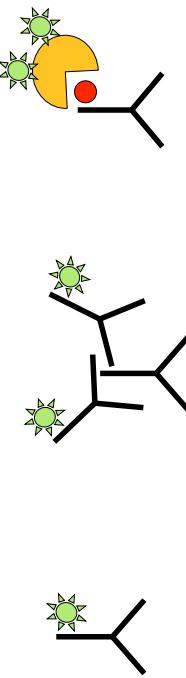


LOCALISATION D'UNE PROTÉINE ?

Analyse de cellules ou tissus

- Protéine **endogène** : Anticorps spécifiques
- Protéine surexprimée (**expression ectopique**) : Anticorps spécifiques ou utilisation de protéines étiquetées

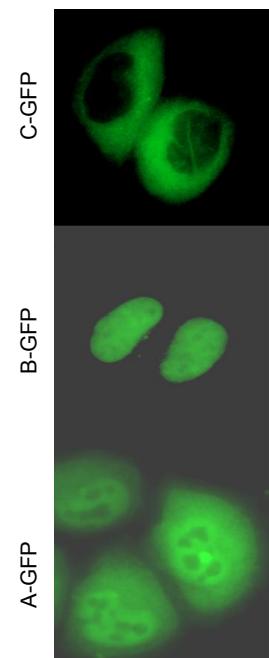
Expérience d'immuno-marquage directe ou indirecte
Expérience de colocalisation



Cf Techniques UE1-UE2

Ex : Microscopie : expérience localisation de protéines étiquetées par la GFP.

Des chercheurs étudient la localisation de 3 protéines étiquetées par la GFP. Pour cela, des cellules sont transfectées avec les vecteurs d'expression permettant d'exprimer les constructions chimères de la protéine A-GFP, B-GFP, et C-GFP. La fluorescence de la GFP est analysée par microscopie à fluorescence.

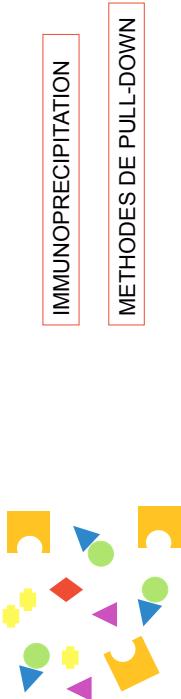


Analyse d'une protéine dans un extrait cellulaire

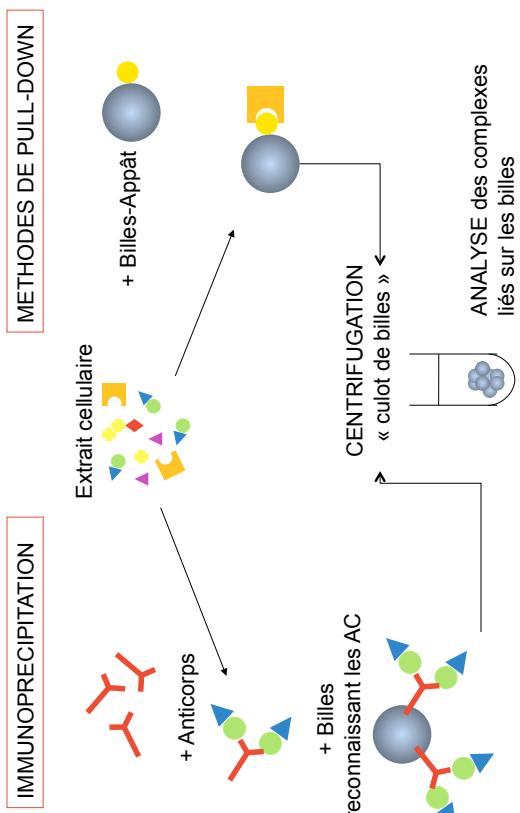
PARTENAIRES ?
ETAT D'ACTIVATION ?

Extrait cellulaire

Isoler la protéine de l'extrait pour l'analyser

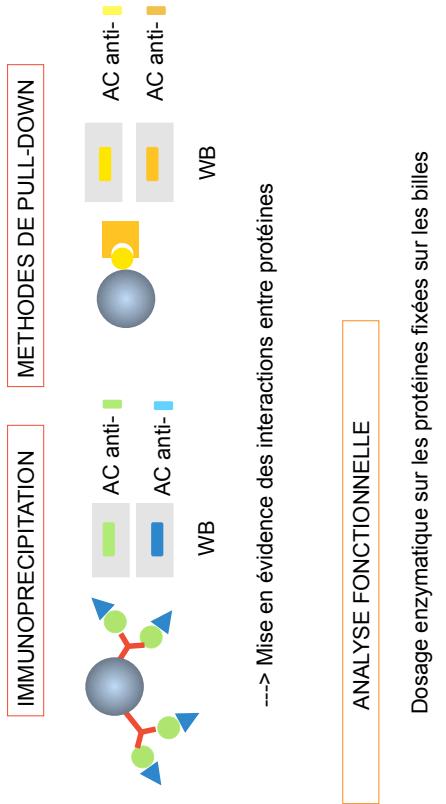


MÊME PRINCIPE QUE LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ



IMMUNOPRECIPITATION

METHODES DE PULL-DOWN



ANALYSE SDS-PAGE et WESTERN BLOT

METHODES DE PULL-DOWN

IMMUNOPRECIPITATION

DE PULL-DOWN

--> Mise en évidence des interactions entre protéines

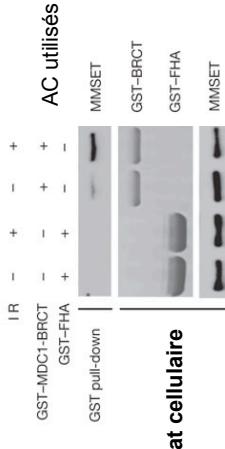
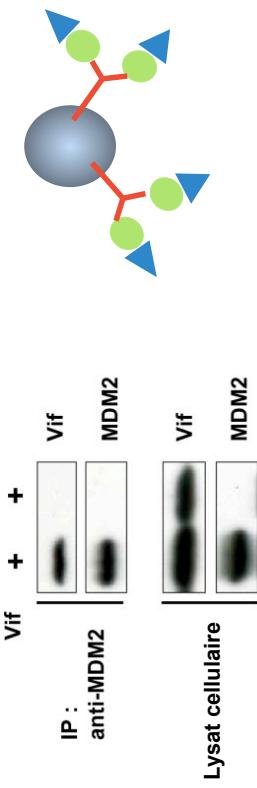
ANALYSE des complexes associés sur les billes

EX : IMMUNOPRÉCIPITATION (IP)

Afin de mettre en évidence l'interaction de la protéine Vif avec MDM2, des expériences d'immunoprecipitation ont été réalisées avec un anticorps dirigé contre MDM2 sur des extraits (ou lysat cellulaire) réalisés à partir de cellules contenant ou non la protéine MDM2. Il est à noter que ces deux types d'extraits experimentent la protéine Vif.

EX : GST-PULL DOWN

Afin d'étudier la protéine **MMSSET**, des expériences de GST-pull sont réalisées avec une construction exprimant la protéine FHA étiquetée GST (GST-FHA) et une construction contenant le domaine BRCT de MDC1 étiqueté GST (GST-MDC1-BRCT). Pour cela, les billes liant les protéines GST sont incubées avec un extrait protéique de cellules irradiées (IR+) ou non (IR-). Après lavage, les billes incubées sont traitées par une solution dénaturante contenant un agent réducteur avant d'être analysées par Western Blot par les différents anticorps donnés sur la figure.



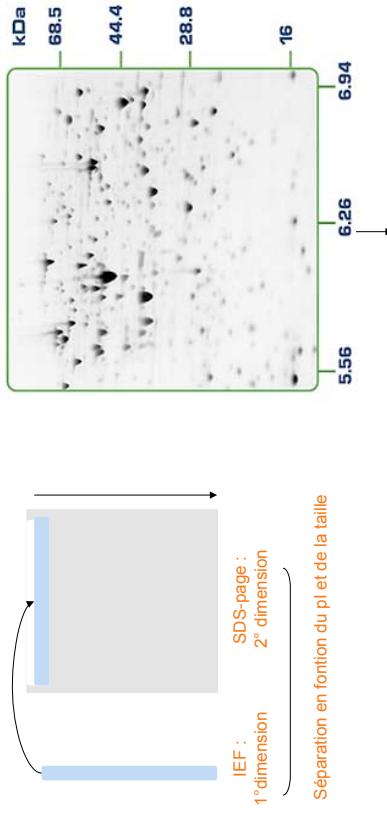
MMSET interagit avec GST-MDC1-BRCT dans des extraits cellulaires issus de cellules irradiées (IR)

V.3. Etude du PROTEOME

Profil des PROTEINES

Electrophorèse bidimensionnelle (2D)

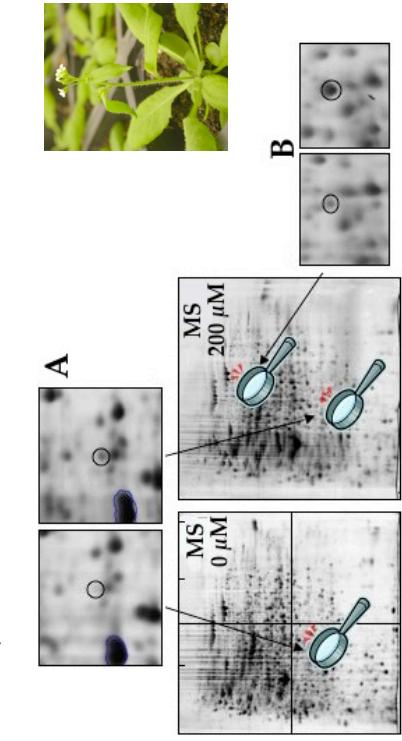
Couplage des techniques d'IEF et de SDS-Page



ANALYSE DU PROTEOME

EX : Influence du milieu de culture sur le Protéome d'Arabidopsis

Une équipe de recherche a voulu étudier l'influence de la présence de Cadmium dans le milieu de culture sur le protéome de la plante Arabidopsis. Pour cela une étude protéomique différentielle a été réalisée sur un milieu de culture MS en présence ou non de 200µM de Cadmium.



Analyse de A et de B = protéines induites par le stress métallique

De bons bagages et des tuyaux pour comprendre les démarches expérimentales



Good luck à tous !

UE8 « Démarche expérimentale » 2019-2020

- Organisation des enseignements :
- 14,5 h Compléments de méthodes
 - 8 h Grandes découvertes recherche biomédicale « Histoires »
 - TD : 5 Présentiers +1 moodle en ligne
 - Forum moodle
- Epreuve Concours : 15 QCMs exercices de réflexion

INITIATION A LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Compléments de cours sur l'étude des protéines

- Introduction : Pourquoi étudier et purifier les protéines ?**
- I. Méthodes d'extraction des protéines
 - II. Méthodes de purification : Chromatographie
 - III. Protéines recombinantes
 - IV. Evaluation qualitative et quantitative des purifications
 - V. Stratégie de recherche autour des protéines

Information scientifique : Publication scientifique
Comité d'évaluation



- Démarche expérimentale :**
- Hypothèse ou Question posée
 - Méthodologie utilisée
 - Description des résultats
 - Interprétation des résultats

Objectif : être capable d'analyser des résultats expérimentaux

Les protéines dans les systèmes biologiques

Les protéines sont impliquées dans de nombreuses fonctions :
structure cellulaire, catalyse enzymatique, transmission des signaux

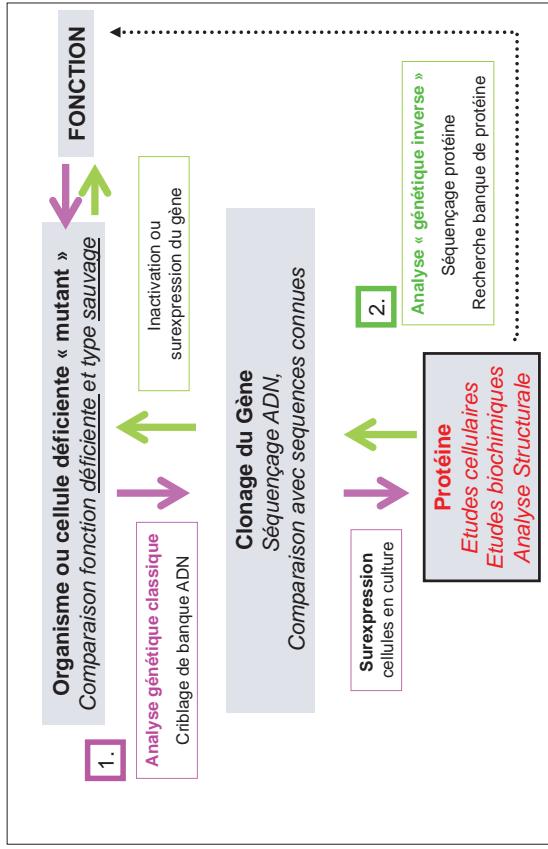
Etude du PROTÉOME

- Protéine :**
Fonction, Localisation, Structure, Modifications, Interactions ?



Ingénierie moléculaire
Conception de composés pharmacologiquement actifs

Stratégie générale d'étude des fonctions cellulaires



Comment obtenir des protéines purifiées ?

- Soit par purification directe à partir d'une source biologique qui **contient naturellement la protéine** (cellules, organes, liquides biologiques, surnageant de culture)
 - Soit par purification **après surrexpression** de la protéine dans un système d'expression (protéines recombinantes)

----> **Mise en place de stratégie de purification**

Mise en place de stratégies de purification

But recherché : Obtention de la protéine sous **sa forme native**, avec un **haut déclat de pureté** et un **bon rendement**

Difficulté : Propriétés physico-chimiques proches pour les protéines

Stratégie de purification des protéines

Statécia dôvodov

- de la matière première disponible
 - de la localisation de la protéine (Intra ou extra-cellulaire, membrane)
 - des propriétés physico-chimiques de la protéine d'intérêt (Masse moléculaire, charge, solubilité, affinité ligand)

La stratégie de purification sera définie en fonction des propriétés et caractéristiques de la protéine

Techniques d'extraction des protéines

Techniques de purification : chromatographie

Analyse qualitative et quantitative des différentes étapes

I. Méthodes d'extraction des protéines

Matériel de départ :

- Tissus, organe
 - Cellules en culture
 - Liquides biologiques
 - Surnageant de culture

Filtration Concentration

Méthodes d'extraction

Proteïne d'intérêt directement

Protéine d'intérêt « purifiable »

I.1. Obtention des Homogénats

Mélange Tissu, Organe ou cellules avec un TAMPON DE LYSE

(sa composition dépend des propriétés physico-chimiques de la protéine)

Paramètres jouant sur la solubilité des protéines
(polarité du solvant, pH, concentration en sels)

Composition du tampon de lyse :

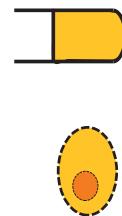
- Solution Tampon (pH=6,5 - 8)
- Sels (NaCl, MgCl₂)
- Agent anti-oxydant
- Anti-Protéases et anti-Phosphatases
- DNases
- (Déturgent)

Précautions : Conservation et travail à 4°C dans une solution qui permet de conserver la protéine sous forme soluble et native

(! Exceptions corps d'inclusion, protéines thermostables)

Mélange Tissu, Organe ou cellules avec un TAMPON DE LYSE

«Rendre la protéine d'intérêt accessible»



+ Tampon de lyse

4°C

Méthodes physiques : Choc osmotique, Cycle Congélation/décongélation

Méthodes enzymatiques : Lysozyme

Méthodes chimiques : Détergents

Méthodes mécaniques : Mixeur, Homogénéiseur

Ultrasons, Agitation en présence de sable

OBTENTION DE L'HOMOGENAT

Utilisation des détergents dans les tampons de lyse

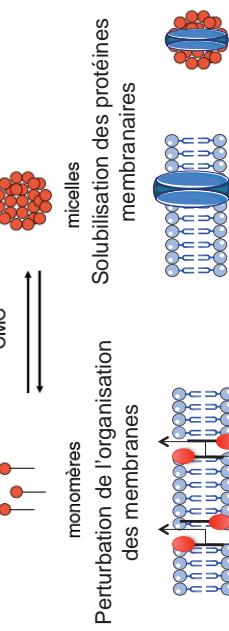
Détrangers = substances amphiphiles, utilisées pour solubiliser les membranes et/ou certaines protéines



CMC = concentration molaire critique

En dessous de la CMC

Au dessus de la CMC



Non ioniques : Triton, Tween, Nonidet, N-octylglucopyranoside
(Détergent ionique : SDS Désoxycholate de sodium et Zwitterioniques : CHAPS)

I.2. Obtention de l'extract brut

Ou séparation fraction soluble et fraction insoluble

HOMOGENAT

CENTRIFUGATION

Ex : centrifugation



Supernatant (fraction soluble ou extrait brut)
Culot (fraction insoluble, débris, cellules non lysées)

FILTRATION



membrane Nylon/ Cellulose
Basse vitesse

EXTRAIT BRUT

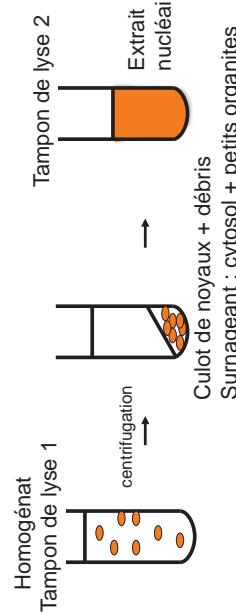
Utilisation pour études biochimiques ou purification

I.3 CAS PARTICULIER : Purification d'une protéine d'un compartiment cellulaire défini

Utilisation de la Centrifugation différentielle ou fractionnement
(noyaux, mitochondries, membranes)

Ex : Purification d'une protéine nucléaire

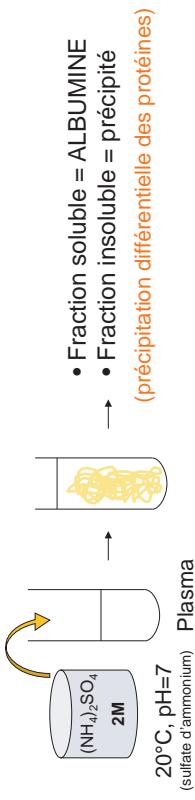
- Utilisation d'un tampon de lyse préservant l'intégrité des noyaux
- Obtention d'un homogénat à partir de cellules
- Purification des noyaux (fractionnement)
- Mélange de Noyaux dans un tampon de lyse solubilisant les noyaux
- Obtention d'un extrait nucléaire



I.3 CAS PARTICULIER : Concentration des protéines par précipitation

Ex : Purification de l'albumine plasmatique

Matériel de départ = plasma



Méthodes de précipitation :

- Précipitation acide : Acide Trichloroacétique (TCA)
- Précipitation par privation d'eau : (Sulfate d'ammonium ou Polymères hydrophiles : Dextrans, Polyéthylèneglycol)
- Précipitation iso-électrique : Minimum de solubilité au pl
- Précipitation à froid : Solubilité diminue avec la température

II. Méthodes de purification : Chromatographie



EXTRAIT BRUT = Phase mobile
Interaction avec un support solide
Phase stationnaire
(colonne, «batch»)

Forces de rétention
Échange d'ions
Filtration sur gel
Affinité
Hydrophobe

Séparation ou fractionnement des différentes protéines contenues dans l'extrait

FRACTION PURIFIÉE

Obtention de fractions purifiées

I. MÉTHODES D'EXTRACTION

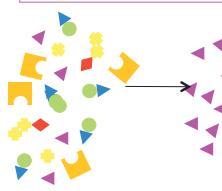
HOMOGENAT = matériel de départ remis en suspension dans le tampon de lyse

EXTRAIT BRUT = mélange de plusieurs protéines solubles

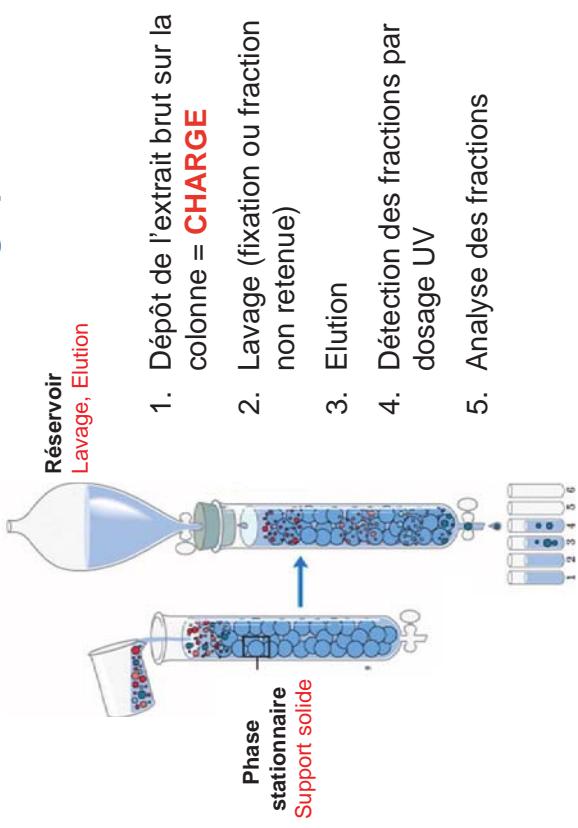
EXTRAIT PRE-PURIFIÉ = mélange dans lequel la protéine d'intérêt a été enrichie

II. MÉTHODE DE PURIFICATION :

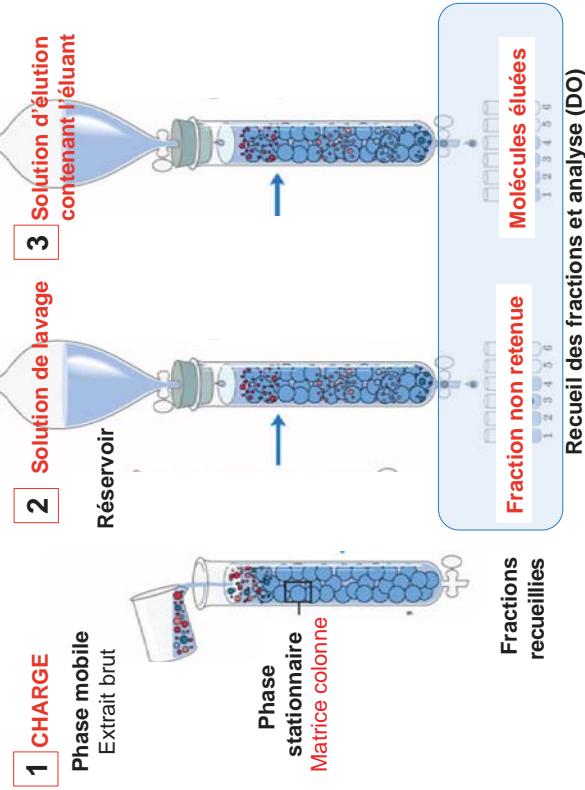
Techniques de CHROMATOGRAPHIE
(Phase MOBILE et Phase STATIONNAIRE)
appliquée aux protéines



Généralités Chromatographie

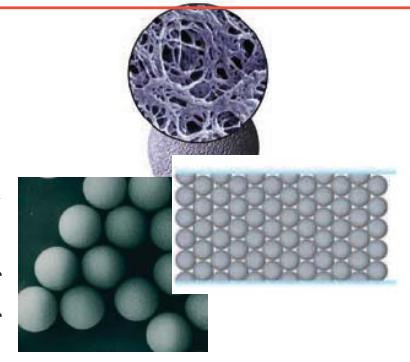


Principe général Chromatographie

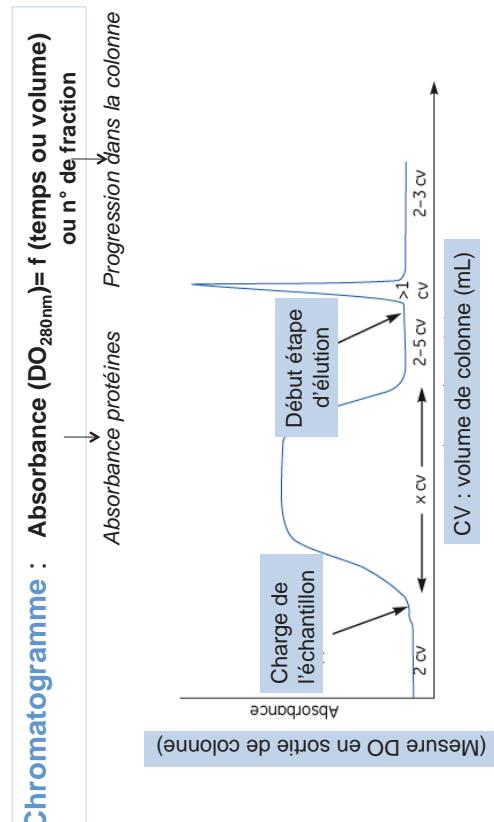


Matériel de chromatographie

Phase stationnaire : **Support solide**
Dextran, Agarose, Cellulose,
Polyacrylamide, Résines....



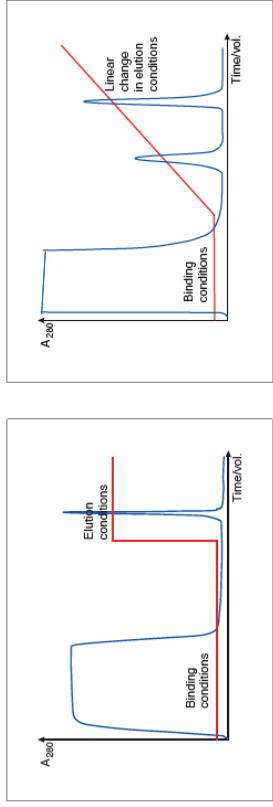
Suivi d'une purification par chromatographie sur colonne



Suivi d'une purification par chromatographie sur colonne

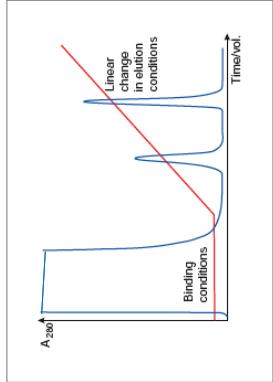
Diagramme d'élution : % ou concentration de l'éluant = f (temps)

$$DO = f(\text{temps})$$



Élution par palier
1 seule solution
d'élution

Élution par gradient
Modification progressive
de la concentration de la
solution d'élution



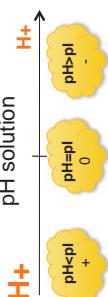
Utilisation des propriétés physicochimiques et biochimiques des protéines à purifier

Charge	Chromatographie par échange d'ions
Taille moléculaire	Chromatographie exclusion (gel filtration)
Spécificité de liaison	Chromatographie d'affinité
Caractère polaire	Chromatographie hydrophobe

Choix de la chromatographie pour la purification des protéines

II.1.Chromatographie échangeuse d'ions

Charge de la protéine : pH
 $\text{pH} < \text{pI}$ protéine chargée +
 $\text{pH} > \text{pI}$ protéine chargée -



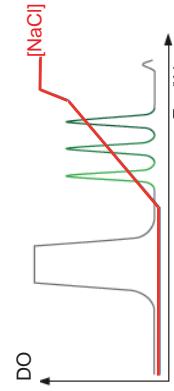
Echange de cations :
résine - (cellulose-CM)

DEAE (diethyldodecylammonium)

CM (carboxymethyl-)

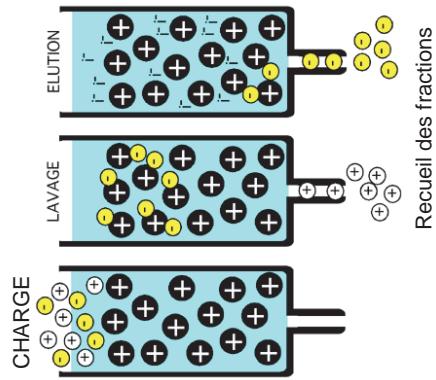
Chromatographie échangeuse d'ions

Ex : échangeuse d'anions



Élution :

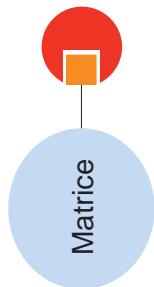
- augmentation de la force ionique du tampon d'élution (NaCl)
 - modification du pH pour le tampon d'élution



II.3. Chromatographie d'affinité

Force de rétention : Interactions **fiables, réversibles**
Exploite les propriétés biochimiques uniques de la protéine d'intérêt

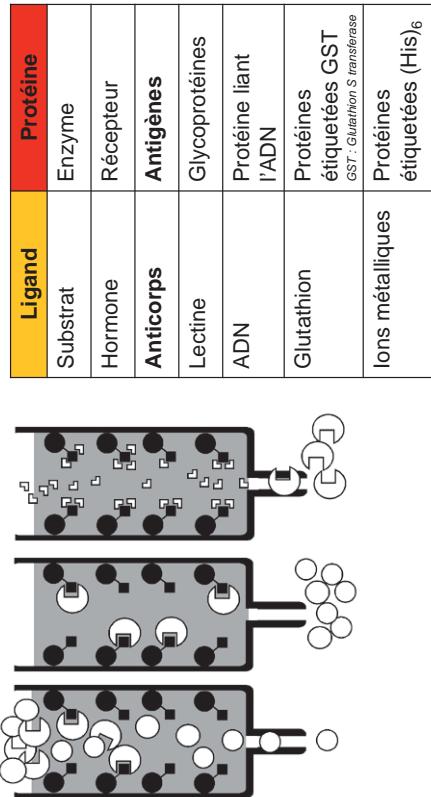
Ligand fixé sur une matrice se lie spécifiquement à **la protéine**



Interactions Ligand/protéine :
Liaison H, électrostatique, hydrophobe, Van de Waals

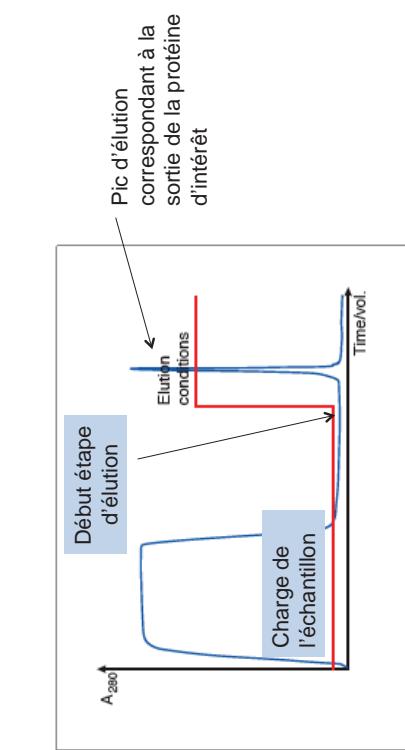
Avantage : Haute sélectivité et résolution, Concentration de la protéine sur la colonne ---> 1 seule étape !

Chromatographie d'affinité



Chromatographie d'affinité : Elution

Chromatographie d'affinité : Elution



Sortie des protéines sans affinité pour le support

3 mécanismes d'élutions

1. Modification force ionique OU pH
2. Elution avec composé qui a une plus forte affinité avec le ligand
3. Elution avec composé qui a une plus forte affinité avec la protéine

COMPETITION

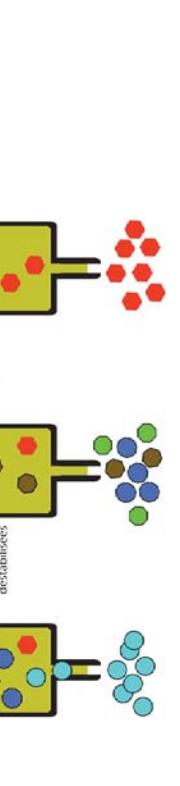
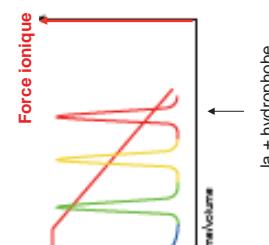
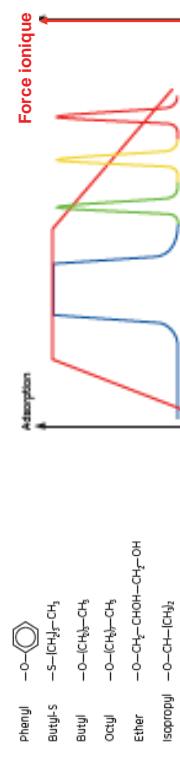
II.4. Chromatographie Hydrophobe

Chromatographie Hydrophobe

Force de rétention : **Interactions hydrophobes**
Séparation en fonction de la **Polarité des protéines**

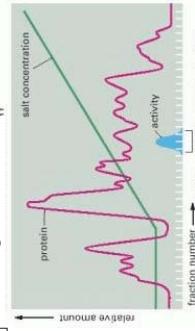
Nature des groupements couplés à la matrice

Échantillon forte concentration en sels éluition par diminution force ionique

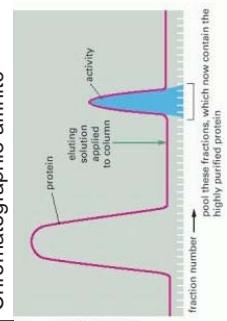


II.5 Protocoles de purification : multi-étapes

1. Echangeuse d'ions



3. Chromatographie affinité



III. Evaluation de la quantité et de la qualité des fractions purifiées

Analyse du Chromatogramme : DO_{280nm}

Analyse quantitative sur les fractions :

- Dosage (mg de protéines) :
- Activité enzymatique (Unité spécifique)

Tableau de purification

Analyse qualitative : SDS-PAGE, IEF

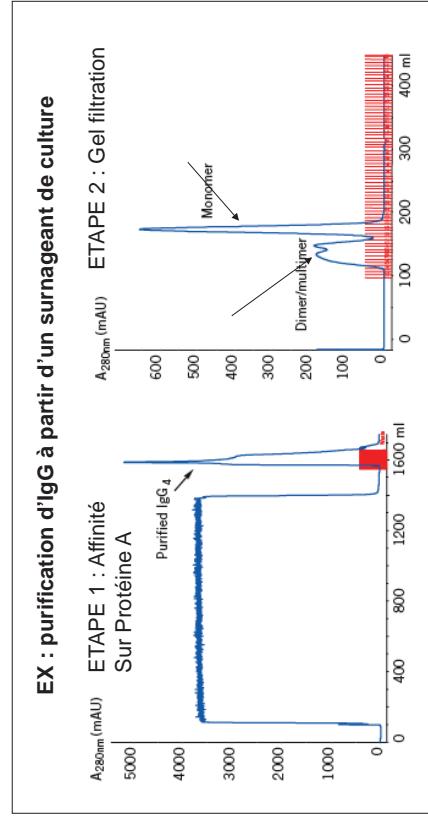
Techniques biophysiques

1 protéine = 1 protocole de purification

Suivi DO
Activité protéine d'intérêt

III.1. Analyse du Chromatogramme

Observation des Pics DO_{280nm} = Suivi des protéines en sortie de colonne



III.2. Analyse quantitative des fractions

Quantité dans les fractions purifiées

- Dosage** : détermination de la quantité de protéine
- DO 280
 - Méthodes colorimétriques type Biuret, Bradford
- quantité** : **mg/mL**

Activité des protéines : protéine non dénaturée

- test enzymatique (utilisation substrat fluorescent)
- test spécifique

Unités d'activité (U)

(Données utilisables et nécessaires pour établir le tableau de purification)

Tableau de purification

Ex : protéine avec une activité enzymatique mesurable

ETAPE DE PURIFICATION	Protéines totales (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg protéines)	Facteur de purification	Rendement (%)
Homogénat	600	6000	10	1	100
Etape 1	150	3750	25	2,5	62,5
Etape 2	40	2500	62,5	6,25	41,6
Etape 3	8	2000	250	25	33,3

Valeurs expérimentales



Calcul de la quantité purifiée /matériel de départ

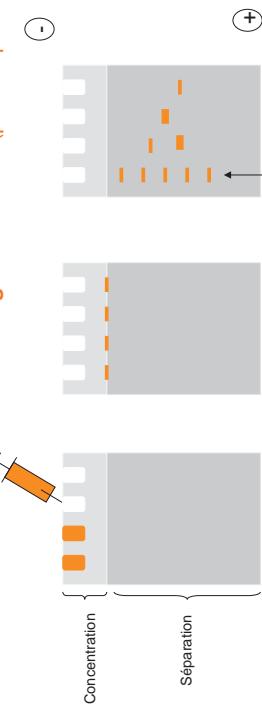
III.3. Analyse qualitative : SDS-PAGE

PURETÉ DES fractions purifiées

Gel électrophorèse ou SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) :

Migration des protéines en fonction de leur taille/masse

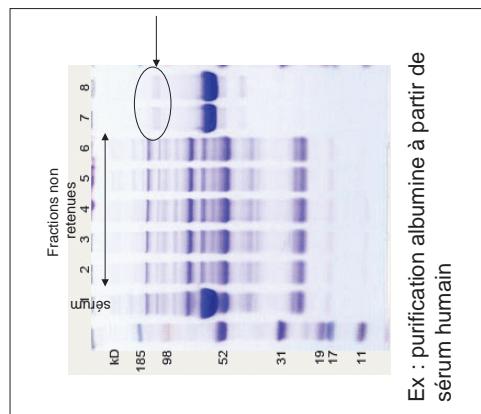
Echantillons = protéines chauffées en présence de SDS et d'un agent réducteur (β -mercaptoéthanol)



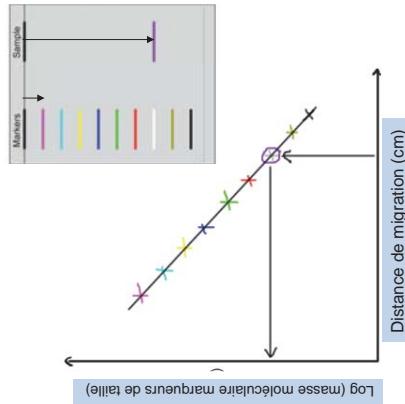
Coloration : Bleu de Coomassie (1 à 10µg)
Nitrate d'argent (10 à 100 ng)

Ex : Gel SDS-PAGE conditions dénaturantes

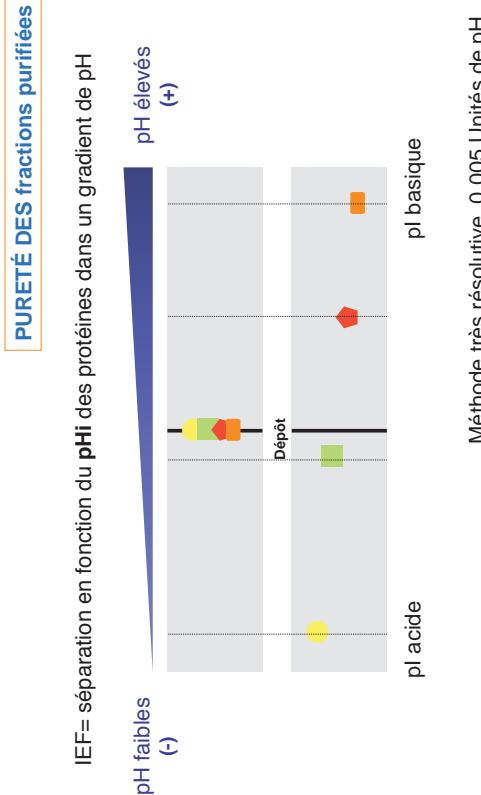
Analyse de la pureté



Détermination de la masse moléculaire



III.3. Analyse qualitative : IsoElectroFocalisation (IEF)



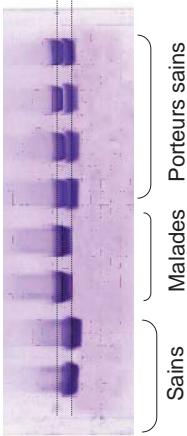
Ex: Analyse par IEF de deux formes d'hémoglobine

Mutation pathologique

β -hémoglobine **S** = E6V
Acide Glutamique--->Valine

Ex : DREPANOCYTOSE

IEF hémoglobine purifiées différents patients



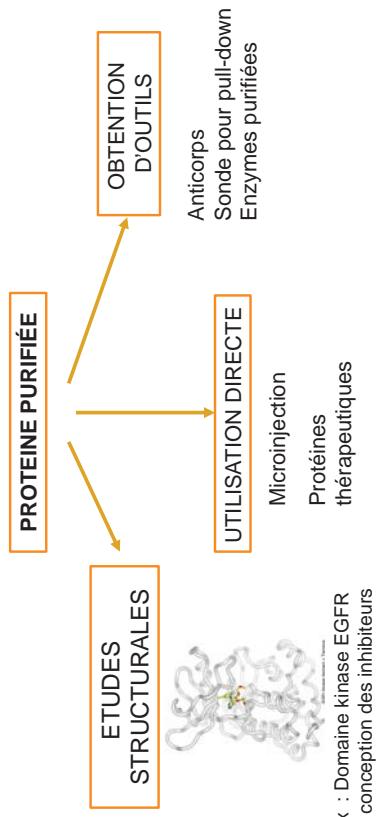
III.4. Analyse qualitative des protéines purifiées : Techniques Biophysiques

Mesure de paramètres physiques qui vont permettre en fonction des techniques de déterminer :

- Masse moléculaire
- Présence de modifications post-traductionnelles
- Le repliement de la chaîne polypeptidique
- La présence de formes oligomériques
- Analyse de la stabilité

----> Analyse des fractions purifiées ou Identification de protéines par rapport à des banques de données
(Spectrométrie de masse, RMN, dichroïsme circulaire, diffusion de la lumière)

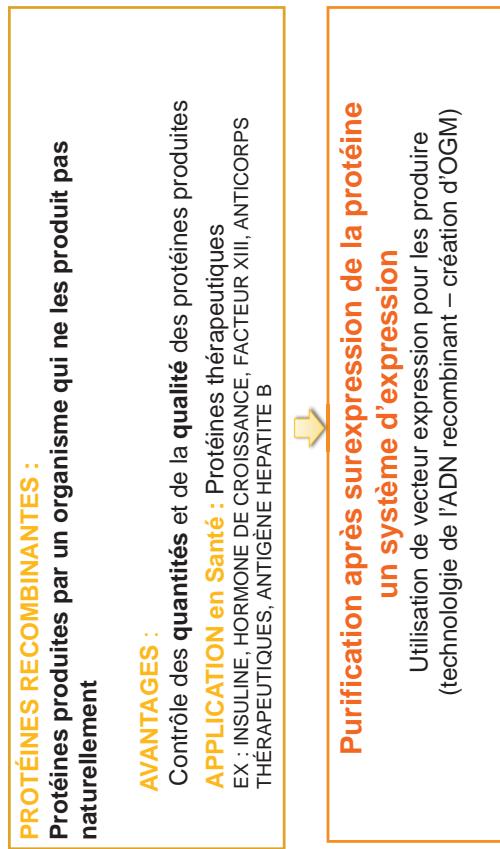
Utilisation protéine purifiée



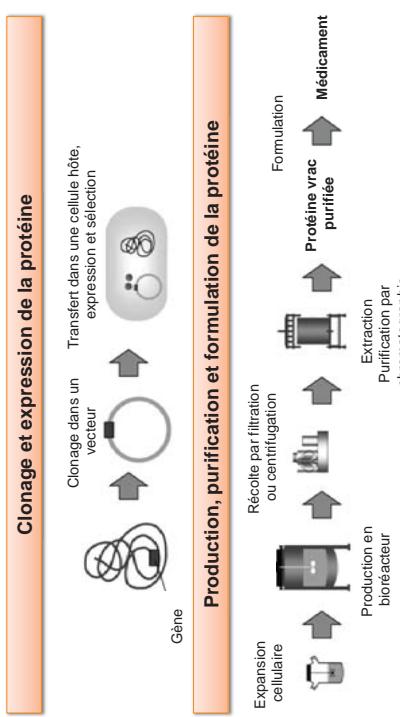
**ETUDE BIOCHIMIQUE et CELLULAIRE
ANALYSE STRUCTURALE
INGENIERIE DES PROTEINES**



IV. Application : Production et purification de protéines recombinantes



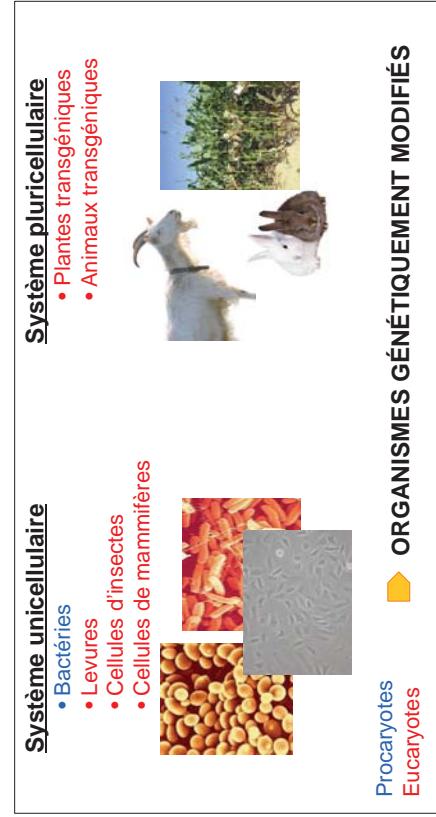
Procédé de production des médicaments biologiques



Thèse L. Argentin

IV.1.Choix de l'hôte producteur

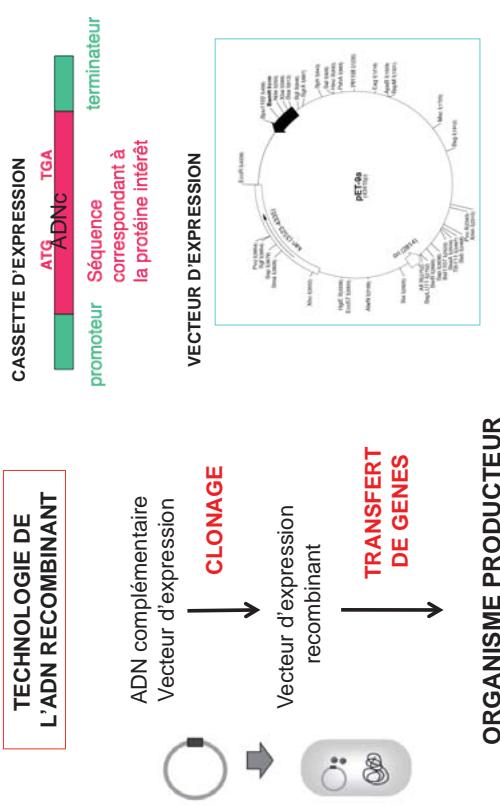
Choix de l'hôte FONCTION DE LA PROTÉINE et des conditions de production



Adéquation vecteurs d'expression - Hôte producteur

IV.2.Obtention de l'organisme producteur

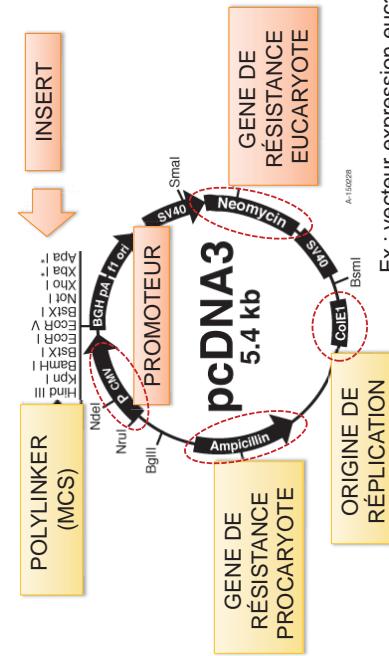
TECHNOLOGIE DE L'ADN RECOMBINANT



CF : cours B. Couderc

Vecteur expression

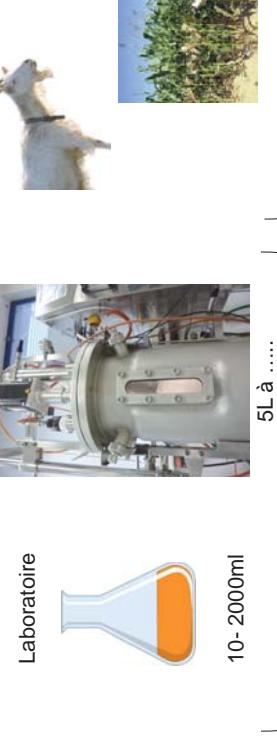
- Séquences caractéristiques d'un vecteur d'expression (clonage, maintien dans l'hôte, transcription, traduction,)
- Spécifique de l'organisme producteur (prokaryote, eucaryote, cellules ou organismes transgéniques)



IV.3 .Production de la protéine recombinante

À partir de l'ORGANISME PRODUCTEUR

Fermenteur industriel



Culture conditions définies
(milieux, température, agitation ...)

IV. 4. EXTRACTION et PURIFICATION protéine recombinante

Extraction : méthodes classiques (cf chapitre I)
+ Optimisation des méthodes de production/purification

► Amélioration des cassettes d'expression pour la production/purification des protéines recombinantes (augmentation du rendement de purification)

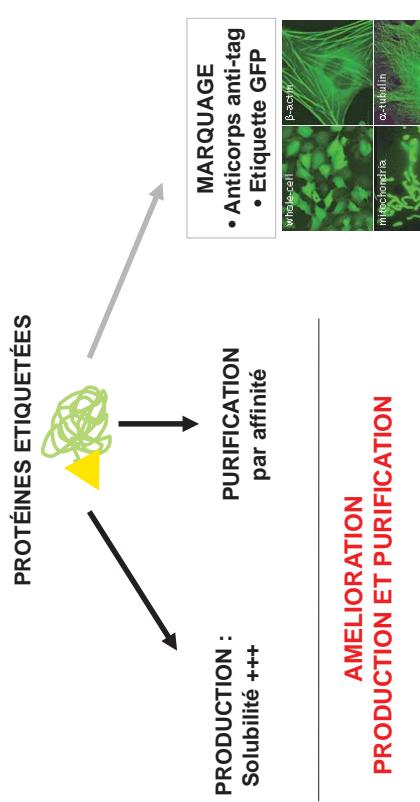
3 exemples :

Ajout à la séquence de ADNc d'une séquence codant une étiquette ou tag

- une séquence de clivage pour éliminer l'étiquette
- une séquence d'adressage (ex : sécrétion)

! Nécessité de conserver le cadre de lecture de séquence codante
! Aux codons ATG et au TGA

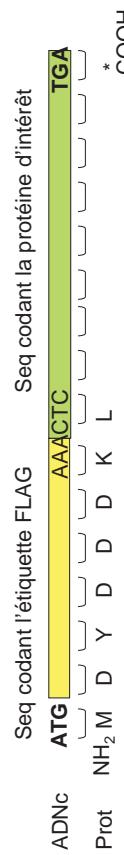
Pourquoi ajouter des séquences ?



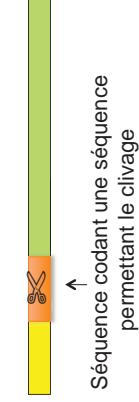
IV1. Ajout d'une étiquette



Etiquette en N-terminal de la protéine



IV2. Ajout d'une séquence de clivage pour élimination de l'étiquette :



☒ **Coupe par PROTÉASE** : ex **THROMBINE**

- Leu-Val-Pro-Arg/Gly-Ser

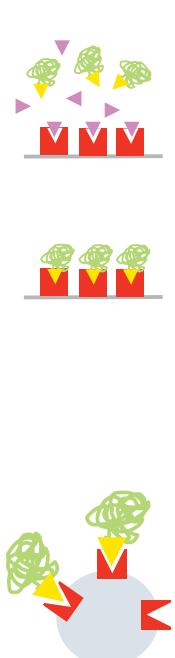
☒ **Coupe Chimique** : **BROMURE DE CYANOGENE**

- méthionine (ex INSULINE recombinante)

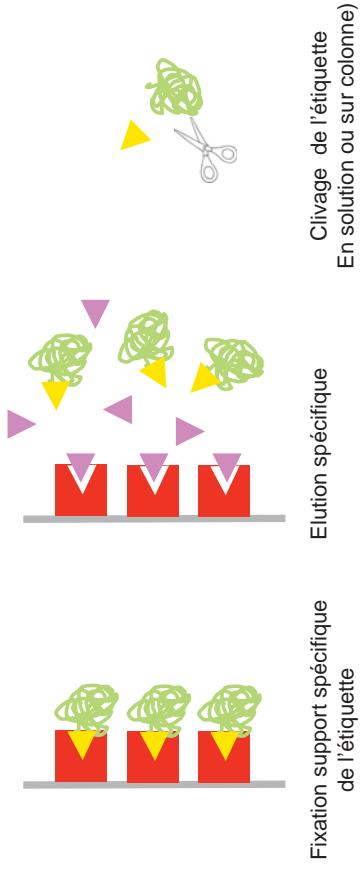


Utilisation :
- Élimination de l'étiquette après purification
- Coupe pour élution sur colonne d'affinité

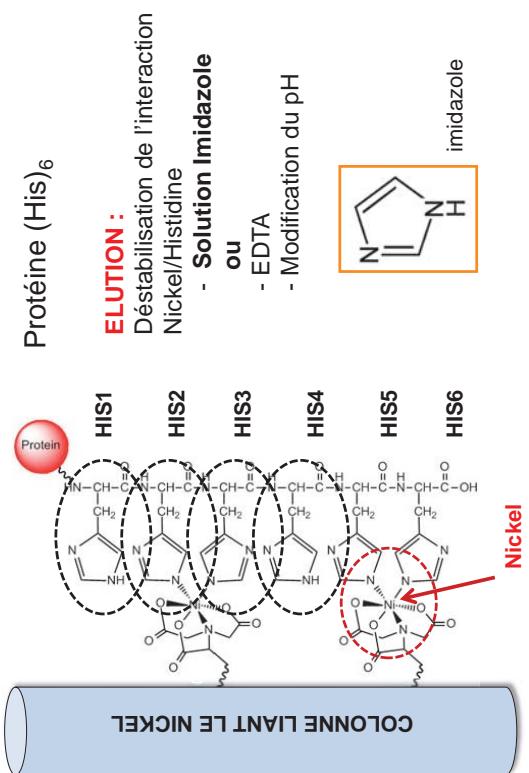
IV3. Protéines recombinantes étiquetées Purification par chromatographie d'affinité



ETIQUETTES ou TAG = séquences codant pour :	SUPPORT de chromatographie recouvert de :	Elution
GST : Glutathion S-Transferase	Glutathion	Glutathion réduit
6-HIS : 6 x Histidine	Nickel, Cobalt	Imidazole
Epitopes protéiques •c-myc EQKLISEEDL •FLAG DYDDDDK •HA YPYDVYDVA	Anticorps spécifiques	Diminution du pH
		+ Clivage sur colonne

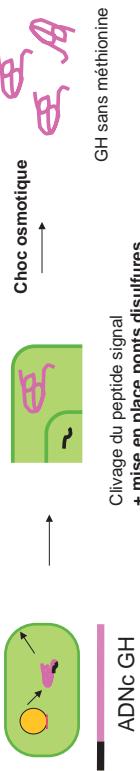


Ex : Purification protéines étiquetées Histidine

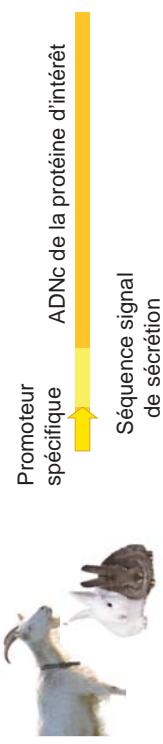


IV4. Ajout séquences d'adressage ou des séquences de sécrétion

EX 1 : Production dans le périplasme des bactéries (ex Hormone de croissance = GH avec peptide signal)



EX 2 : Production dans le lait d'animaux transgéniques (ex anti-thrombine III Attrin®)



IV5. Protéines recombinantes Médicaments

BIOMÉDICAMENTS (quantité non limitée et qualité sûre)

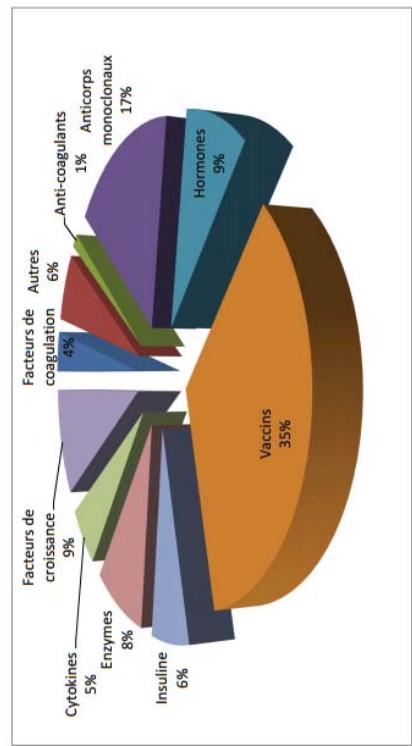


Figure 3 : Classification pharmaceutique des 168 biomédicaments commercialisés en France (au 31 mai 2013)



V.Stratégie de recherche autour des protéines

Quelle est sa fonction ?	Surexpression, Inhibition Modèle KO, Mutants
Est elle présente ?	Westernblotting Cytométrie
Où est elle localisée ?	Immunomarquage Fractionnement cellulaire
Est elle sécrétée ?	ELISA et méthodes associées
Quels sont ses partenaires protéiques ?	Immunoprecipitation Pull-down
Quels sont les domaines importants ?	Génie génétique (délétions, mutations)
Profil protéique présent dans une cellule ?	Electrophorèse bidimensionnelle

V.1. Etudes fonctionnelles des protéines (1)

FONCTION D'UNE PROTEINE?

IN CELLULO ou IN VIVO

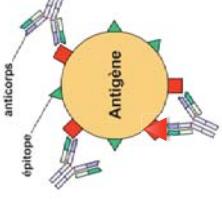
- **Surexpression** de la protéine : **Transfection** de Vecteurs d'expression codant protéine sauve ou wt codant protéine mutée codant domaine de la protéine ou **Microinjection** des protéines purifiées
- **Inhibition** de la protéine : utilisation Inhibiteurs pharmacologiques utilisation d'acides nucléiques « inhibiteurs » (Oligonucléotides anti-sens, Technique ARN interférence)
- **Modèles animaux** Inactivation de gènes : modèles Knock Out (KO)

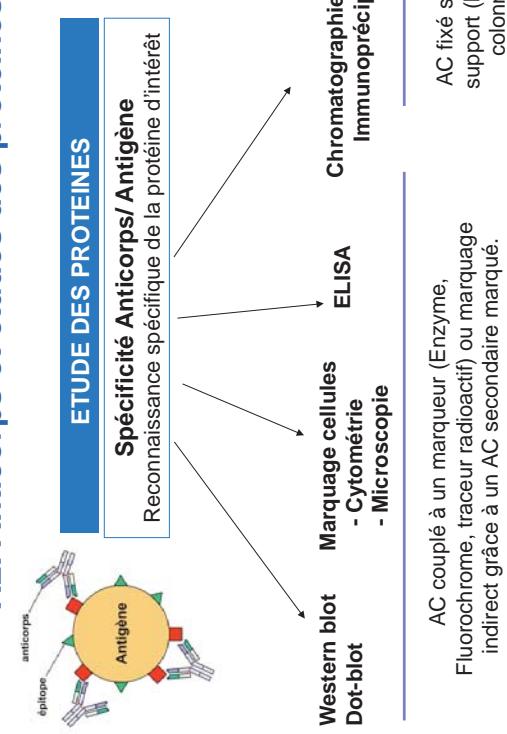
V.1. Etudes fonctionnelles des protéines (2)

IN VITRO

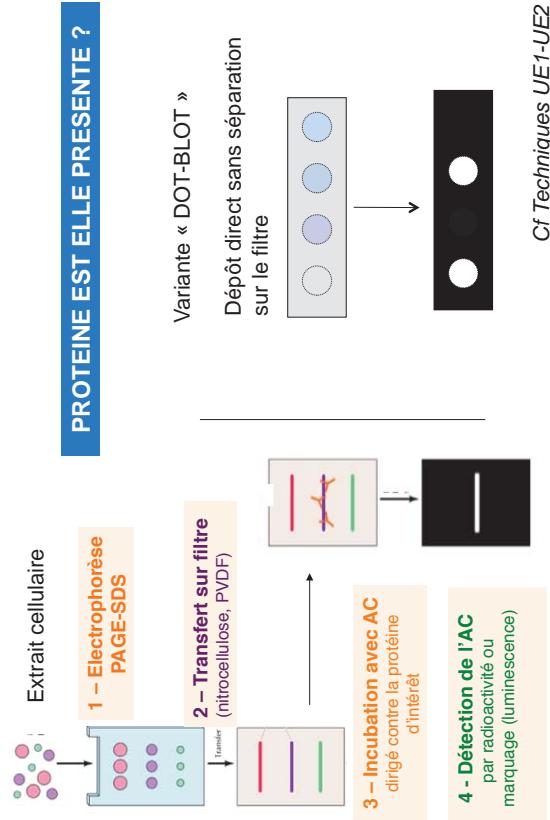
- Dosage activité enzymatique (ex activité kinase d'une protéine)
- Sélection de mutants (ex levures et mutants thermosensibles)
 - Construction de vecteurs d'expression procaryotes, eucaryotes Modification de la séquence des protéines
 - Mutagenèse dirigée ponctuelle
 - Ajout ou retraits de séquences
 - Obtention des animaux transgéniques (Knock-out, Knock-in)

V.2. Anticorps et études des protéines

PROTEINE	OUTIL : Anticorps
Est elle présente ?	- Dirigés contre la protéine d'intérêt - Polyclonaux ou Monoclonaux - Marqués ou non - Liés ou non à des supports
Où est elle localisée ?	- Détection directe ou indirecte
Est elle sécrétée ?	Cf techniques immunoanalyse B. Segui
Quelle est sa fonction ?	
Quels sont ses partenaires protéiques ?	
Quels sont les domaines importants ?	

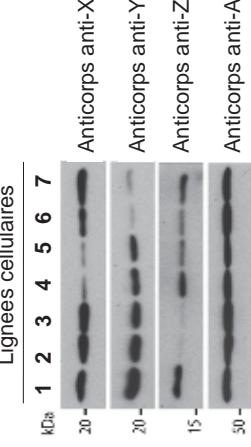


Western-blot ou Immuno-empreinte



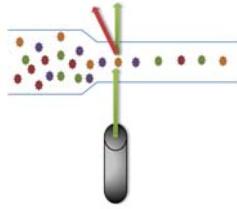
EX : Western Blot Expression des protéines X, Y, Z dans 7 lignées cellulaires

Des chercheurs comparent 7 lignées cellulaires, et veulent déterminer le profil d'expression des protéines X, Y, et Z. Pour cela, après extraction des protéines, ils ont réalisé une expérience de Western blot avec 3 anticorps dirigés contre les 3 protéines, et un anticorps reconnaissant l'actine.



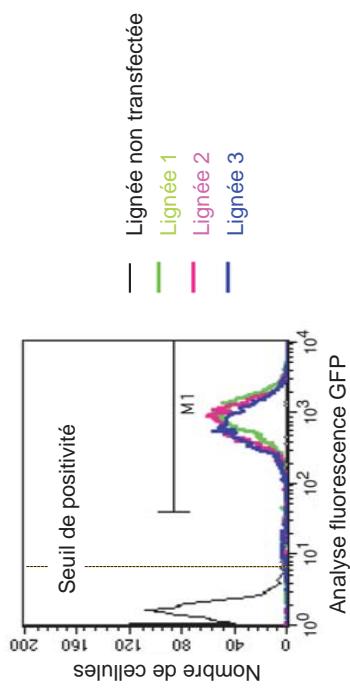
Analyse par cytométrie en flux

PROTEINE EST ELLE PRESENTE ?



Analyse cellule par cellule de la fluorescence d'une population cellulaire choisie

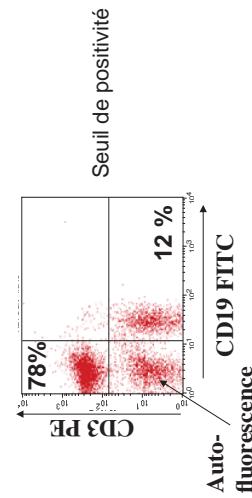
- Cellules marquées par des Anticorps fluorescents
- Cellules exprimant protéines fluorescentes (étiquette GFP)
- (+ marquages spécifiques : détermination phase du cycle cellulaire, mort cellulaire)



Cf Techniques UE1-UE2

EX2 : Cytométrie en flux (analyse biparamétrique)

Afin de quantifier la proportion de lymphocytes B et T circulants, le sang total est incubé avec des anticorps anti-CD19 couplés au FITC (fluorescence verte) et des anti-CD3 couplés au PE (fluorescence rouge) permettant de marquer respectivement les lymphocytes B et les lymphocytes T. Le sang est lysé dans un tampon de lyse des GR ayant d'être analysé par cytométrie.

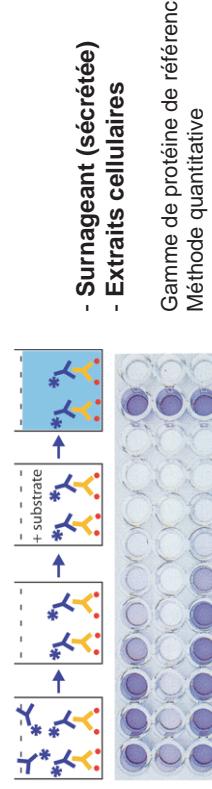


EX1 : Cytométrie en flux

Des chercheurs ont transfété des cellules avec un vecteur d'expression codant pour une protéine X étiquetée par la GFP (Green Fluorescent Protein) dans 3 lignées différentes. 48h après transfexion, l'efficacité de la transfexion est analysée par cytométrie en flux.

Analyse par ELISA (Enzyme Linked Immuno Assay)

DOSAGE SPECIFIQUE D'UNE PROTEINE

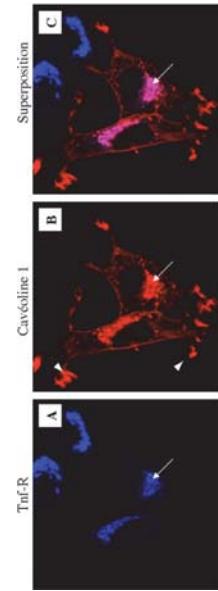


Ex : Dosage de la présence d'un AC dans un surmigeant de culture

Microscopie Optique et électronique

Ex : Microscopie : expérience de Colocalisation

Des chercheurs étudient en microscopie confocale la localisation du récepteur à la transférine (TnF-R). Pour cela des cellules sont marquées par un anticorps anti-TnF-R et un anticorps dirigés contre la cavéoline, qui est localisée au niveau de la membrane plasmique et au niveau des endosomes. La localisation du TnF-R est observée à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à un « fluorochrome bleu » et la localisation de la cavéoline est observée à l'aide d'un « fluorochrome rouge »



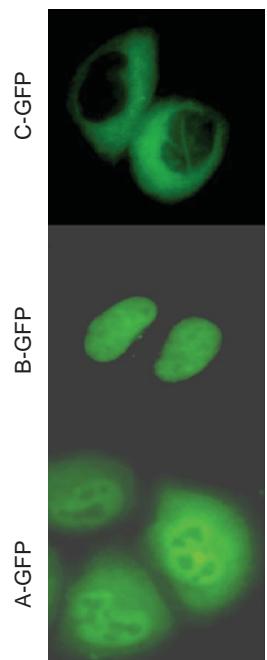
Analyse d'une protéine dans un extrait cellulaire

PARTENAIRES ?
ETAT D'ACTIVATION ?

Extrait cellulaire



MÊME PRINCIPE QUE LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ



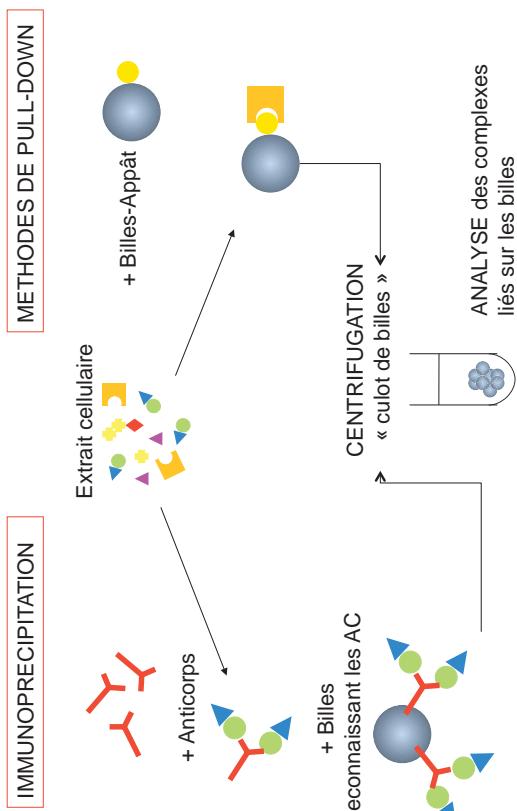
Ex : Microscopie : expérience localisation de protéines étiquetées par la GFP.

Des chercheurs étudient la localisation de 3 protéines étiquetées par la GFP. Pour cela, des cellules sont transfectées avec les vecteurs d'expression permettant d'exprimer les constructions chimères de la protéine A-GFP, B-GFP, et C-GFP. La fluorescence de la GFP est analysée par microscopie à fluorescence.

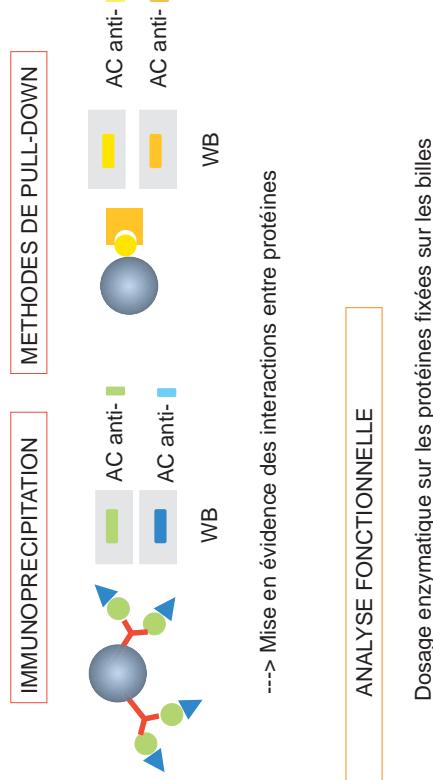
A-GFP B-GFP C-GFP

IMMUNOPRECIPITATION

METHODES DE PULL-DOWN

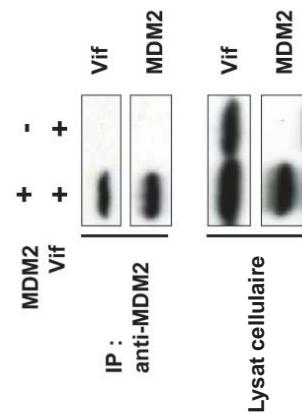


ANALYSE SDS-PAGE et WESTERN BLOT



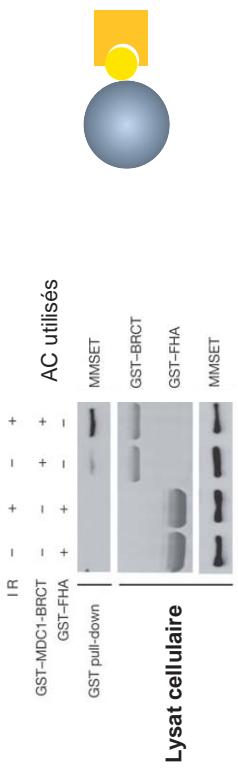
EX : IMMUNOPRECIPITATION (IP)

Afin de mettre en évidence l'interaction de la protéine **Vif** avec **MDM2**, des expériences d'immunoprecipitation ont été réalisées avec un anticorps dirigé contre **MDM2** sur des extraits (ou lysat cellulaire) réalisés à partir de cellules contenant ou non la protéine **MDM2**. Il est à noter que ces deux types d'extraits expriment la protéine **Vif**.



EX : GST-PULL DOWN

Afin d'étudier la protéine **MMSET**, des expériences de GST-pull sont réalisées avec une construction exprimant la protéine **FHA** étiquetée **GST (GST-FHA)** et une construction contenant le domaine **BRCT** de **MDC1** étiqueté **GST (GST-MDC1-BRCT)**. Pour cela, les billes liant les protéines **GST** sont incubées avec un extrait protéique de cellules irradiées (**IR+**) ou non (**IR-**). Après lavage, les billes incubées sont traitées par une solution dénaturante contenant un agent réducteur avant d'être analysées par Western Blot par les différents anticorps donnés sur la figure.



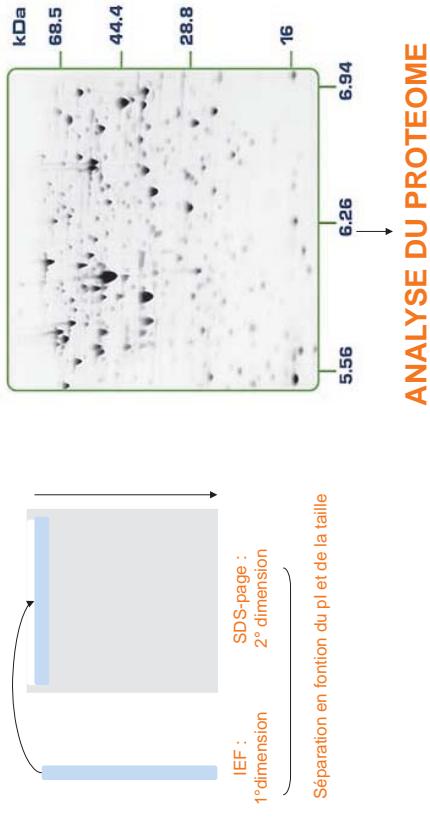
MMSET interagit avec **GST-MDC1-BRCT** dans des extraits cellulaires issus de cellules Irradiées (**IR**)

V.3. Etude du PROTEOME

Profil des PROTEINES

Electrophorèse bidimensionnelle (2D)

Couplage des techniques d'IEF et de SDS-Page



ANALYSE DU PROTEOME

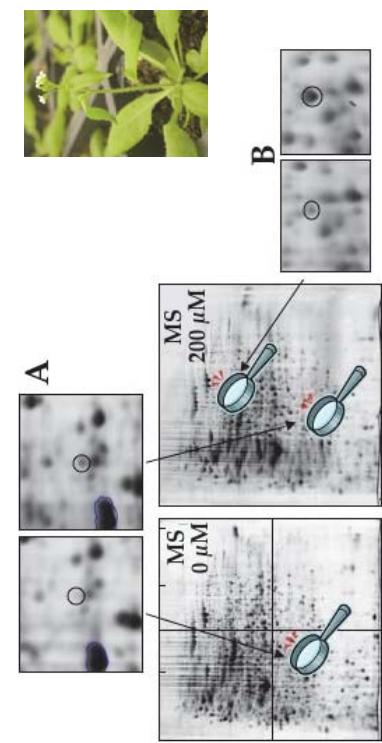
De bons bagages et des tuyaux pour comprendre les démarches expérimentales



Good luck à tous !

EX : Influence du milieu de culture sur le Protéome d'Arabidopsis

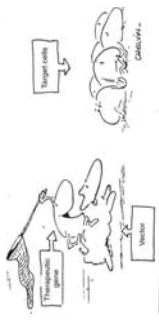
Une équipe de recherche a voulu étudier l'influence de la présence de Cadmium dans le milieu de culture sur le protéome de la plante Arabidopsis. Pour cela une étude protéomique différentielle a été réalisée sur un milieu de culture MS en présence ou non de 200µM de Cadmium.



Analyse de A et de B = protéines induites par le stress métallique

Sarry et al, Proteomics, 2006

UE 8 : TRONC COMMUN



DEFINITION

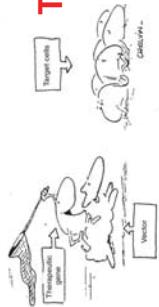
TECHNOLOGIE DE L'ADN RECOMBINANT

(MODIFICATION GENIQUE)

INTRODUCTION AUX BIOTECHNOLOGIES

B. Couderc (3 heures)

2018-2019



TECHNOLOGIE DE L'ADN RECOMBINANT RESUME

=> Utiliser « le vivant » pour produire une protéine c.a.d
Faire synthétiser une protéine dite recombinante

- Par des bactéries
- Par des cellules eucaryotes
- Par un animal
- Par un végétal
- Par un groupe de cellules (thérapie génique chez l'homme)

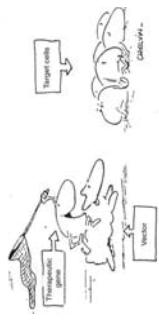
=> Créer une nouvelle lignée cellulaire (recherche)

=> Créer un nouvel organisme (OGM)

-Autres ...

Biotechnologies => Applications de la science et de la technologie à des organismes vivants, de même qu'à ces **composantes, produits et modélisation** pour **modifier** des matériaux vivants ou non-vivants aux fins de la production de connaissances, de biens et de services.

Technologie de l'ADN recombinant = Modification génique = modifier le patrimoine génétique d'une cellule, d'une groupes de cellules, de toutes les cellules d'un organisme

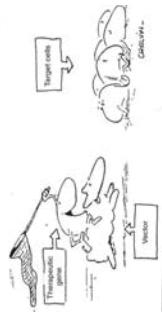


Toutes les cellules (sauf érythrocytes) (bactéries, cellules eucaryotes) sont génétiquement modifiables => **Transfert de gènes ou Thérapie génique** (additionnelle ou par recombinaison).

Tous les organismes sont génétiquement modifiables (bactéries, eucaryotes (plantes, animaux, hommes)) : **transgénèse => OGM**

Les virus sont génétiquement modifiables.

I. Introduction



Pourquoi faire de la modification génique ? :

I.I. POURQUOI FAIRE DE LA MODIFICATION GENIQUE ?

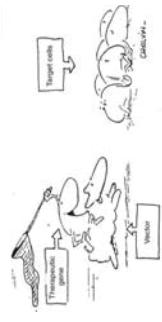
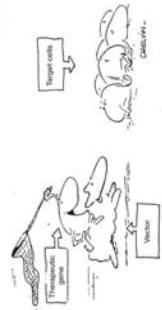
A) D'un microorganisme (prokaryote)

-Production de protéines thérapeutiques

Protéines recombinantes utilisables en clinique (insuline, facteurs de croissance, anticorps etc) ou en recherche (création d'anticorps, de biomarqueurs)

-Recherche : Analyse de la fonction d'un gène ou de partie de gène

I. Introduction



Modification génique

B) D'une cellule eucaryote

-Production de protéines thérapeutiques

Protéines recombinantes utilisables en clinique (insuline, facteurs de croissance, anticorps etc) ou en recherche (création d'anticorps, de bio marqueurs)

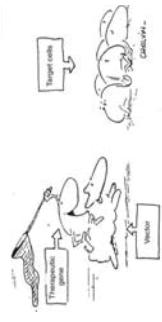
-Réaliser des modèles cellulaires (recherche)

Analyse de la fonction d'un gène, identification de cibles pharmacologiques, analyse de grands voies métaboliques

-Amélioration des propriétés d'une cellule

Génération de cellules pouvant être injectées à l'homme : thérapie cellulaire

I. Introduction



Synthèse d'un vaccin,

Utilisation du virus comme agent thérapeutique
virus oncogénique,
vecteurs viraux de transfert de gènes

Recherche

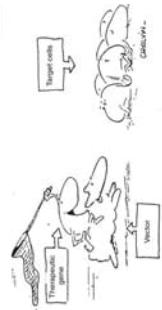
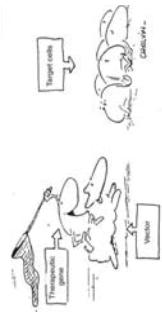
C) D'un virus

Utilisation du virus comme agent thérapeutique
virus oncogénique,
vecteurs viraux de transfert de gènes

Recherche

Modification génique :

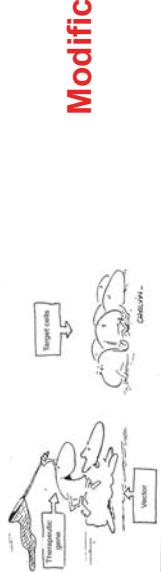
I. Introduction



Modification génique

I. Introduction

I. Introduction



Modification génétique

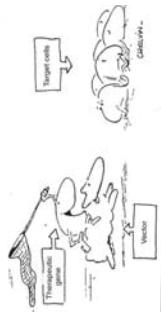
D) D'UN ORGANISME ANIMAL OU VEGETAL

-Production de protéines thérapeutiques

Protéines recombinantes utilisables en clinique (insuline, facteurs de croissance, anticorps etc) ou en recherche (création d'anticorps, de bio marqueurs)

- « Amélioration » d'espèces animales ou végétales
- Végétaux : synthèse de « supers » aliments , de végétaux résistants au froid, aux insectes etc.
- Animaux : élevage d'animaux à croissance plus efficace, jolis, performants etc.

- modèles animaux de pathologies humaines



Modification génique chez l'homme : thérapie génique

E) D'UN GROUPE DE CELLULES OU D'UN ORGANE IN VIVO

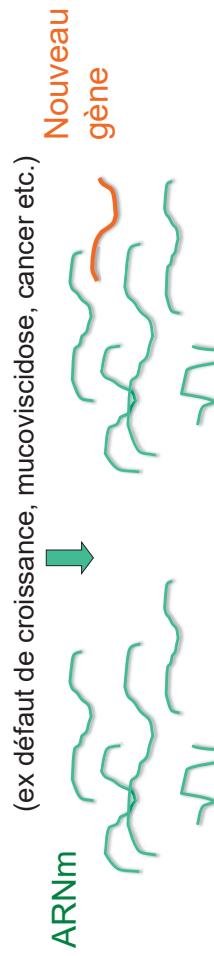
- => Traitements de maladies génétiques (héritaires ou acquises)
- => traitement de maladies chroniques

Exemple d'un raisonnement scientifique qui va induire l'utilisation du génie génétique

Pathologie



Ex : Protéine absente, différente d'un standard ou nouvelle, ou présente en quantité différente
(ex défaut de croissance, mucoviscidose, cancer etc.)



Individu sain

Individu malade



Que va t'on en faire ?

Recherche

-

ADNc polyA



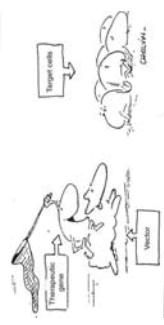
Modification de cellules =>
analyse du phénotype de la cellule génétiquement modifiée
=> Fonction du gène

Cet ARNm=> une protéine
- Synthétiser un anticorps contre cette protéine

Donc faire synthétiser cette protéine recombinante pour immuniser des animaux
prom ADNc polyA

Modification d'animaux=>
animaux transgéniques
=> Fonction du gène

Et aussi ...



prom ADNc polyA

Protéine recombinante

Qui cible l'ARN ou la protéine impliqués dans la pathologie

prom ADNc polyA

Protéine recombinante « améliorée »

Ex insulin

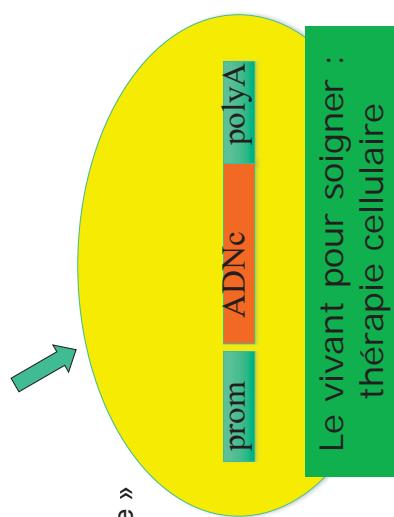
prom ADNc polyA

Le vivant pour soigner : thérapie cellulaire

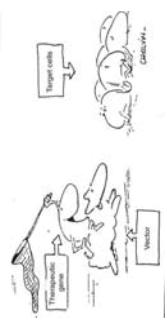


I.II. STRATEGIE DE MODIFICATION GENIQUE ?

Target cells
Gene targeted
Vector



I. Introduction



- Addition d'une fonction

Gène ou cassette d'expression

ARNm

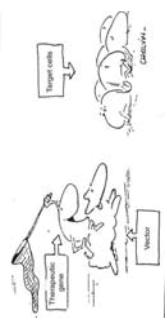
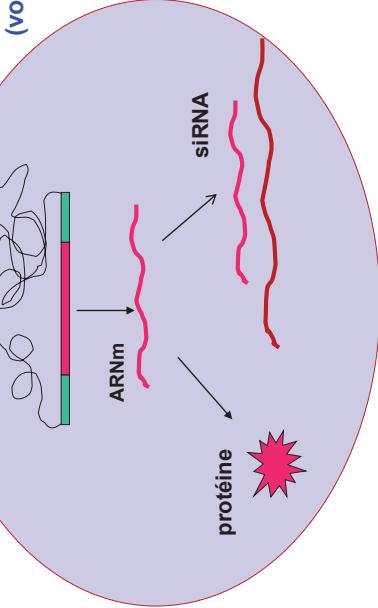
siRNA

protéine

- Elimination d'une fonction (voir chapitre V)

II. GENIE GENETIQUE

But : faire la construction d'ADN !



Principes

ORGANISME DONNEUR

Extraction et coupe de l'ADN en fragment contenant de un à plusieurs fragments d'intérêt.

VECTEUR

Ou transporteur d'ADN.
C'est un fragment d'ADN capable de réPLICATION autonome.

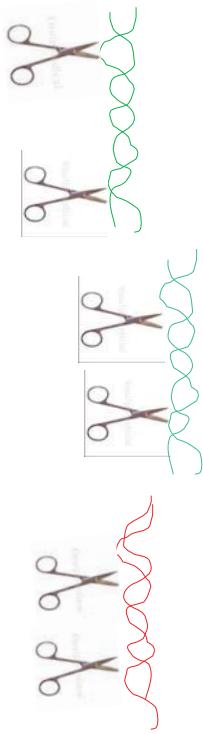
insertion individuelle de chaque fragment d'ADN dans une molécule de vecteur.



Obtention de l'ADN recombinant

Nouvelle combinaison de l'ADN d'un gène donneur (qui peut être de n'importe quel organisme) avec l'ADN d'un vecteur qui peut être d'origine complètement différente.

On a besoin de trois éléments (au moins) :
promoteur, séquence codante, terminateur

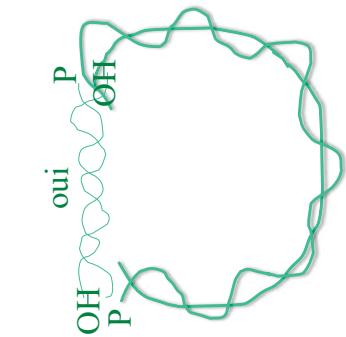


II. Génie génétique

Génie génétique : réaliser la construction génique qui sera insérée dans la cellule productrice

II. 1 : LES VECTEURS

Ces éléments d'ADN ne peuvent pas être reliés entre eux de façon « linéaire » ! On les insère séparément dans des structures circulaires : **des vecteurs** : plasmide, phages, cosmides, chromosomes artificiels ...



Définition du vecteur : structure biologique capable de complexer une macromolécule et de l'intégrer spécifiquement dans une cellule vivante => Transporteur

But : - amplifier le vecteur => grande quantité d'ADN
- expression du gène (production de protéines)

- expression du gène (thérapie génique, transgénèse ...)

Les plasmides comme vecteurs de clonage

Molécule d'ADN de taille réduite

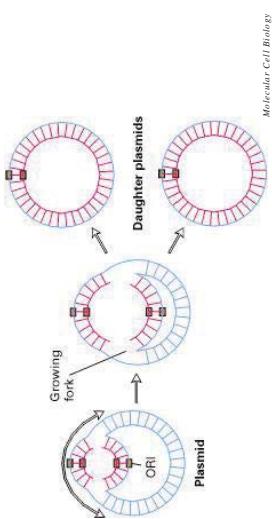
Molécule d'ADN circulaire

Peut être considérée comme un minichromosome capable de réplication autonome

Permet la résistance à un antibiotique

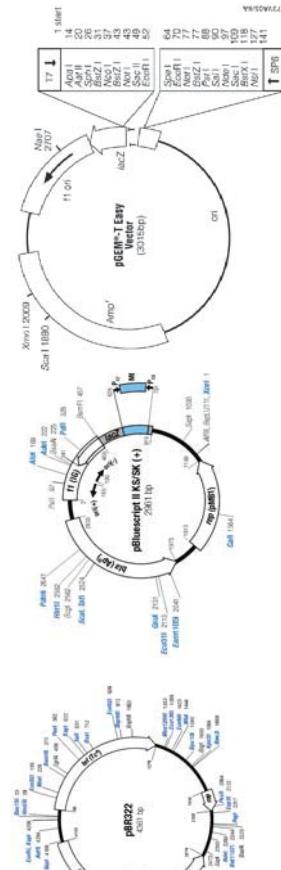
Propriétés des vecteurs de clonage

- capables de réPLICATION AUTONOME dans une cellule hôte donnée
(origine de réPLICATION de type procarBOTIQUE et/ou eucaryOTIQUE)



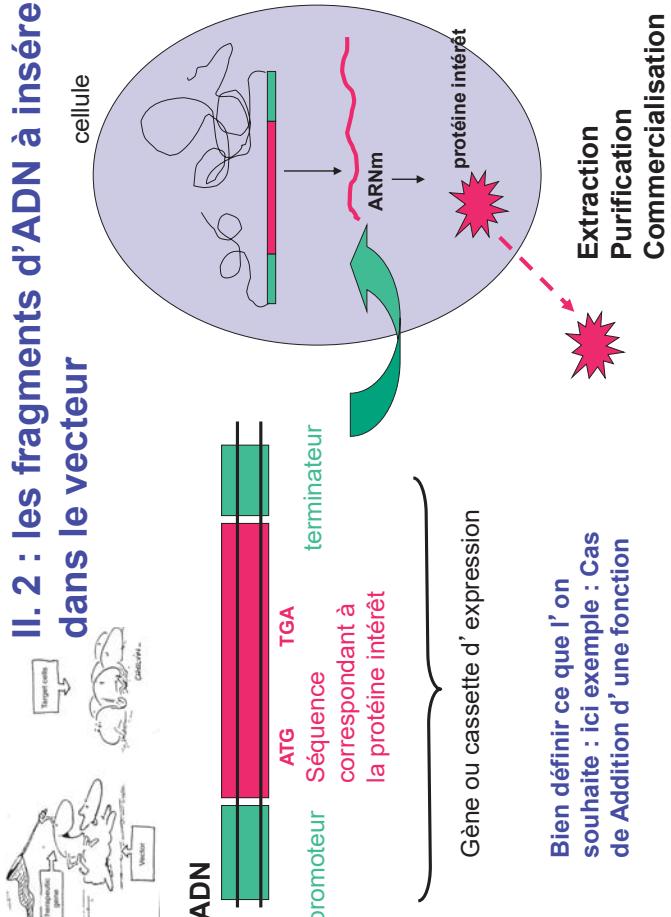
The diagram illustrates a circular plasmid vector. It features a light blue outer ring labeled "Plasmid vector". Inside this ring, there is a yellow segment labeled "Ori" (origin of replication) at the top right. At the bottom left, there is a smaller yellow segment labeled "amp'" (ampicillin resistance gene). A grey horizontal bar labeled "Polylinker" extends from the left side of the plasmid, indicating where foreign DNA can be inserted.

EXEMPLES DE PLASMIDES ET CARTES DE RESTRICTION



Type de vecteur	ADN cloné en kb
Plasmide	20
Phage lambda	25
Cosmide	45
Phage P1	100
BAC (bacterial artificial chromo some)	300
YAC (yeast artificial chromo some)	1000

II. 2 : les fragments d'ADN à insérer dans le vecteur



- supporte l'insertion d'un fragment d'ADN plus ou moins grand

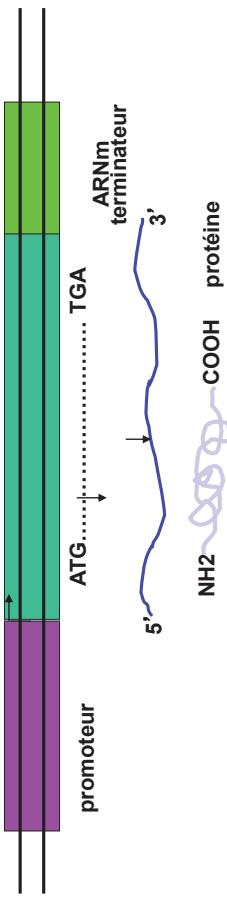
II . Génie génétique



On a donc besoin de la séquence correspondant à un promoteur, de la séquence correspondant au gène à transcrire et de la séquence correspondant à un terminateur

a) Origine de l'ADN

- ADN commercialisé (dans un vecteur)
- Banque génomique (fragment d'intérêt sous cloné)
- Obtenu après amplification PCR sur ADN cellulaire



Expression du gène =>

Transcription : Synthèse d'ARNm (ARN polymérase)

Traduction : synthèse de la protéine à partir de l'ARNm.

Deux critères de choix de la séquence à cloner :

ADNC (ARNm) ou ADN génomique
Attention au cadre ouvert de lecture (ATG ... TGA)

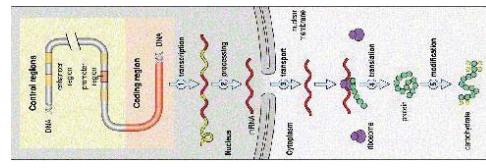


A partir de l'ADN génomique:

L'ADN génomique est obtenu à partir de lignées cellulaires, de tissus ou d'organismes entiers en fonction de la taille de l'organisme.

Pour un organisme donné on part de n'importe quel lot de cellules, l'ADN génomique sera le même.

Informations portées par l'ADN donneur

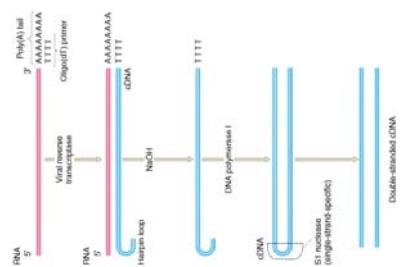


Sur l'ADN génomique:

région codante et non codante (régions promotrices, régulatrices)

Sur l'ADN complémentaire:

réglage codante,
mais il y a aussi les régions (5' et 3') non traduites



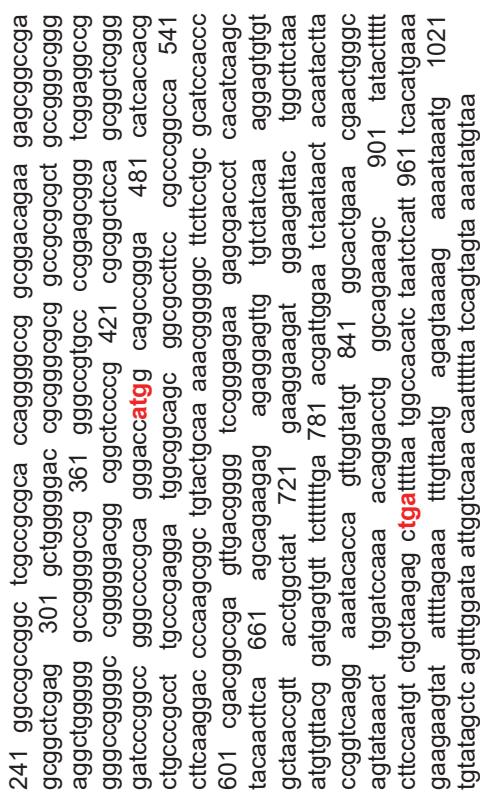
A partir de l'ARN:

Principe de la reverse transcription:

Exemple de choix de séquence



Séquence nucléotidique



Exemple d'une séquence de gène d'intérêt : le FGF-2 édité sur Genbank

LOCUS :HUMGFB 6757 bp mRNA linear PRI 08-NOV-1994

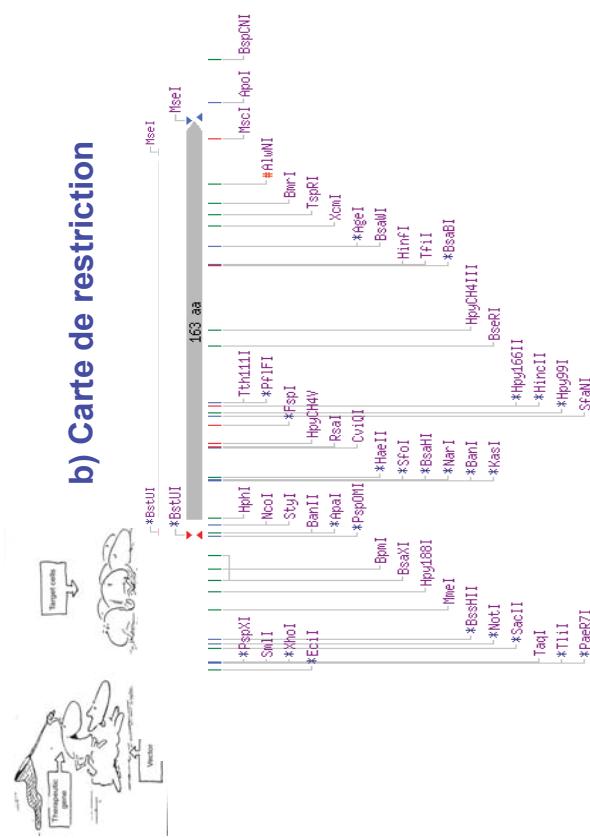
DEFINITION :Human basic fibroblast growth factor (bFGF)

ACCESSION : J04513 - SOURCE : Homo sapiens (human)

ORIGIN : Unreported, Chitosanamine 4y21-ytei.
mRNA : 1..6757 /
product="bFGF mRNA» - CDS 18 kDa : 467..934

WAAGSITTPALPEDGGSGAFPPGFFKDPKRLYCKNGFFLRIHPDGRV
DGVEREKSDFPHKLQLQAEERGVWSIKGVCANRYLAMKEDGRLLASKCVT
DECCFFERLESNNYNTYRSRKYTSWYVALKRTGQYKLGSKTGPQKAIL
ELPMSAKS

b) Carte de restriction



II. 3 : Les enzymes pour cloner les fragments d'ADN à insérer dans le vecteur

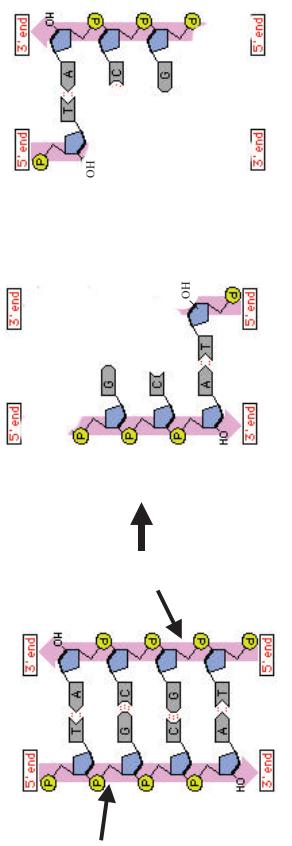
Enzymes de restriction

- Reconnaissent des séquences de 4 à 8 nucléotides.
 - Protection des séquences identiques chez les bactéries par méthylation.
 - > 100 actuellement utilisable.

Un élément fondamental du génie génétique est la capacité à couper une grande molécule d'ADN en un groupe spécifique et reproductible de fragments par l'utilisation de **nucéas**es de restriction

Les enzymes de restriction

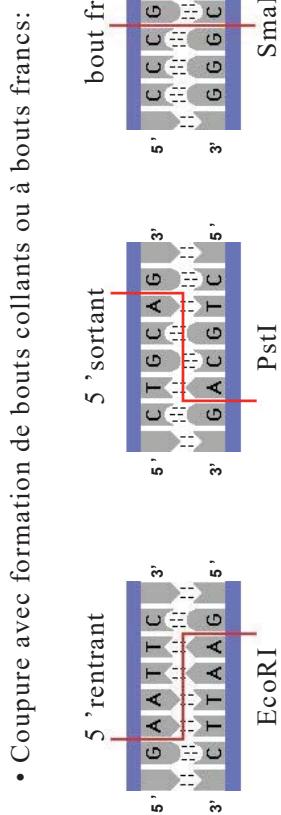
Définition: les enzymes de restriction sont des enzymes bactériennes qui reconnaissent des séquences spécifiques sur l'ADN de 4 à 8 paires de bases, et qui clivent l'ADN sur les deux brins au niveau de ces sites. Elles coupent l'ADN au niveau des ponts phosphodiesters.



Caractéristiques:

- la plupart des sites sont des séquences inversées répétées:

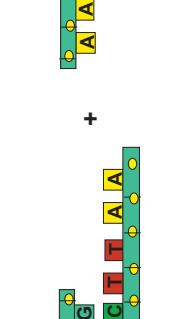
cas de EcoRI: 5' GAATTTC 3'
3' CTTAAG 5'



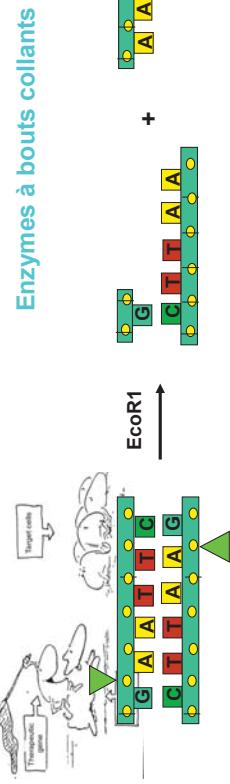
• Coupure avec formation de bouts collants ou à bouts francs:



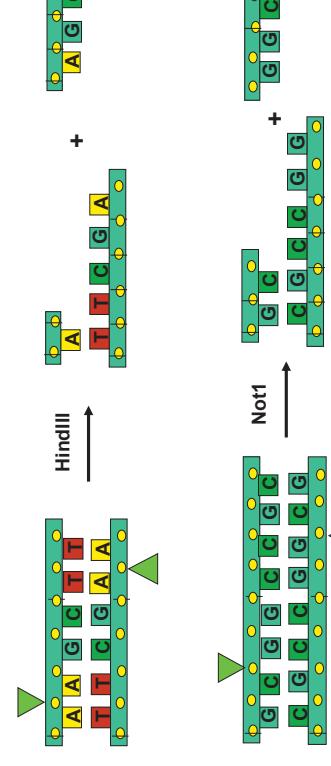
PstI



SmaI



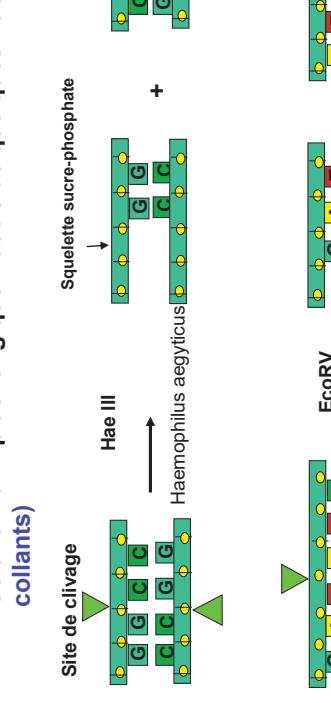
HindIII



EcoRV



Hae III



Haemophilus aegyptius



Not I



Hpa II



Hha I



Hha I

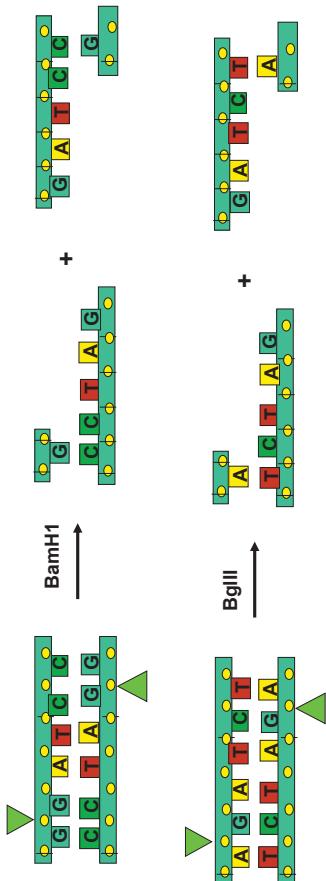
Les enzymes de modification



les sociétés

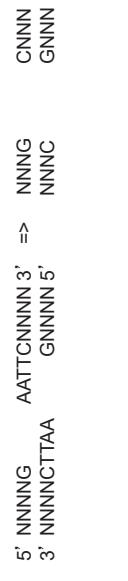
Enzymes qui reconnaissent sensiblement les mêmes séquences et dont les fragments de restriction ont des extrémités compatibles

Ex : BamH1 et BgIII sont isocaudomères
 BamH1 5' GGATCC3' BgIII 5' AGATC
 CCTAGG TCTAGA



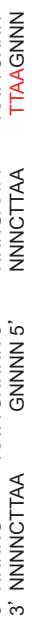
activité exonucléasique

But : obtention d' une extrémité à bouts francs à partir d' une extrémité collante par excision de nucléotides : exonucléase 5' -> 3' ou 3' ->5'



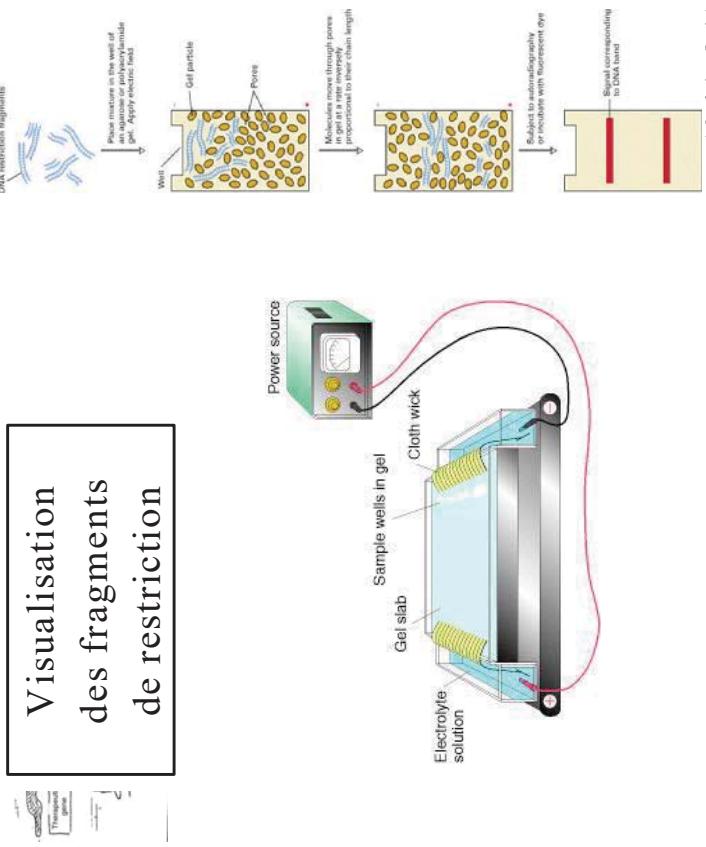
activité polymerase

But : obtention d' une extrémité à bouts francs à partir d' une extrémité collante par synthèse de nucléotides : polymérase 5' -> 3' (+dNTP)

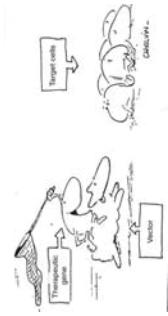


II. Génie génétique

Visualisation des fragments de restriction



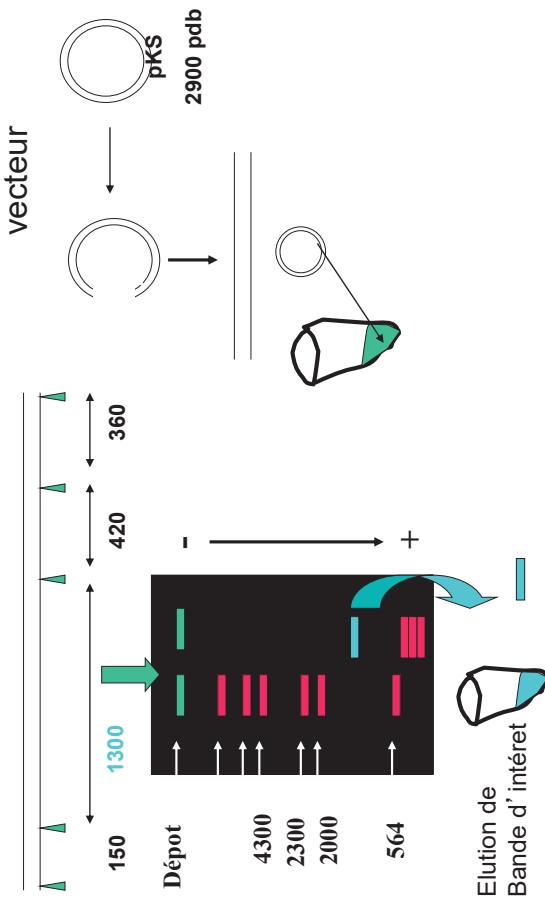
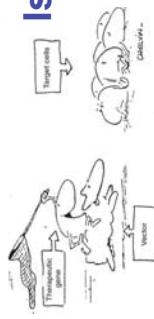
Fragments de restriction



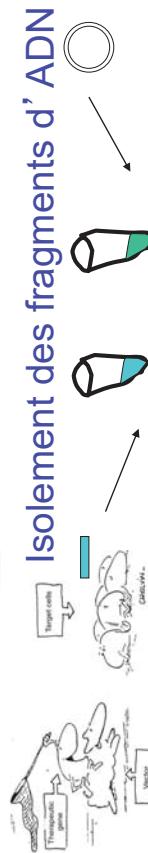
The diagram illustrates a standard gel electrophoresis apparatus. A green rectangular power source is connected by wires to a central metal frame. The frame holds a blue rectangular gel slab. On the left side of the gel, there are four circular wells labeled "Sample wells in gel". Below the gel slab, a blue rectangular container labeled "Electrolyte solution" is partially submerged. Two yellow coiled "Cloth wicks" extend from the top of the gel slab down into the electrolyte solution. Labels with leader lines identify each component: "Power source" points to the green box, "Cloth wick" points to one of the yellow coils, "Sample wells in gel" points to the circular wells, "Gel slab" points to the blue slab, and "Electrolyte solution" points to the blue container at the bottom.

- Fragments d'**ADN** obtenus par action des enzymes nucléasiques.

Isolement des fragments d'ADN

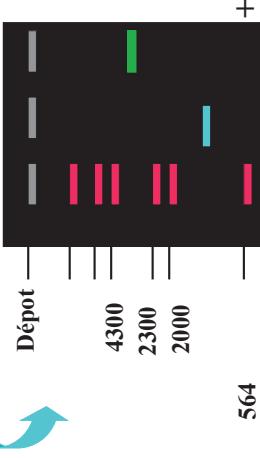
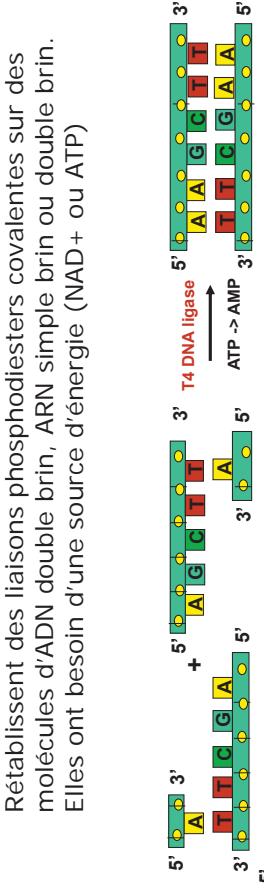


Isolement des fragments d'ADN

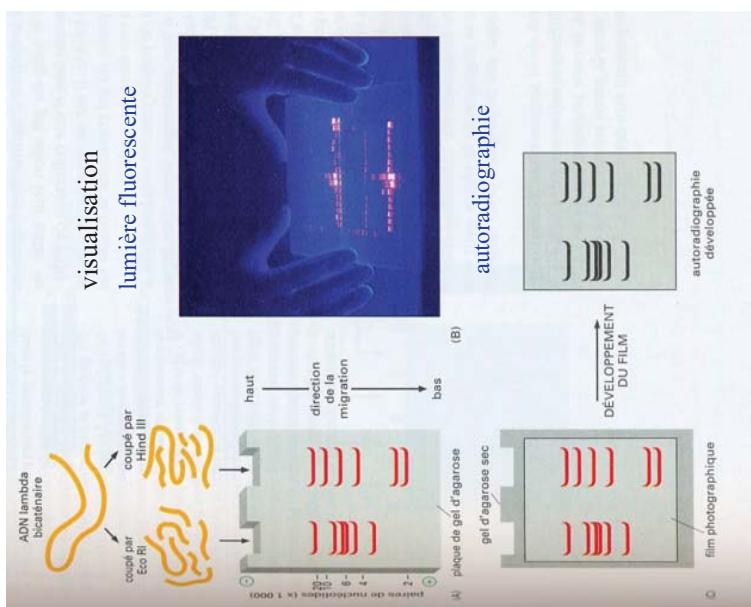


Enzymes qui lient : les ligases

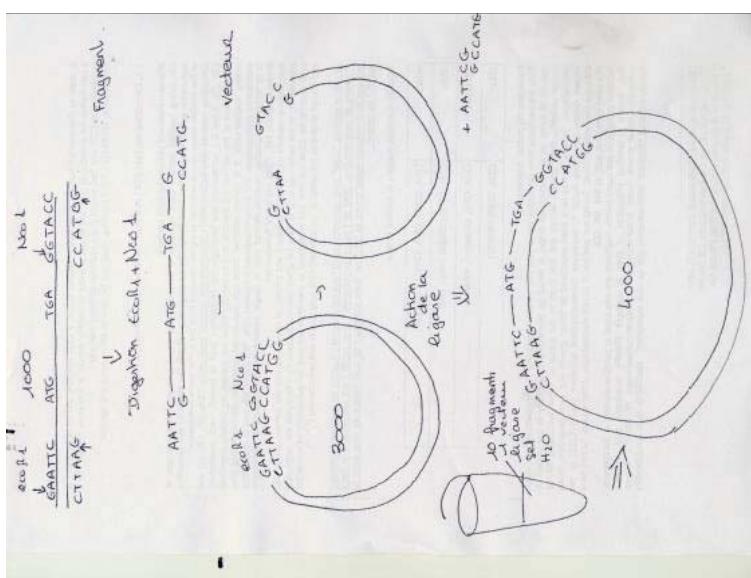
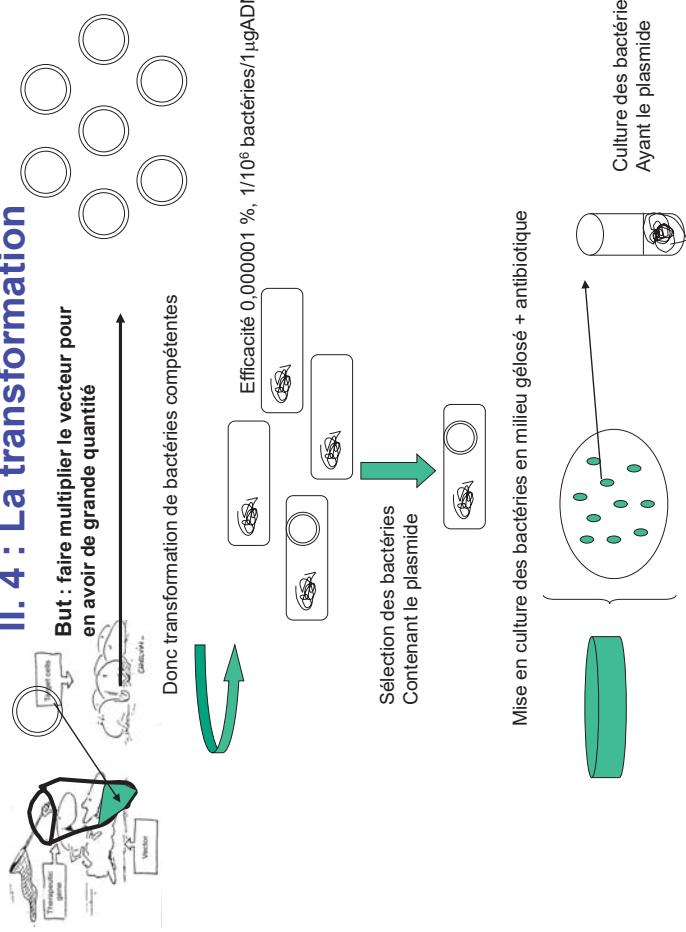
Rétablissement des liaisons phosphodiester covalentes sur des molécules d'ADN double brin, ARN simple brin ou double brin. Elles ont besoin d'une source d'énergie (NAD+ ou ATP)



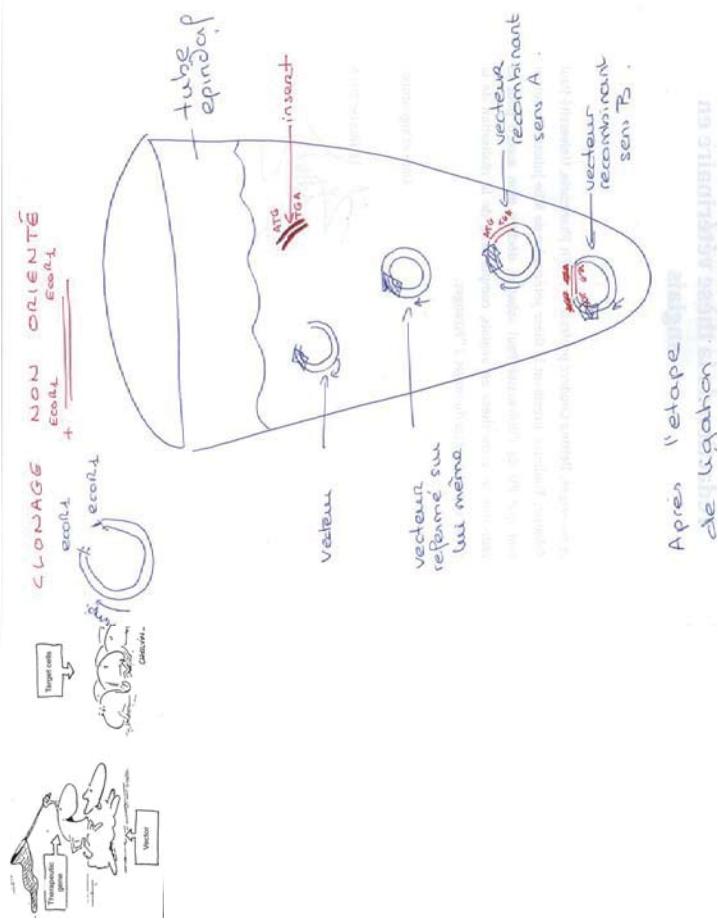
Vérification de la pureté Des fragments et de Leur quantité



II. 4 : La transformation

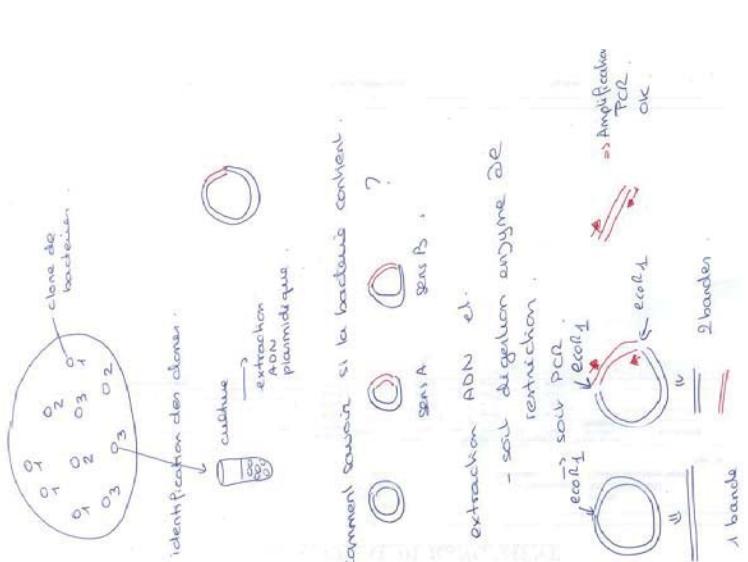


Procédure complète



Cloning into a plasmid

Après l'étape de ligation, il faut assurer un



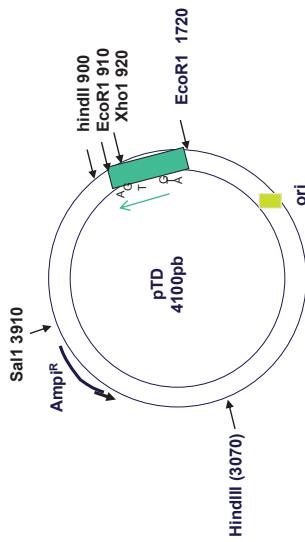
Exemple : Clonage de l'ADN codant NeClA dans un vecteur d'expression.



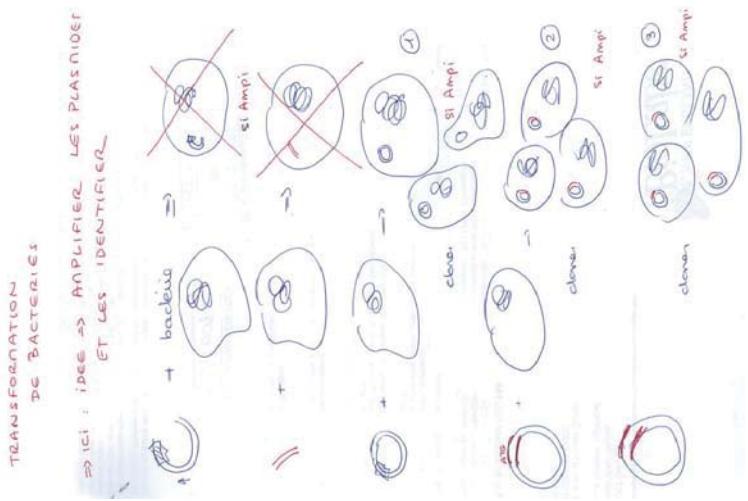
faire produire dans le lait de chèvre transgénique un fil très résistant capable de rentrer dans la composition de gilet pare-balles. Ce fil serait fait de protéines particulières codées par le gène *Nephila Clavipes*.

Lors de la constitution de la banque, l'ADNC codant pour NeClA a été obtenu avec des extrémités EcoRI. Il a été cloné dans le vecteur pAB

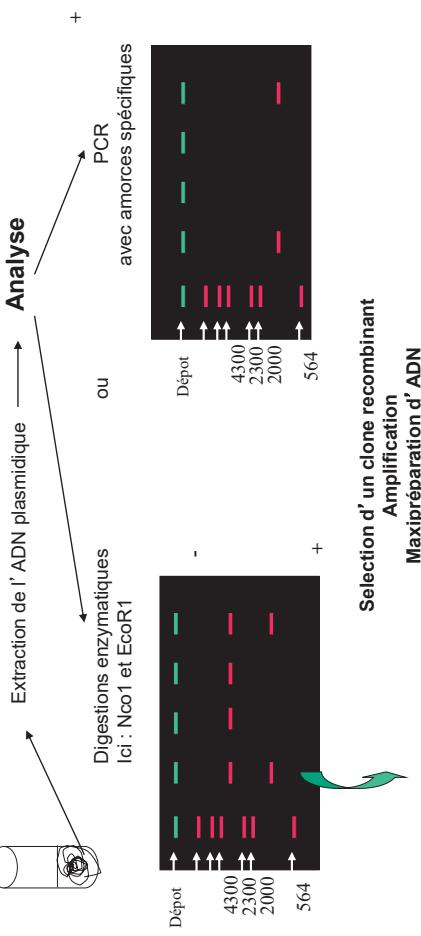
- On va ensuite le cloner dans le vecteur pAB
- Question 1 : Le vecteur pAB est un plasmide. Connaissez-vous d'autres vecteurs utilisables en génie génétique ? Si oui nommez-les sans les détailler
- Question 2 : Que reconnaissiez-vous comme éléments génétiques sur le plasmide pAB, pAB



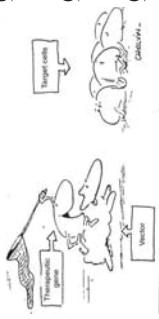
amp^R : gène prokaryote de résistance à l'ampicilline
Kan^R : gène prokaryote de résistance à l'ampicilline



II. 5 : Sélection des clones bactériens qui portent la construction plasmidique



Question 3 : Quelles sont les étapes du clonage ?



Question 4 : S'agit il d'un clonage orienté ? Pourquoi

Question 5 : Comment allez vous sélectionner les bactéries ayant incorporé un plasmide ? Comment allez vous sélectionner les bactéries ayant incorporé un plasmide recombinant ? Pourquoi ?

Question 6 : Dessinez le(s) plasmide(s) obtenus

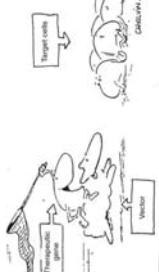
Question 7 Par quel(s) enzyme(s) allez vous digérer le(s) plasmide(s) obtenu(s) pour identification ? Pourquoi ? (2 point)

Question 8 : si vous transfectez un des deux plasmides recombinant dans des cellules eucaryotes, obtiendrez vous l'expression de la protéine ? Pourquoi ?



amp^R: gène prokaryote de résistance à l'ampicilline

Kana^R: gène prokaryote de résistance à la kanamycine



0 : HindIII

Promoteur euc d'intérêt

TATA

EcoR1 910

Xba1 1200

Terminateur

ori

pAB 6000pb

ADNC codant la résistance au G418

kanR

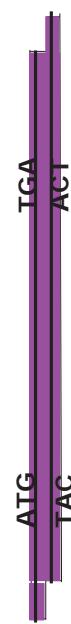
Promoteur euc

II. Génie génétique

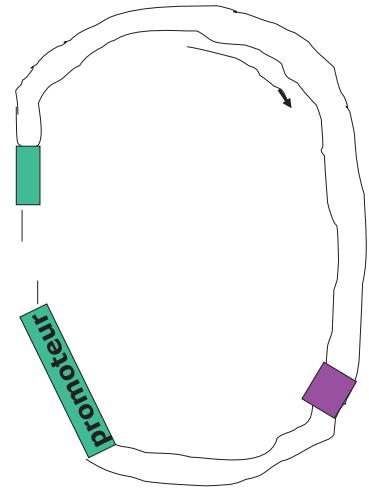


2) Utilisation de vecteurs d'expression : plasmide, phages, cosmides, chromosomes artificiels

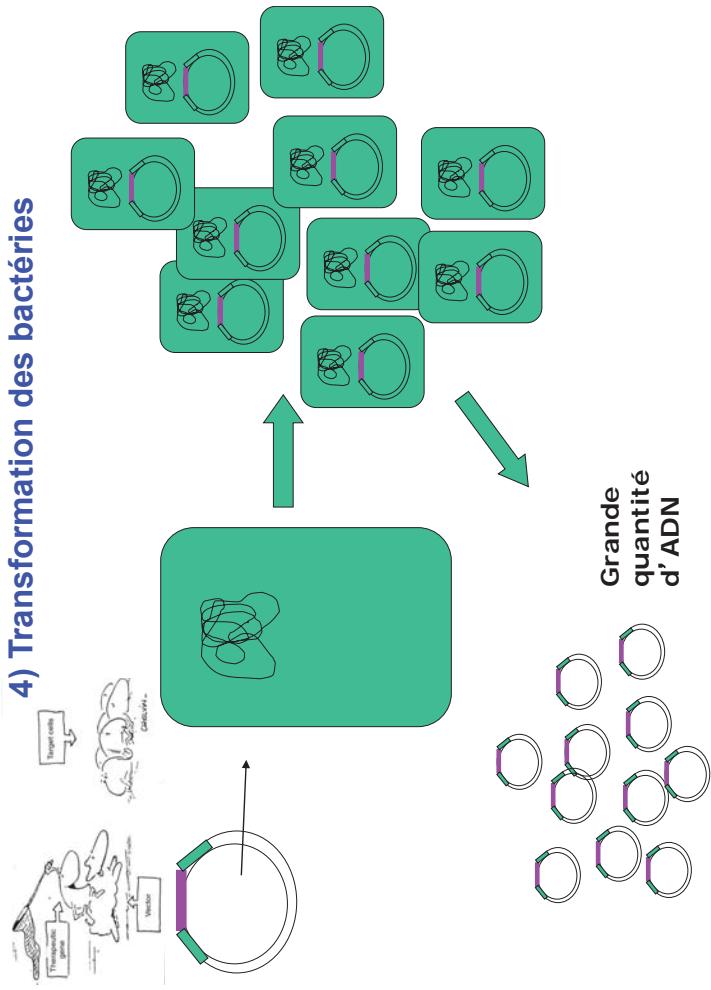
1) Obtention des l'ADNs d'intérêt : banque génomique ou banque d'expression => séquence déjà clonée ou PCR etc ...



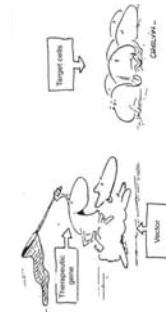
Ici exemple d'une séquence d'ADNc correspondant à une séquence codant une protéine



II. Génie génétique



III. Transfert de gènes



III. 1. A : Transfert de gène chez la bactérie = transformation



Transformation : faire entrer de l'ADN dans la bactérie

Trois possibilités :
transformation chimique
transformation électrique
utilisation de bactériophages

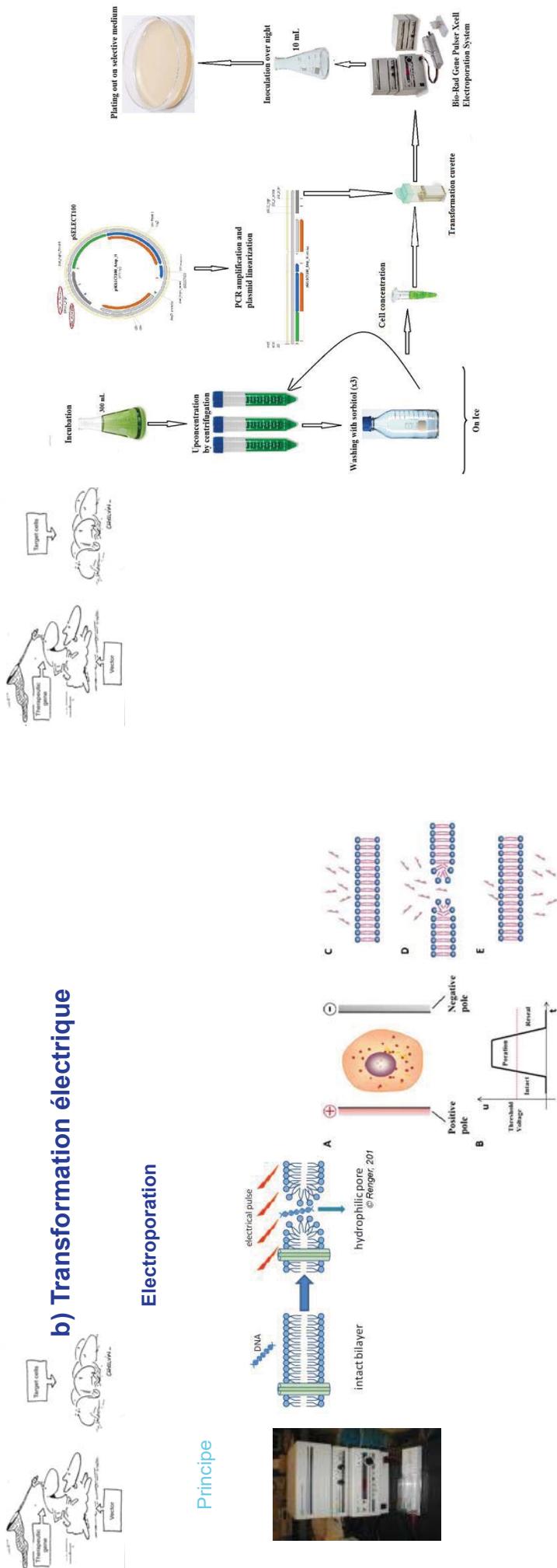
a) Transformation chimique :

- traitements des bactéries par des solutions de chlorure de Mg et de Ca (MgCl₂ et CaCl₂) qui fragilisent la paroi bactérienne à 4°C
- ajout de l'ADN et incubation à 4°C
- relancer la culture bactérienne à 37°C

III. Transfert de gènes

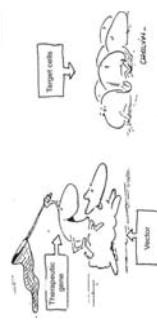
III. I. Méthodologies

b) Transformation électrique



3) Utilisation des bactériophages

Les phages comme Vecteurs de clonage



III. 1. B : Transfert de gène chez la cellule eucaryote = **Transfection**

- Trois possibilités :
 - transfection chimique
 - transfection électrique
 - transfection synthétique
- Utilisation de vecteurs

a) Transfection chimique :

- traitements des cellules par des solutions de phosphate de Ca++ (CaPO_4) qui fragilisent la paroi cellulaire
 - ajout de l'ADN
 - relancer la culture cellulaire à 37° C

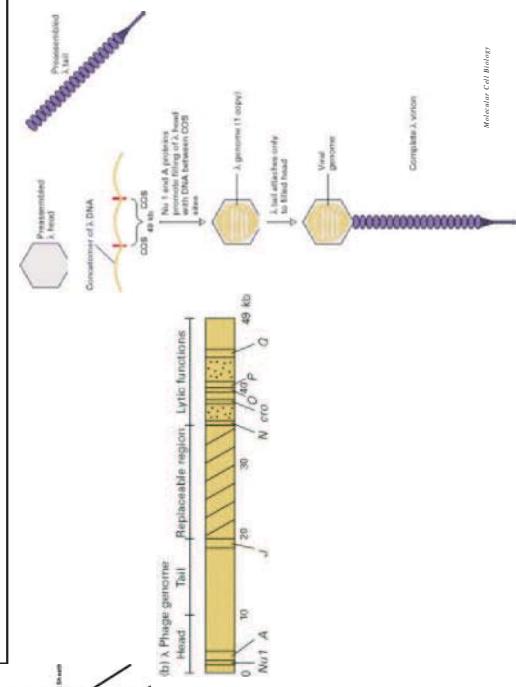
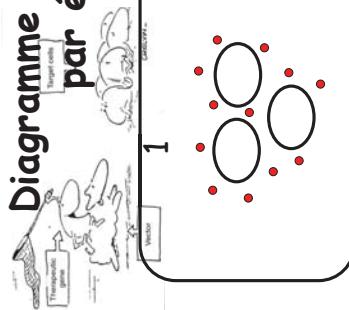


Diagramme schématique du traitement par électrogeno-thérapie

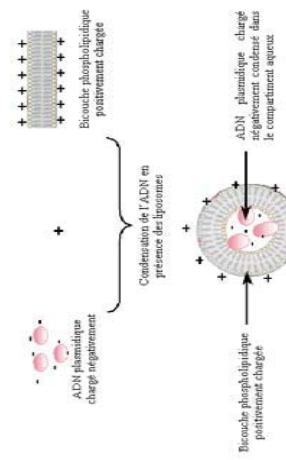
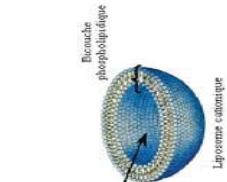


3- Les membranes se reforment

1- l'ADN plasmidique est injecté dans la circulation sanguine



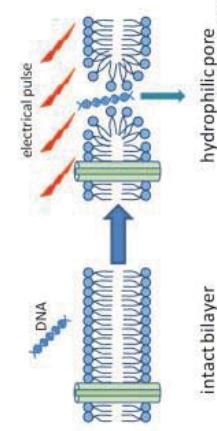
2- Le champ électrique permet la perméabilisation des membranes plasmiques et la rentée de l'ADN



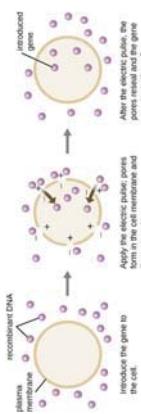
b) Transfection électrique



(gene gun)



Utilisable *in vitro* (cellules en culture) ou *in vivo*



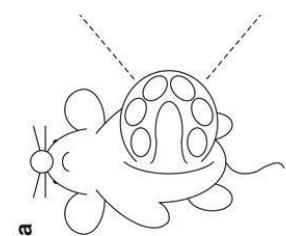
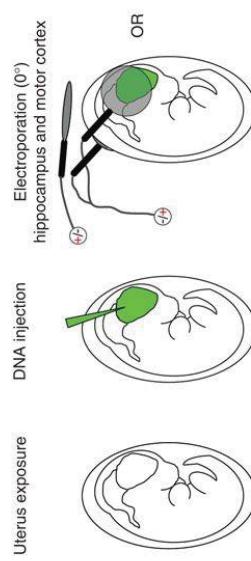
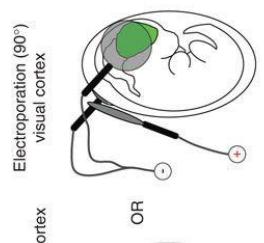
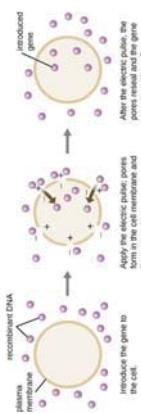
Canon à particules

Electroporation

Principe

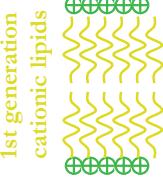


Utilisable *in vitro* (cellules en culture) ou *in vivo*

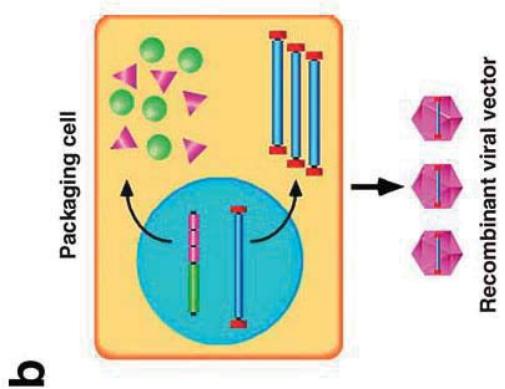
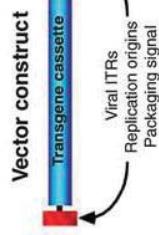
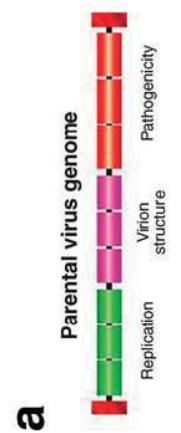
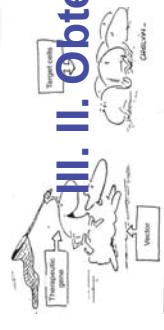


c) Transfection synthétique

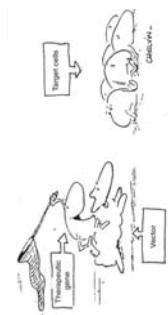
- lipides et dérivés lipidiques :
- vecteurs synthétiques
- association peptides-ADN :
- vecteurs synthétiques bis



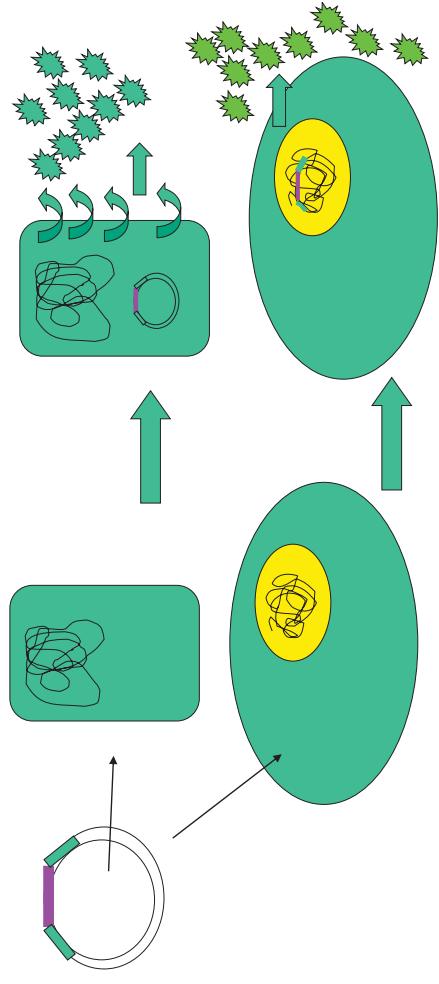
Utilisation de vecteurs vitaux



III. Transfert de gènes



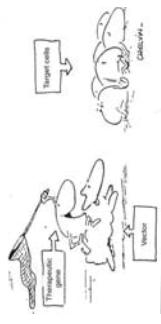
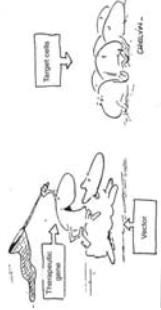
III. III. Obtention des organismes producteurs de protéines recombinantes



Ou changement de phénotype de la bactérie ou de la cellule

Protéines thérapeutiques

III . Transfert de gènes Méthodologie



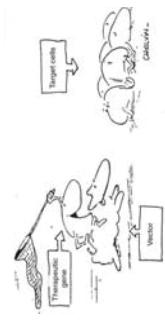
Définition de la protéine que l' on veut synthétisée (séquence en aa, conformation, modifications post traductionnelles ...)

Choix de la cellule qui va produire la protéine (prokaryote, eucaryote inférieur (levure), eucaryote supérieur (cellules en culture, animaux transgéniques, plantes transgéniques

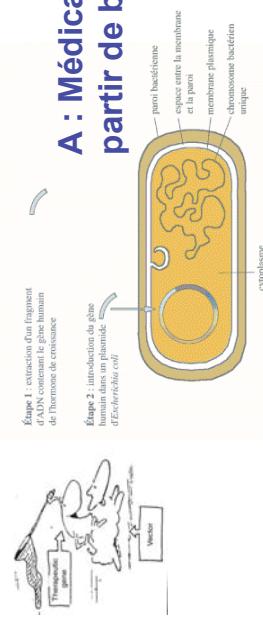
- => Certaines protéines thérapeutiques pourront être synthétisées chez les **prokaryotes**
- => Certaines protéines thérapeutiques **devront être** synthétisées chez les **eucaryotes**

Choix de la méthode de purification de la protéine (ILM)

III. Production

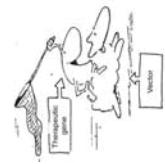


III. Production A : Médicaments obtenus à partir de bactéries



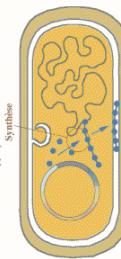
Étape 1 : extraction d'un fragment d'ADN contenant le gène humain de l'hormone de croissance

Étape 2 : introduction du gène humain dans un plasmide d'E. coli



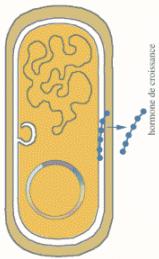
Protéines recombinantes (insuline, hormones de croissance, cytokines, chemokines)

Antigènes viraux produits par des bactéries recombinantes et utilisés en vaccination
Ex. vaccins contre antigènes de l' hépatite B



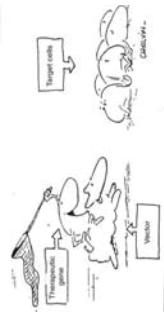
Étape 3 : expression du gène greffé sur les bactéries transgéniques, cultivées en fermenteur, sur milieux appropriés

Synthèse



Étape 4 : récupération de l'hormone de croissance, sans destruction de la bactérie

B) Protéines produites en Système d'expression eucaryotes



-Levures (saccharomyces)

-Cellules eucaryotes (CHO, 3T3, Hela ...)

- Cellules eucaryotes d'insectes

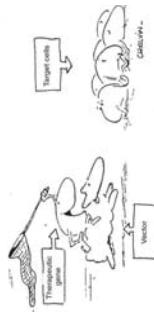
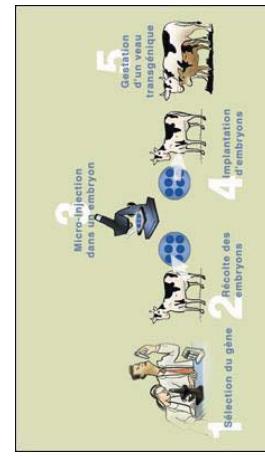
- Cellules embryonnaires

-Cellules végétales

Transgenese



TRANSGENESE GERMINALE



TRANSGENESE GERMINALE

C : Médicaments obtenus à partir de plantes ou d'animaux transgéniques

=>TRANSGENESE GERMINALE

DÉFINITION : modification de façon permanente du code génétique d'une plante ou d'un animal. Les descendants héritent du transgène!

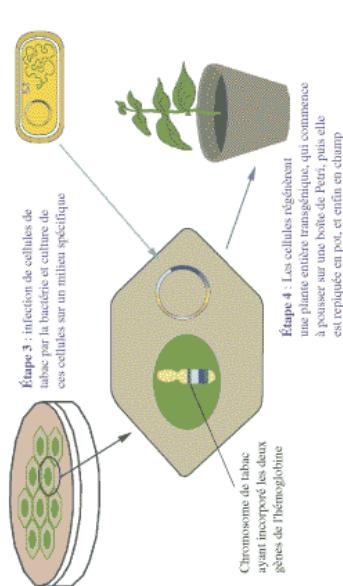
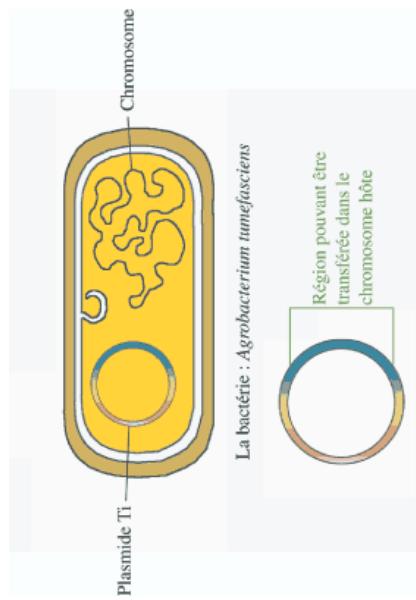
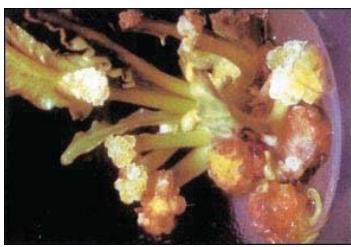
→ Fabrication d'une protéine à grande échelle (ex. facteur VIII pour les hémophiles dans les fluides biologiques des animaux)

→ Ex; Protéines produites dans le lait de chèvre, de vache ou de brebis

→ Anticorps humanisés (porc, souris ...)

Exemple des Plantes transgéniques :

Exemple de l'obtention d'un plantule de tabac transgénique grâce à la transfaction avec agrobactérium tumefaciens



Plantes

Lipase gastrique
Albumine humaine
Collagène
Hirudine
Protéine GAD

mucoviscidose

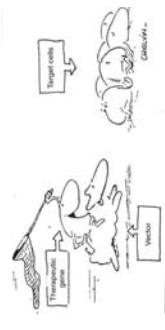
remplacement d'éléments sanguins
arthrose et réparation des tissus
anti coagulant (thrombose)
diabète insulino dépendant

- Production de protéines thérapeutiques

Protéines recombinantes utilisables en clinique (insuline, facteurs de croissance, anticorps etc) ou en recherche (création d'anticorps, de biomarqueurs)

- Animaux : élevage d'animaux à croissance plus efficace, jolis, performants etc.
- modèles animaux de pathologies humaines

Une autre voie pour apprécier la transgénèse !!!



IV. Transgenèse

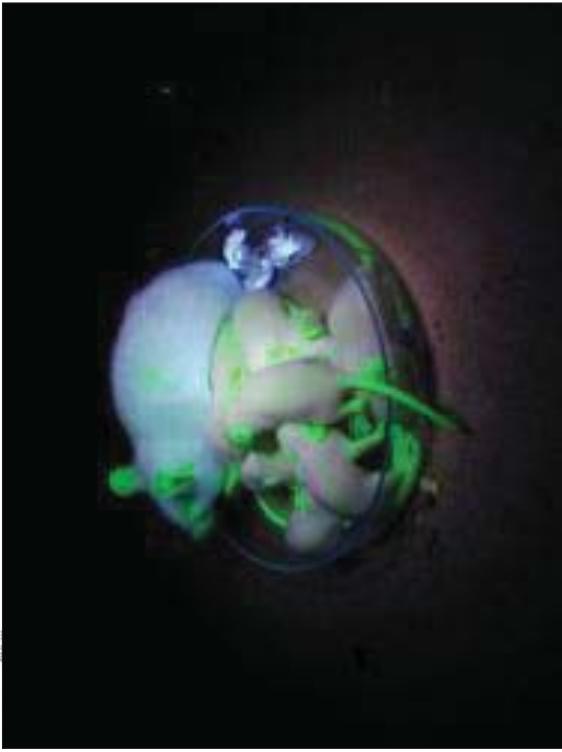
Historique

Première transgénèse en 1982 (R.D. Palmiter et Brinster)

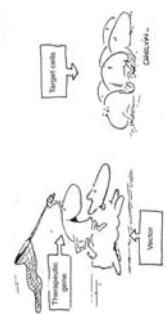
⇒ Souris transgéniques qui exprimaient le gène de l'hormone de croissance du rat => souris géantes

⇒ Pas une seule technique mais plusieurs => passage par l'embryon obligatoire

⇒ Tout animal est « génétiquement modifiable »

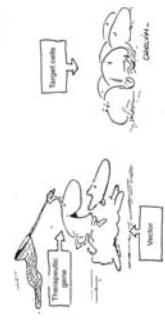


Établissement d'animaux transgéniques Le principe !

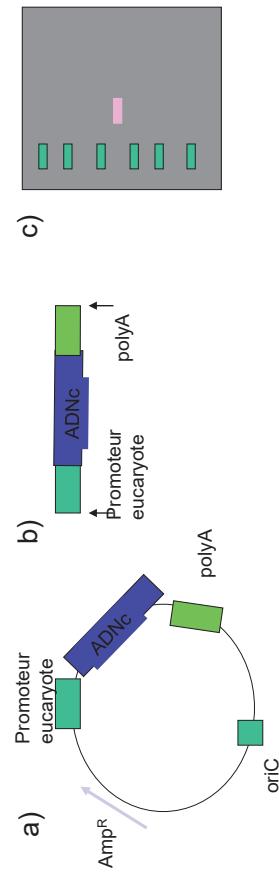


IV. Transgenèse

Préparation de l'ADN !



- Clonage de la séquence génique d'intérêt dans un vecteur d'expression (choix du promoteur, de la séquence etc ...)
- Vérification du clonage et de la conformité du transgène
- Extraction et Purification du fragment d'ADN d'intérêt à partir du plasmide
- Vérification (identité, pureté, quantité)



Préparation de l'ADN : promoteur ADNc terminateur

Insertion dans le génome d'une cellule provenant de l'espèce que l'on veut obtenir transgénique

(cellule = oocyte fécondé : transgénèse additive ou cellule ES : transgénèse par recombinaison)

Obtention d'animaux

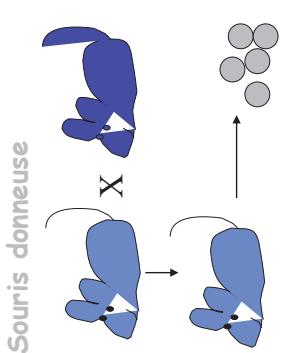
Test de la présence du transgène
élevage

A : TRANSGENÈSE ADDITIVE :

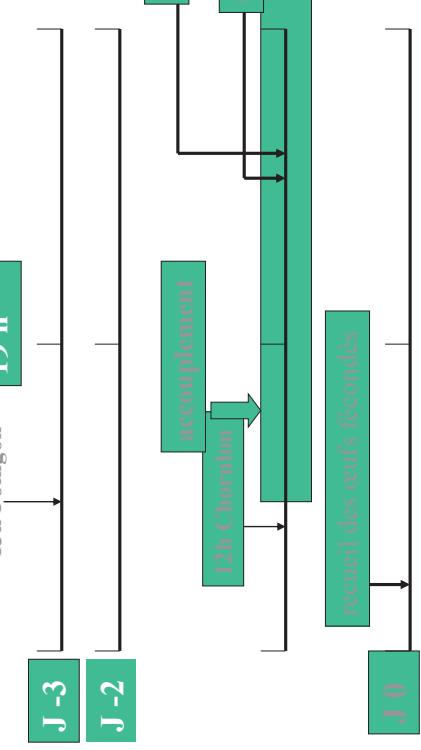


Préparation des souris, obtention des ovules fécondés

But : obtention d'ovules fécondés

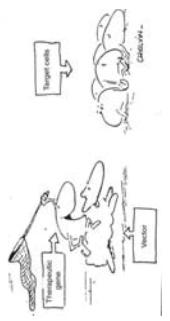


Ovules fécondés



IV. Transgenèse

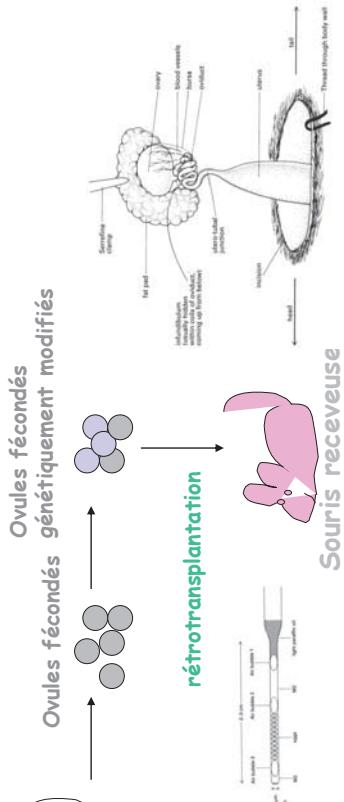
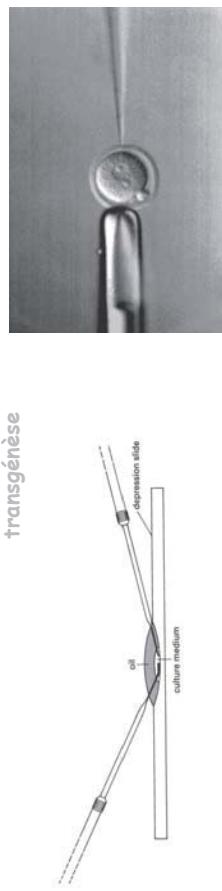
Rétrotransplantation



transgénèse

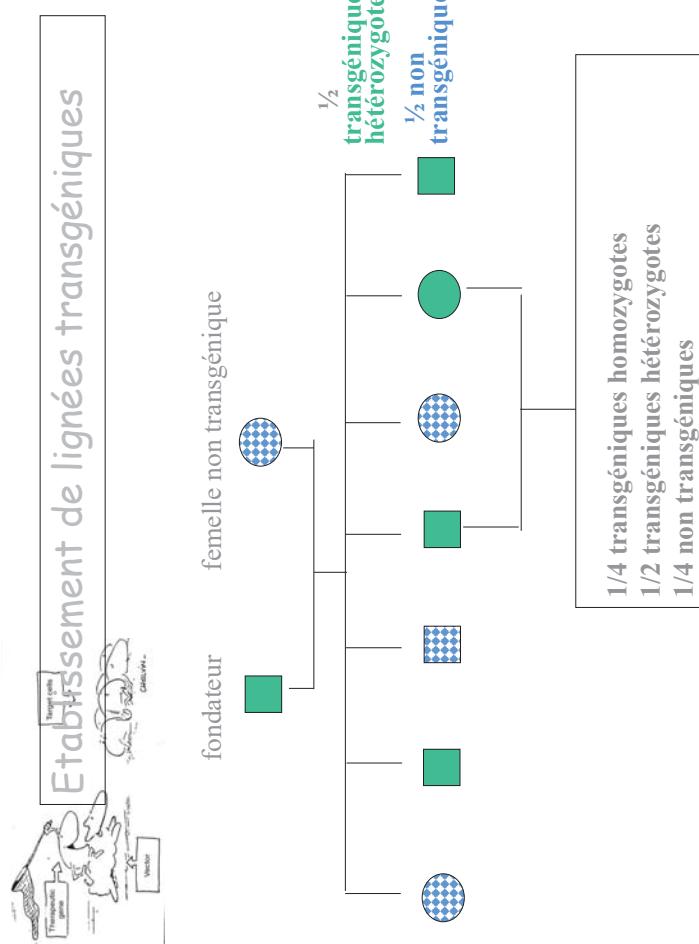
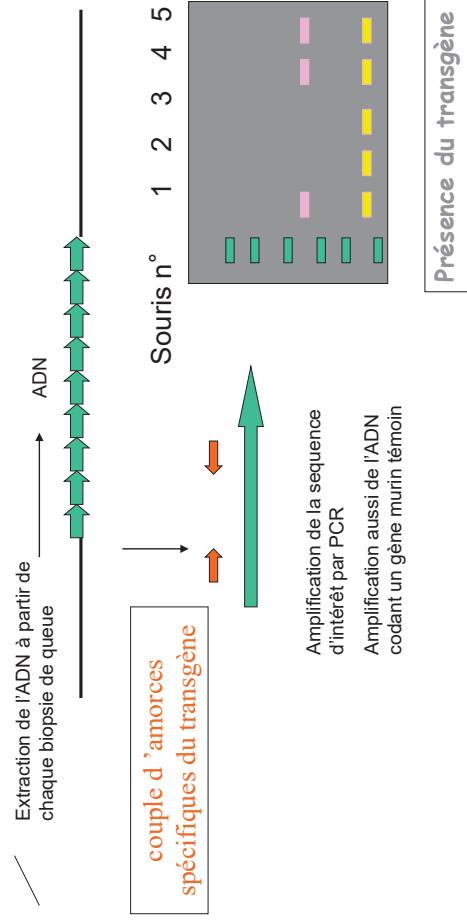
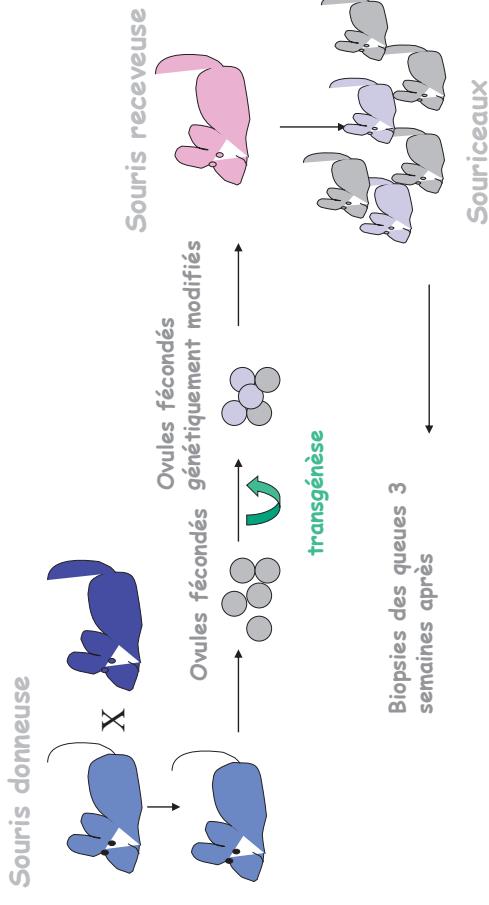
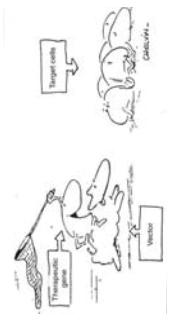


transgénèse



IV. Transgénese

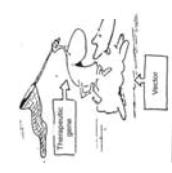
IV. Transgénese



IV. Transgénèse



NEWS



Apport des Biotechnologies

Faire synthétiser le médicament (AAT) dans le lait d'animaux transgéniques

Brebis transgéniques

Même principe que chez la souris ici le transgène =



Ex. Brebis transgéniques

Production dans le lait d'un enzyme (Alpha 1 antitrypsine -AAT)

1 brebis => 300 l de lait/an - 1-3 g de AAT/l

1 brebis = 1 fermeteur cellulaire

Entreprise = GTC biotherapeutics

Antitrombin-a (Atryn)

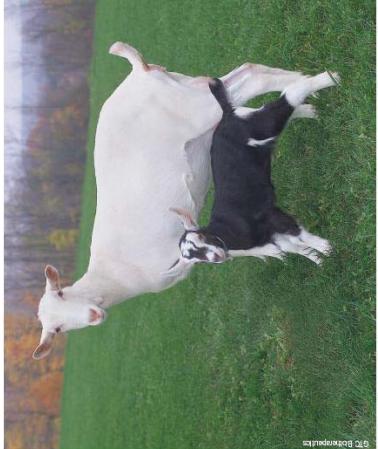
En clinique en Europe depuis 2006 aux USA : 2009

Ex. Chèvre transgénique

* promoteur cellules mammaires spécifique, ADNC humain, poly A

* transgénèse additive => animal fondateur

* puis clonage reproductif !!!



Min from GTC's transgenic goats pictured here will be used to produce Atryn, the first animal drug to be approved in the US.



Liste de médicaments obtenus par génie génétique et biotechnologies avec transgénèse animale

Animaux - vache
Proteine lacoferrine
Collagène
lapin
alpha glucosidase
brebis
AAT
Facteur IX
Chevre
Protéine anti-trombine III

déficiency immunitaire

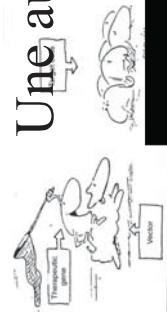
dysfonction du stockage du sucre

mucoviscidose
hémosthile

anti coagulant (thrombose)

Anticorps !!!!!!!

IV. Transgenese

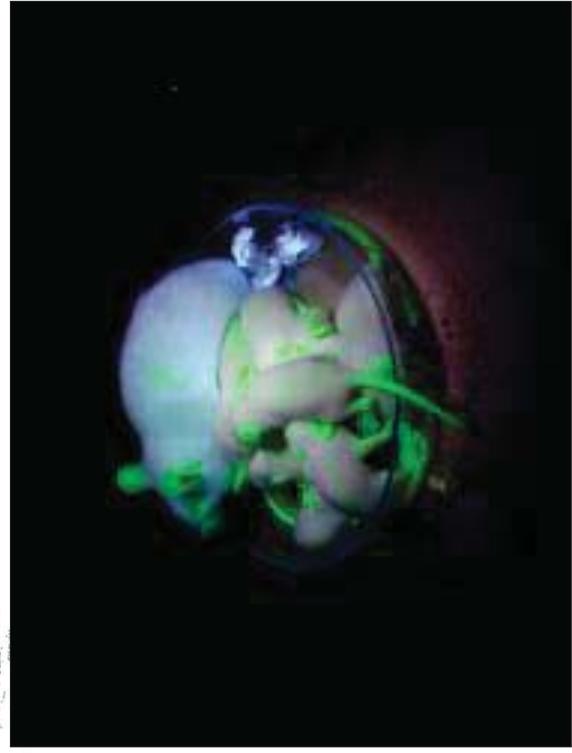


IV : TRANSGENESE ANIMALE

- Production de protéines thérapeutiques

Protéines recombinantes utilisables en clinique (insuline, facteurs de croissance, anticorps etc) ou en recherche (création d'anticorps, de biomarqueurs)

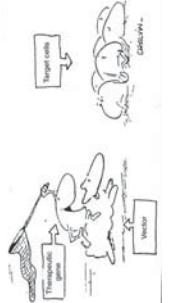
- Animaux : élevage d' animaux à croissance plus efficace, jolis, performants etc.
- modèles animaux de pathologies humaines



Une autre voie pour apprécier la transgenèse !!!

IV. Transgenese

Historique



Première transgénèse en 1982 (R.D. Palmiter et Brinster)

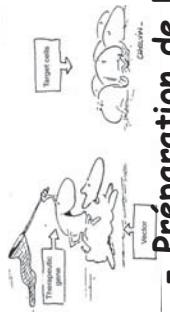
⇒ Souris transgéniques qui exprimaient le gène de l'hormone de croissance du rat => souris géantes

⇒ Pas une seule technique mais plusieurs => passage par l'embryon obligatoire

⇒ Tout animal est « génétiquement modifiable »

Etablissement d' animaux transgéniques

Le principe !



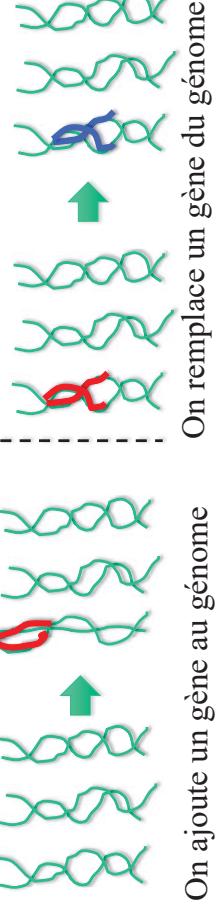
- Préparation de l' ADN : promoteur ADNc terminateur

- Insertion dans le génome d'une cellule provenant de l'espèce que l'on veut obtenir transgénique

-soit :

-cellule = **oocyte fécondé** soit **cellule ES**

-: **transgénèse additive** : transgénèse par recombinaison



On ajoute un gène au génome

On remplace un gène du génome

IV. Transgénèse

IV. Transgénèse

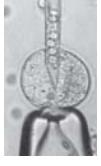
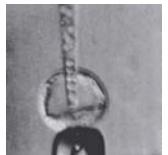
Deux types de transgénèses

transgenèse classique (additive)

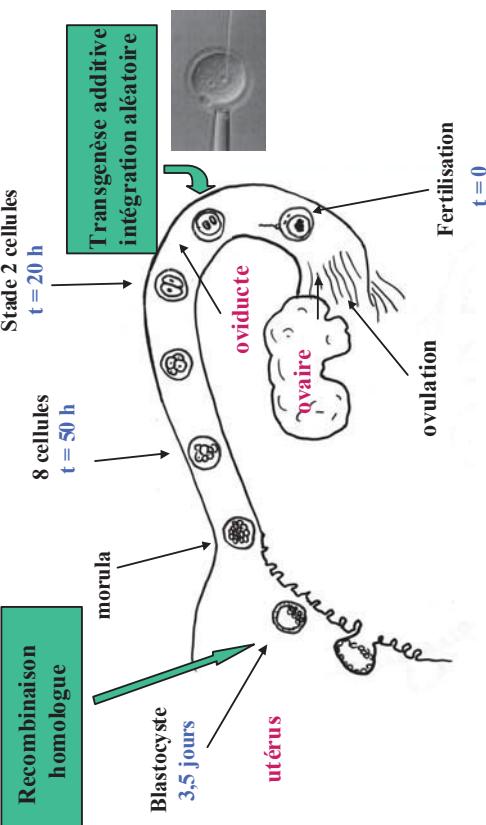
microinjection de l'ADN dans l'un des deux pronuclei d'un œuf fécondé avant la fusion ou sur un blastocyste.

(lapin, porc, mouton, chèvre, vache mais aussi oiseau, poissons, mollusques, crevettes, drosophile)

introduction de l'ADN dans des cellules souches embryonnaires totipotentes :
cellules ES =>embryon transgénique ou chimère

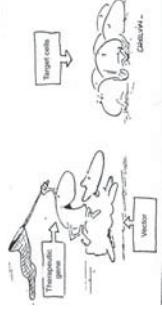


Développement précoce

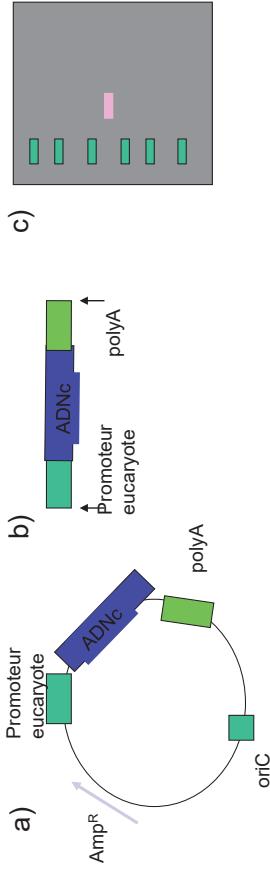


IV. Transgénèse

Préparation de l'ADN !



- Clonage de la séquence génique d'intérêt dans un vecteur d'expression (choix du promoteur, de la séquence etc ...)
- Vérification du clonage et de la conformité du transgène
- Extraction et Purification du fragment d'ADN d'intérêt à partir du plasmide
- Vérification (identité, pureté, quantité)

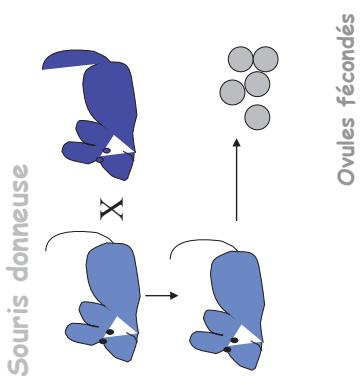


TRANGENESE ADDITIVE :

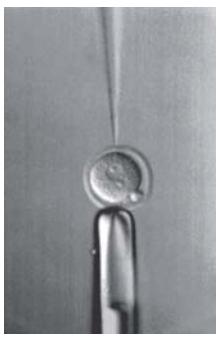


Préparation des souris, obtention des ovules fécondés

But : obtention d'ovules fécondés

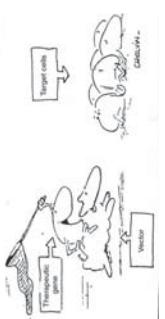


Ovules fécondés
génétiquement modifiés



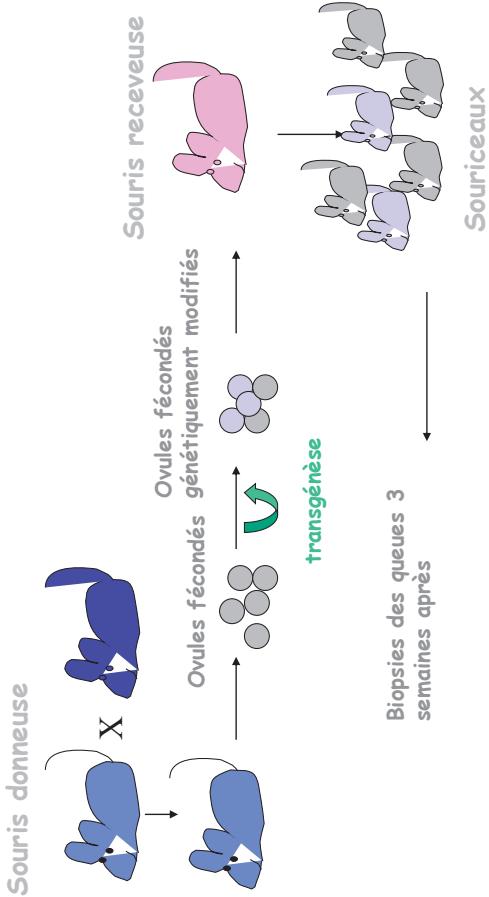
IV. Transgenese

Rétrotransplantation

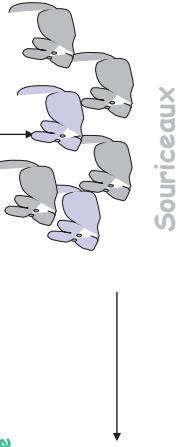


IV. Transgenese

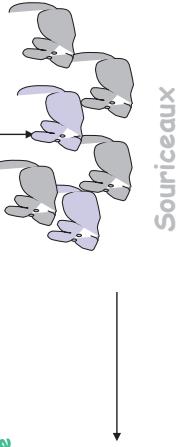
Obtention des souriceaux 3 semaines après, tests



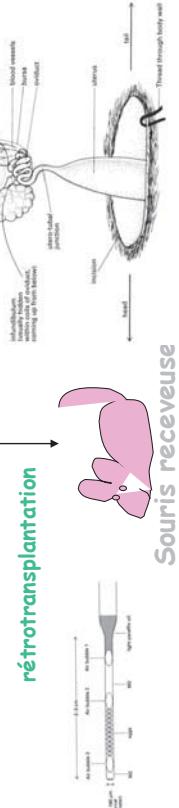
Souris donneuse



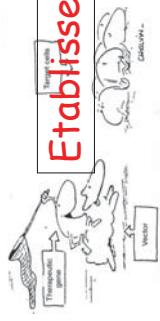
Souris receiveuse



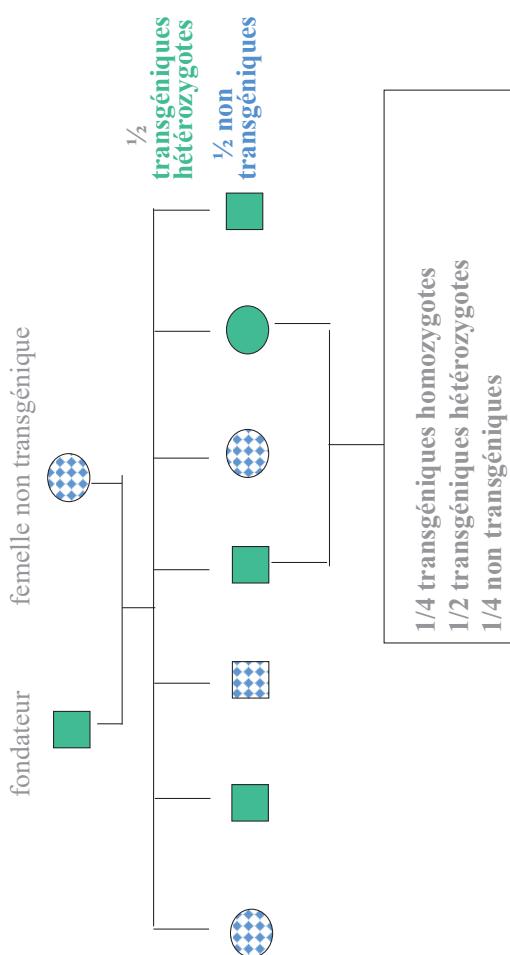
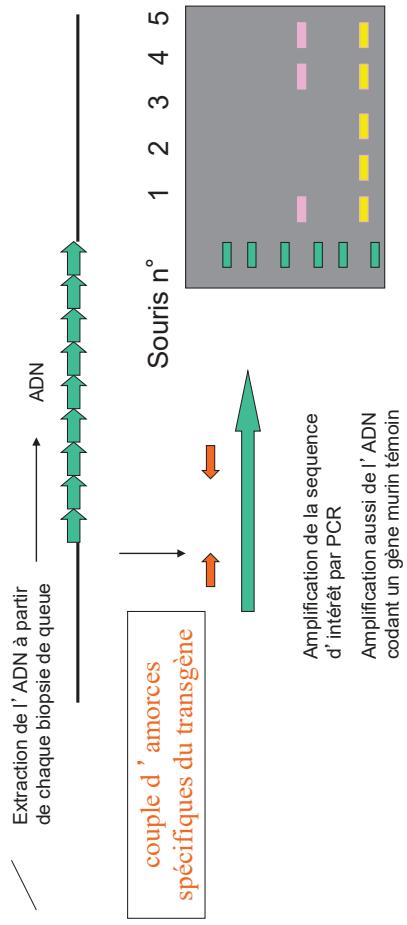
Sourceaux



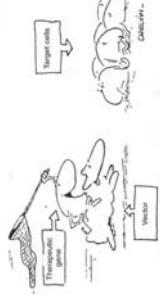
IV. Transgénese



Détection du transgène par PCR



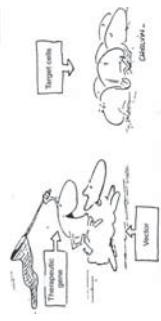
Etablissement de lignées transgéniques



IV. Transgénese

IV. Transgénese

Apport des Biotechnologies



Faire synthétiser le médicament (AAT) dans le lait d'animaux transgéniques

Brebis transgéniques

Même principe que chez la souris ici le transgène =



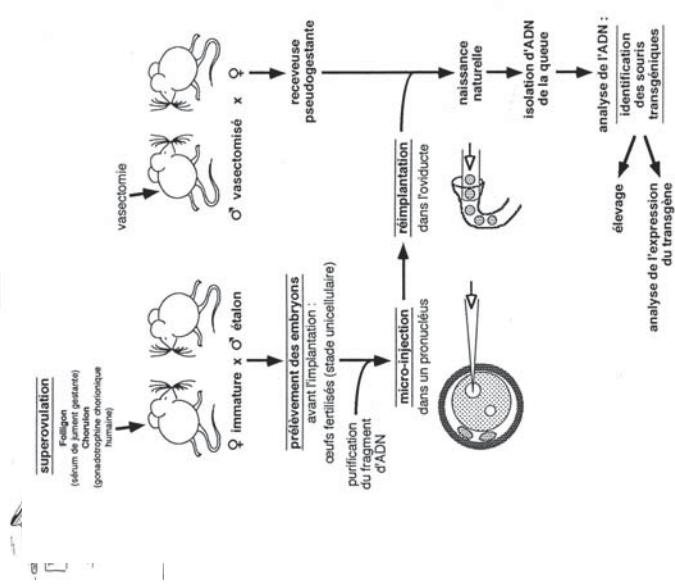
Ex. Brebis transgéniques

Production dans le lait d'un enzyme (Alpha 1 antitrypsine -AAT)

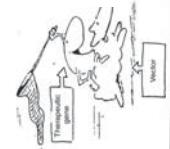
1 brebis => 300 l de lait/an - 1-3 g de AAT/l

1 brebis = 1 fermeteur cellulaire

Production de souris transgéniques résumé



NEWS



First US approval for a transgenic animal drug
Nat Biotech 2009 vol 27 number 4 302-304 **clonage thérapeutique**

Entreprise = GTC biotherapeutics

Antitrombin-a (Atryn)

En clinique en Europe depuis 2006 aux USA : 2009



Milk from GTC's transgenic goats pictured here will be used to produce Atryn, the first animal drug to be approved in the US.

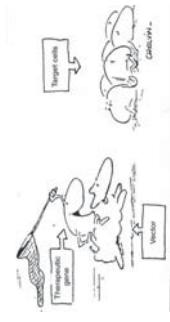
Ex. Chèvre transgénique

- * promoteur cellules mammaires spécifique, ADNc humain, poly A

- * transgénèse additive => animal fondateur

- * puis clonage reproductif !!!

IV. Transgenese



IV. Transgenese

Animaux - vache déficience immunitaire

Proteine lacoferrine

Collagène lapin alphaglucosidase

bœuf disfonction du stockage du sucre

AAT mucoviscidose

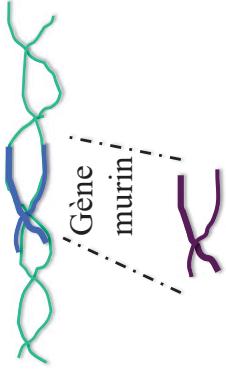
Facteur IX hémophilie

Chèvre anti coagulant (thrombose)

Proteine anti-trombine III
Anticorps !!!!!!!

recombinaison homologue

KO



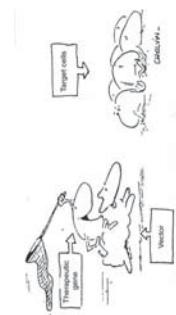
Gène codant résistance antibiotique +/- rapporteur



On remplace un gène par un autre. Cet autre sera associé à un gène codant une résistance.

On remplace un gène par un gène qui code un rapporteur => Inactivation du gène => KO

IV. Transgenese

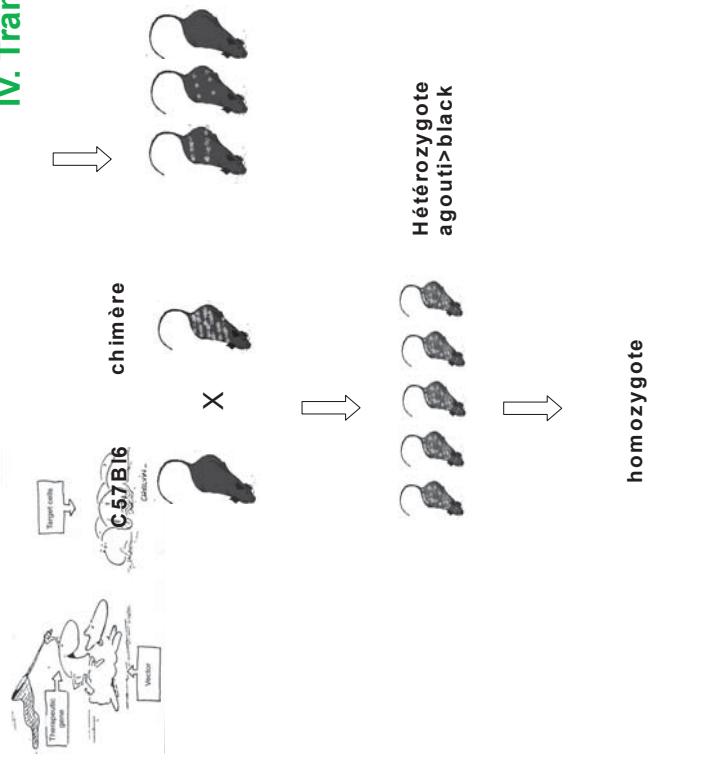
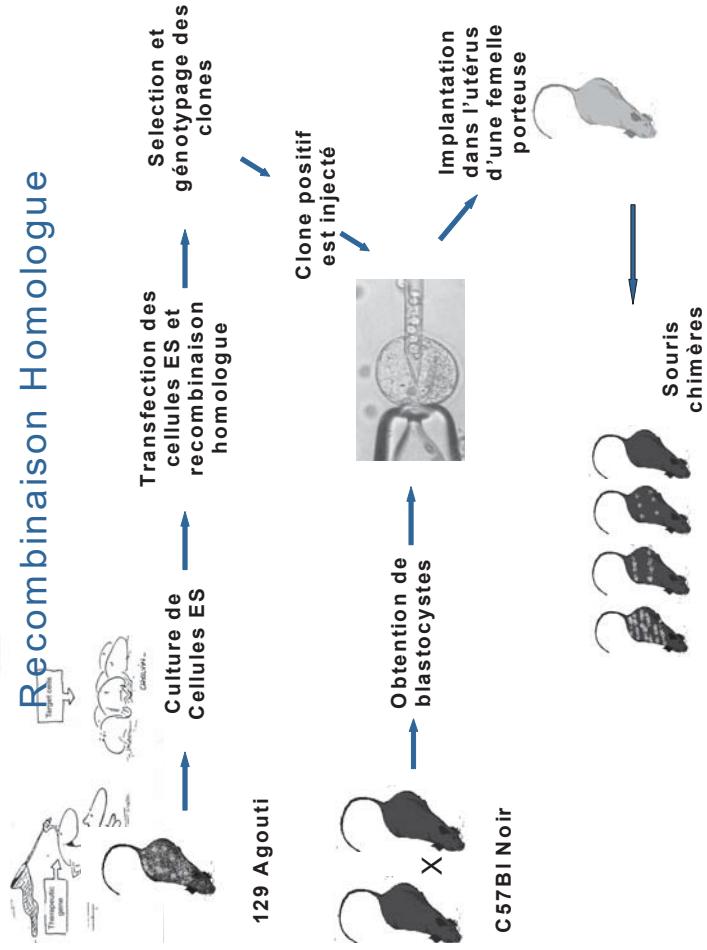


B : OBTENTION D'ANIMAUX TRANSGENIQUE PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE

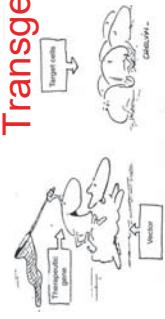
- ANIMAUX KO (knock out) : on remplace un gène murin par un autre gène (homologue humain par exemple ou gène plus actif) associé à une résistance à un antibiotique.

- ANIMAUX KO (knock out) : on remplace un gène de leur génome par un autre gène qui code une protéine rapporteur (genre résistance antibiotique et couleur) => l'idée est d'éliminer un gène du génome.

IV. Transgenèse



Transgenèse par recombinaison homologue pour quoi ?



Modèles animaux de pathologies humaines

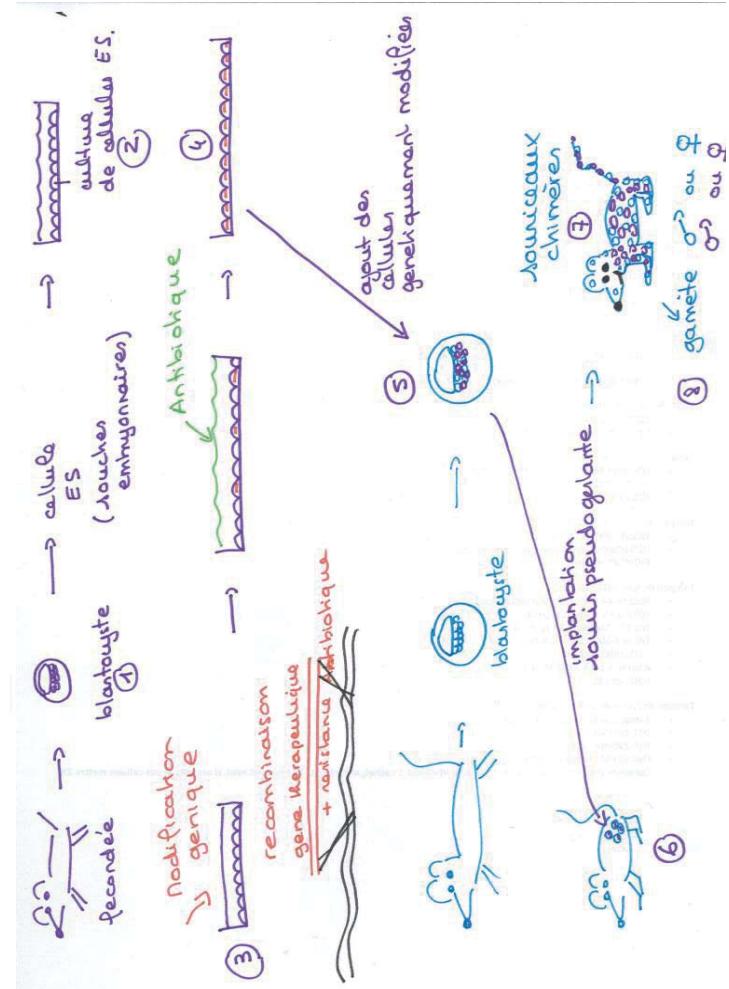
ex : promoteur organe spécifique + oncogène => Souris qui vont développer spontanément cancer de l'ovaire, du sein, du colon ...

ex : promoteur + gène voie métabolique => souris obèses, alzheimer, immunodéficientes, etc.

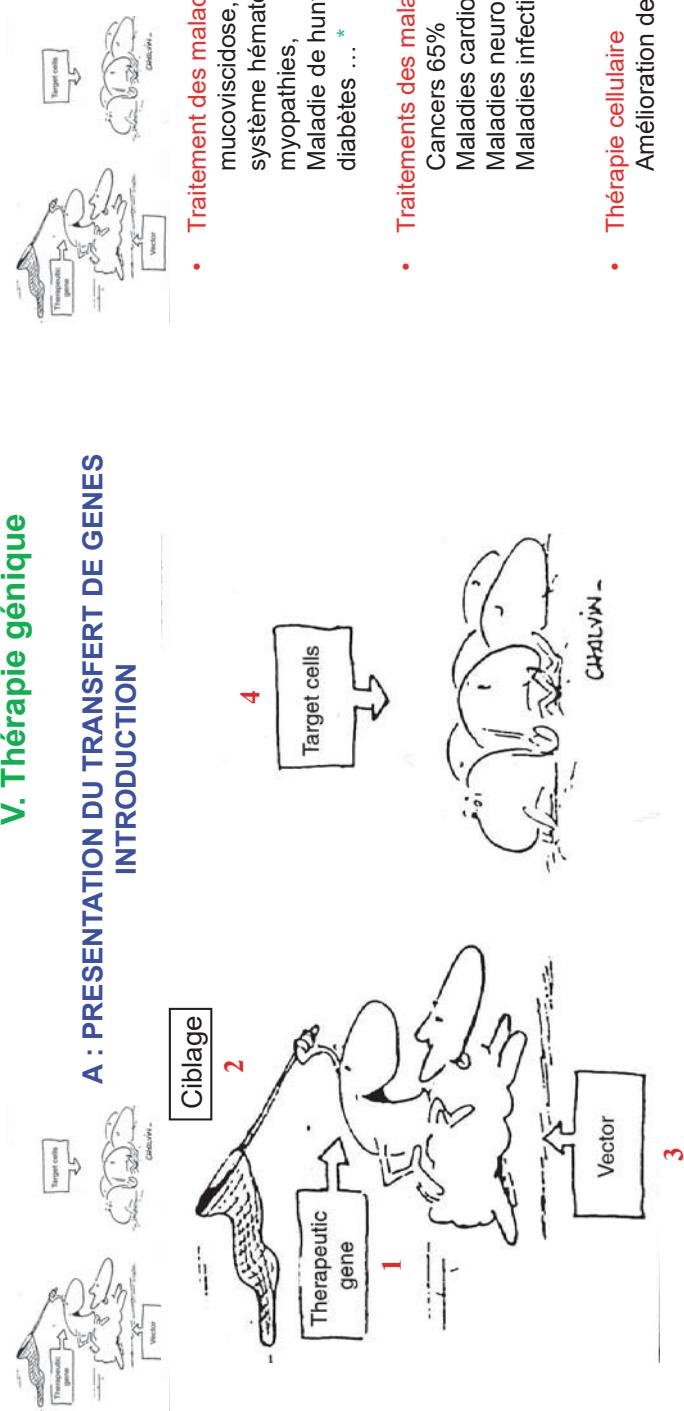
Animaux produisant des molécules thérapeutiques humaines

ex : anticorps : on remplace les gènes murins codant les immunoglobulines par les gènes humains ...

Etc.



V. Thérapie génique



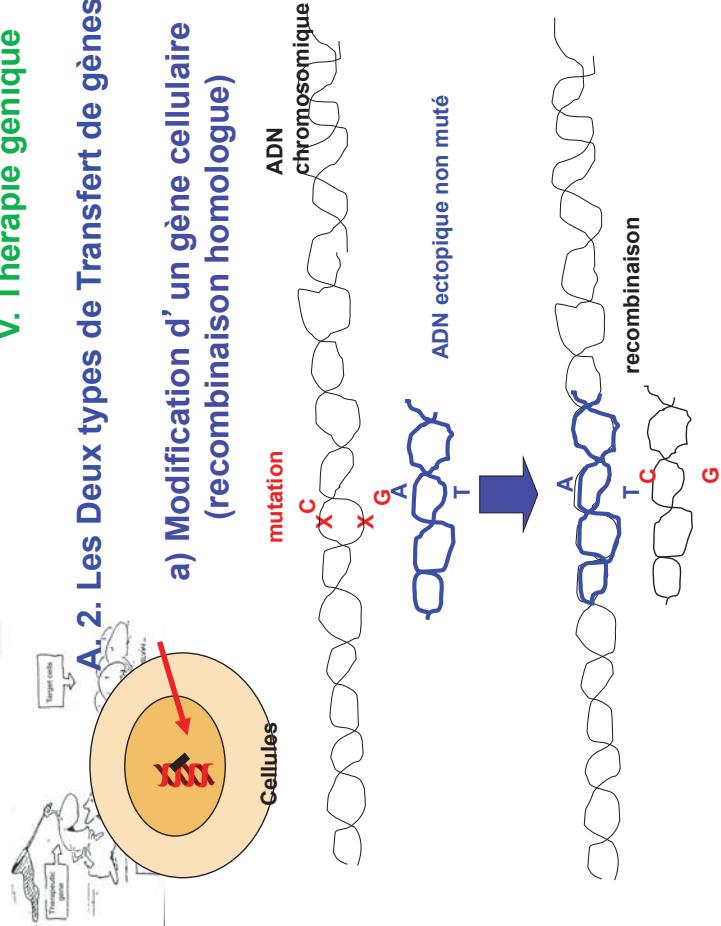
V. Thérapie génique

A. 1. QUE PEUT ON ATTENDRE DU TRANSFERT DE GENES ? Soigner ???

- **Traitements des maladies héréditaires (9%)**
mucoviscidose,
système hématopoïétique : enfants SCID, ADA
myopathies,
Maladie de huntington
diabète ... *
- **Traitements des maladies acquises (84%)**
Cancers 65%
Maladies cardiovasculaires (athérosclérose, restenose...) 9%
Maladies neurologiques (parkinson, alzheimer ...) 2%
Maladies infectieuses (HIV, Hepatite B et C, grippe ...) 8%
- **Thérapie cellulaire**
Amélioration des cellules souches, cellules mesenchymateuses ...

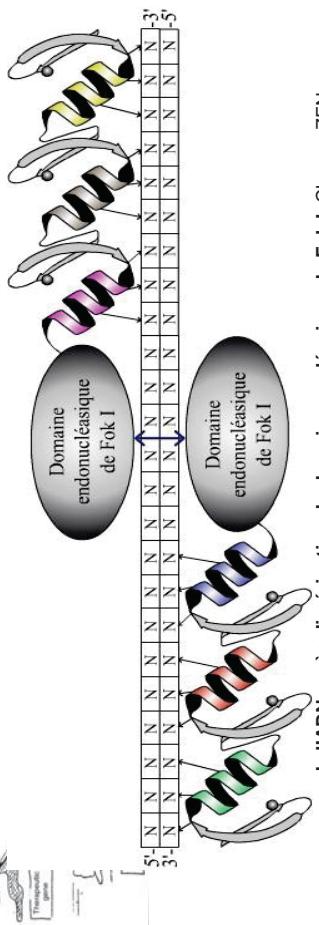
V. Thérapie génique

A. 2. Les Deux types de Transfert de gènes (recombinaison homologue)



- 1) Détection du site précis de la mutation par des protéines en doigts de zinc = structures de reconnaissance de l'ADN.
- 2) En fonction de la nature des acides aminés qui les composent (hors les cystéines et histidines liant l'atome de zinc), une séquence spécifique d'ADN de trois nucléotides sera reconnue. En utilisant deux protéines comportant chacune trois doigts de zinc pouvant être individuellement choisis, la reconnaissance s'effectue sur une séquence spécifique de dix-huit nucléotides. Un rapide calcul de probabilité établit qu'une séquence aléatoire de dix-huit nucléotides n'a pratiquement aucune chance d'exister à plus d'un exemplaire dans un génome de cinq milliards de nucléotides correspondant au génome humain. En conséquence, par cette méthode on peut cibler de manière spécifique et unique une séquence d'intérêt connue (par exemple un gène muté...).

Recombinaison homologue : est ce possible ? Oui in vitro !



coupe de l'ADN après dimérisation du domaine nucléasique de Fok I. Chaque ZFN reconnaît une séquence de neuf nucléotides séparés par six nucléotides, un espace nécessaire pour l'action de l'endonucléase. Cette action n'est possible qu'après dimérisation de cette dernière.

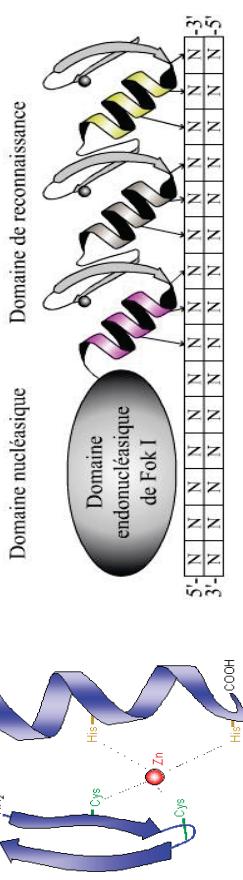


schéma d'une ZFN (Zinc Finger Nuclease). Chaque doigt de zinc reconnaît trois nucléotides spécifiques. Une protéine comportant trois doigts de zinc en tandem permet donc de reconnaître une séquence spécifique de neuf nucléotides. A ce domaine de reconnaissance, on a couplé le domaine endonucléasique de l'enzyme Fok I.

Françoise Ibarraido
Illustration et mise en ligne : Gilles Camus

Traitement de patients atteints du VIH par des cellules souches résistantes

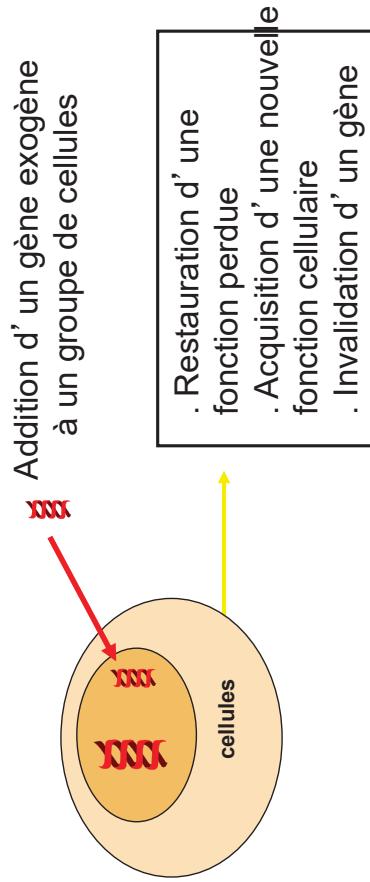


HSC → lymphocytes → HIV
HSC → macrophages → HIV

- Il a été montré que les cellules ayant un récepteur CCR5 muté (CCR5D32) étaient résistantes à l'infection par le HIV (Hutter et al. New England J Medecine)
- D'où l'idée de faire une recombinaison homologue entre le CCR5 des cellules du patients et le CCR5D32
- 1er essai sur la souris (récepteur CD34+) : on peut soigner des souris infectées en ayant seulement 20 % de cellules transduites.
- Essai clinique : 6 patients contrôlés par HAART, une seule injection de 109 cellules modifiées, 12 semaines sans traitements anti viral
- Patients guéris: réponse proportionnelle à la quantité de CD4+ CCR5D32 biallelique dans le sang

V. Thérapie génique

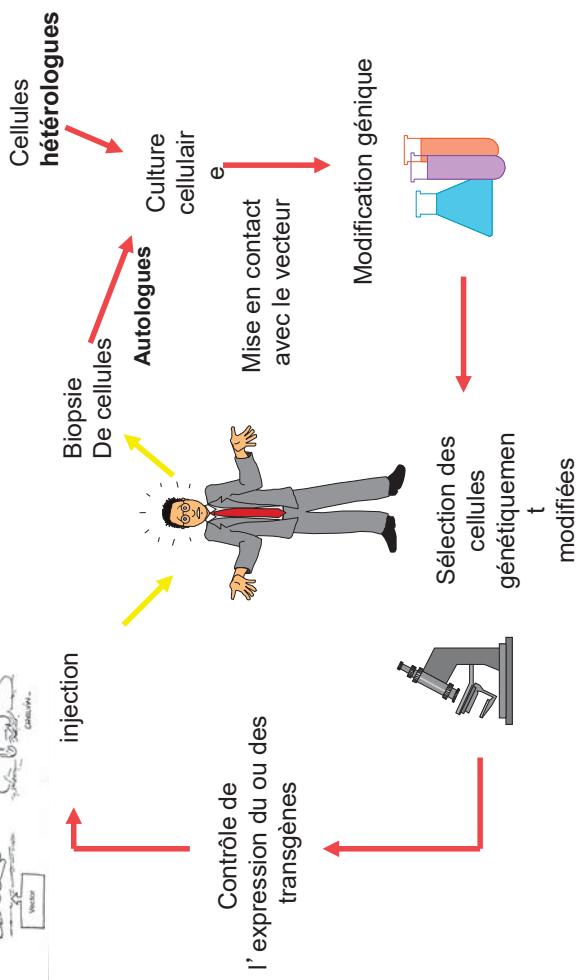
b) Addition d'un nouveau gène



- Restauration d'un gène exogène à un groupe de cellules
- Acquisition d'une nouvelle fonction perdue
- . Acquisition d'une nouvelle fonction cellulaire
- . Invalidation d'un gène

Françoise Ibarraido
Illustration et mise en ligne : Gilles Camus

PRINCIPE DE LA THÉRAPIE GENIQUE EX VIVO

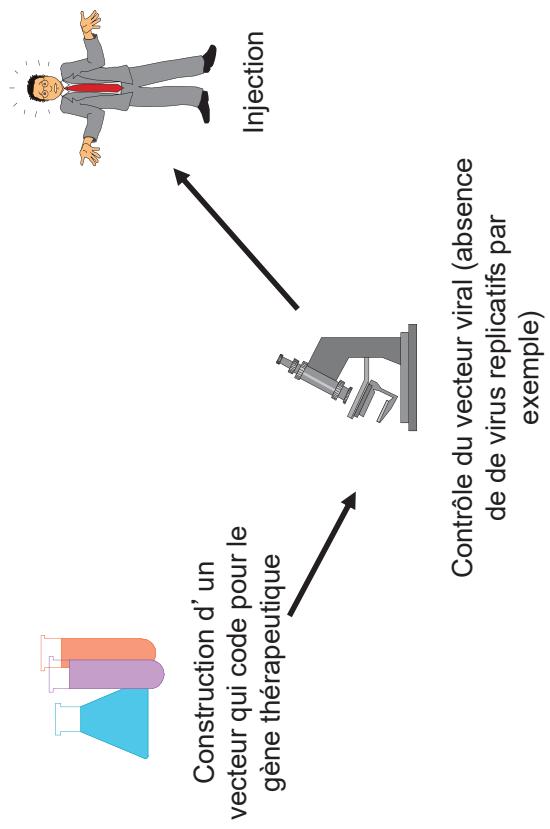


V. Thérapie génique



- 1) ADN (ARN) nu : MÉTHODE « NATURELLE »
- 2) MÉTHODES PHYSIQUES
ELECTROPOORATION
GENEGUN
- 3) VECTEURS SYNTHÉTIQUES
- 4) VECTEURS VIRAUX

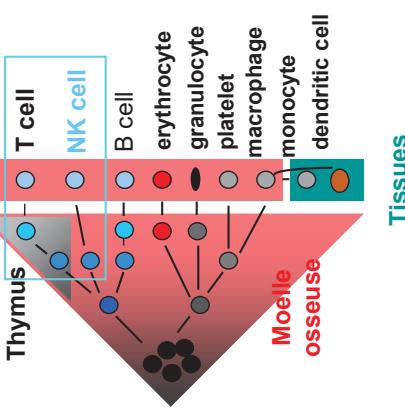
PRINCIPE DE LA THERAPIE GENIQUE IN VIVO



Traitement des enfants présentant un déficit SCID X-1 γ C sévère



Maladie héréditaire, liée à l'X, mutation du gène codant la sous unité γ du récepteur aux cytokines 2, 4, 7, 9, 15 et 21 (IL2, IL4, IL7, IL15, IL21 récepteur)



- Blocage précoce de la différenciation des lymphocytes T et NK
- absence des fonctions des T-, NK- B

La recombinaison homologue

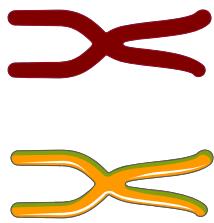
Mécanisme essentiel à tous les organismes



Application en recherche: transgénèse

Définition de la recombinaison homologue

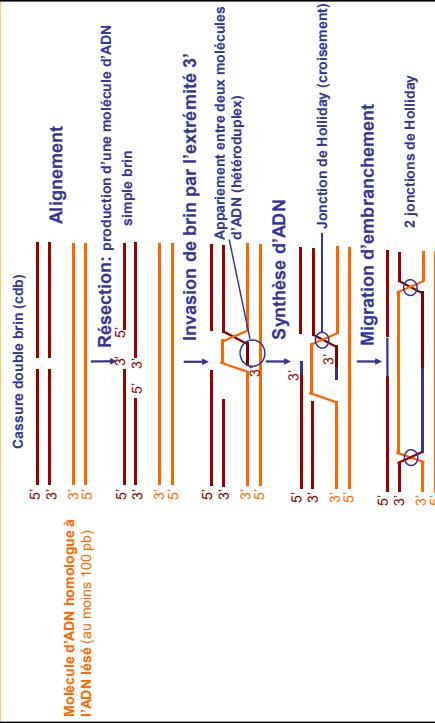
Échange de fragments d'ADN entre deux molécules au niveau de séquences nucléotidiques homologues.



Chez les eucaryotes, elle a lieu en phase S tardive, G₂ et M et en méiose. On la distingue à recombinaison site-spécifique qui est réalisée entre 2 séquences reconnues par des enzymes spécifiques (ex: systèmes Cre-lox).

2

Réparation des cdb de l'ADN par recombinaison homologue



卷之三

Durant la méiose

Réparation des cassures d'un bâton de l'ADN (cdh)

卷之三

Leurre: principal mécanisme de réparation

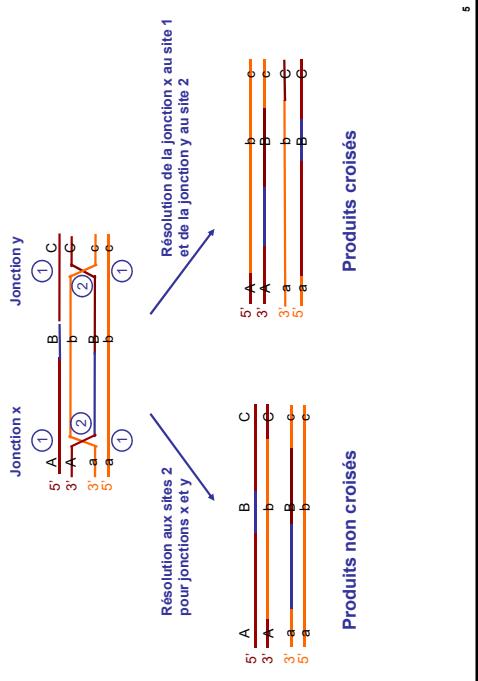
Débloquer les fourches de

10 of 10

MAINTIEN DE L'INTEGRITE DU GENOME

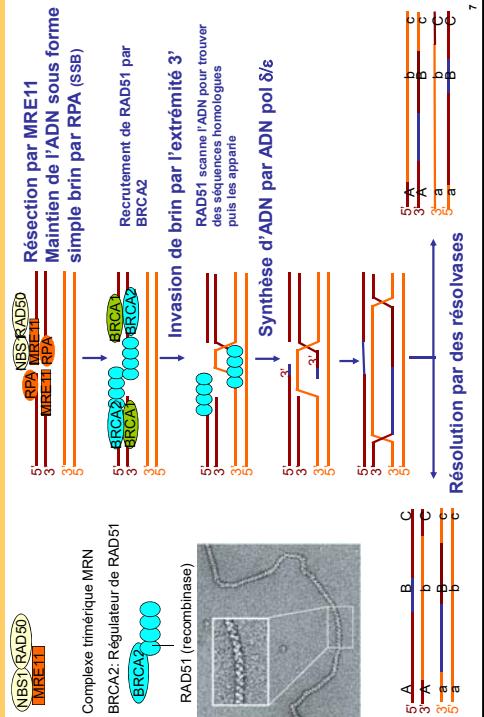
VARIABILITE GENETIQUE

Résolution de la jonction de Holliday



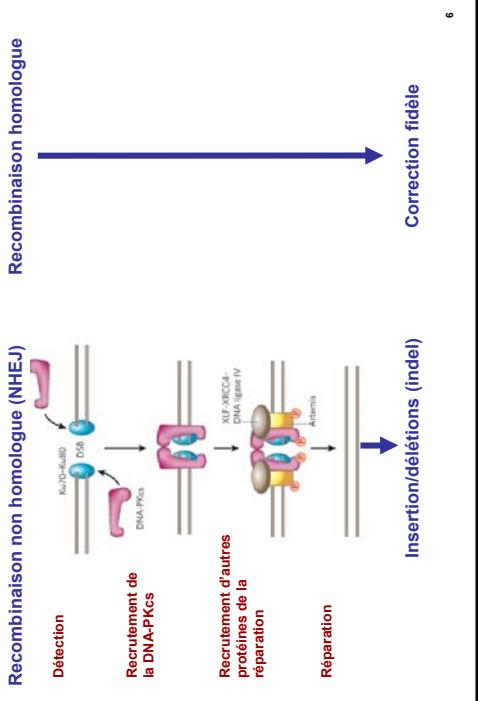
5

Protéines humaines de la recombinaison homologue



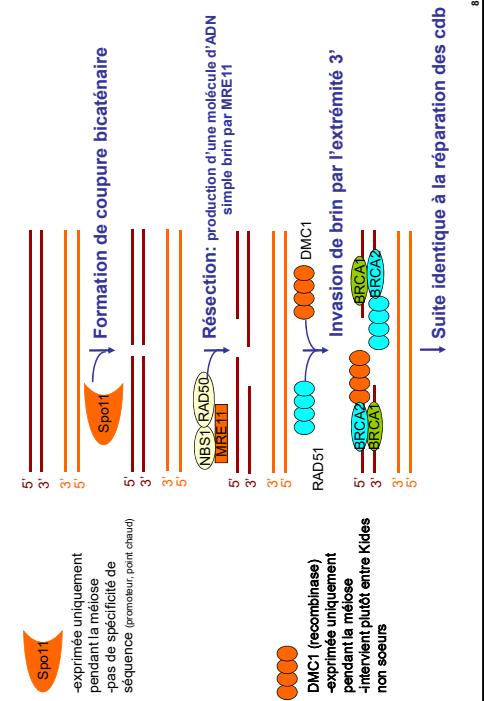
7

Existence de deux systèmes de réparation des cdb



6

Recombinaison homologue au cours de la méiose



8

Pathologie liée à un défaut de recombinaison homologue: la prédisposition génétique au cancer

Une prédisposition génétique augmente le risque de développer une maladie.

- Génomes BRCA1, 2 (BRCA1 et BRCA2 sont des gènes de susceptibility au cancer)
- 1990: découverte du gène BRCA1 par Marie-Claire King
- 1995: découverte du gène BRCA2

En France, 2 femmes sur 1000 sont porteuses de mutations sur l'un de ces gènes.

Altération génotypique constitutionnelle de :	BRCA1	BRCA2
Risques de cancer des seins avant 70 ans :	51 à 75 %	23 à 54 %
Risques de cancer de l'ovaire avant 70 ans :	22 à 51 %	4 à 10 %
Risques de cancer des seins avant 45 ans :	25 à 45 %	7 à 20 %
Risques de cancer de l'ovaire avant 45 ans :	10 %	1 %

9

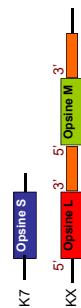
Pathologie liée à un défaut de recombinaison homologue: le daltonisme



Vision normale
Vision d'un type de daltonien

- 1 % des hommes sont « aveugles » pour le rouge et le vert
- 2 % des hommes sont « aveugles » au vert
- 8 % des hommes ont une mauvaise discrimination entre le rouge et le vert

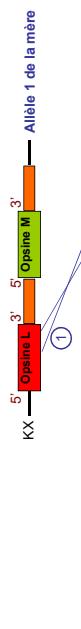
Gènes de la vision des couleurs chez l'homme:



Opine L et opine M sont des gènes en tandem et homologues à 96 %. Ces gènes proviennent d'un gène ancestral qui a été dupliqué. Région en 3' intergénique a aussi été dupliquée.

10

Crossing-over entre deux régions intragéniques



Allèle 1 de la mère

Allèle 2 de la mère

Chimère rouge-vert inactif

Chimère vert-rouge inactif

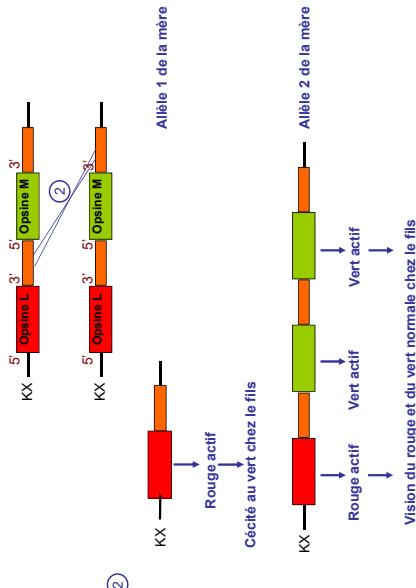
Rouge actif

Vert actif

Vision du rouge et du vert normale chez le fils

11

Crossing-over entre deux régions intergéniques



Allèle 1 de la mère

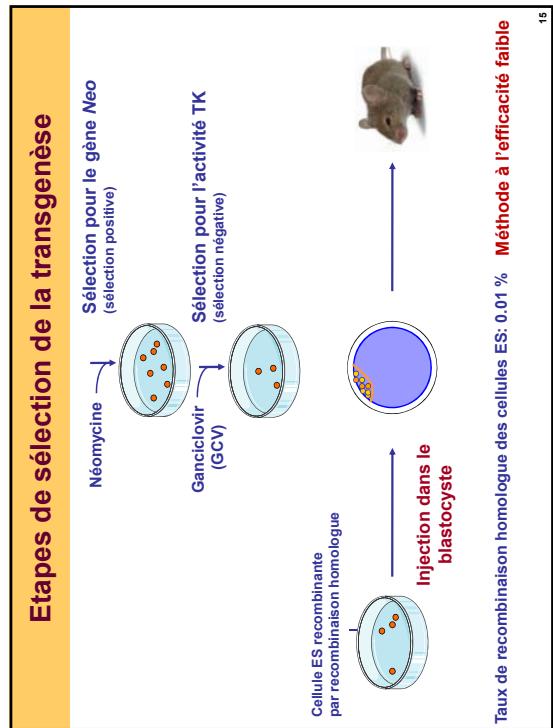
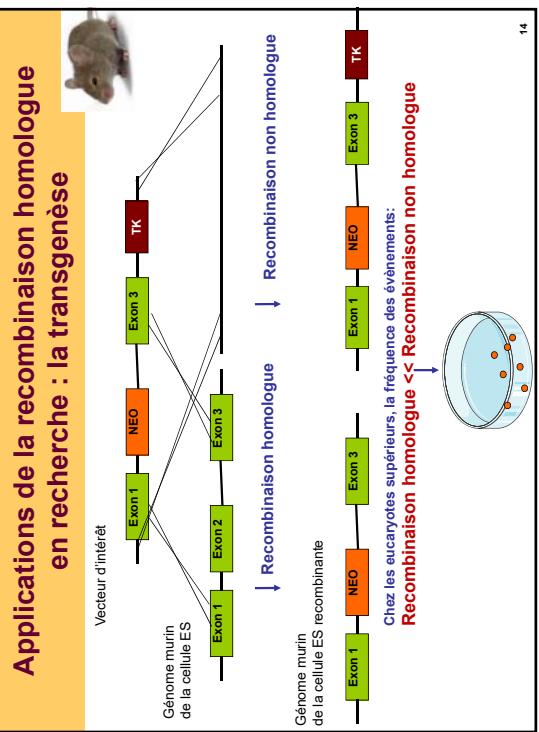
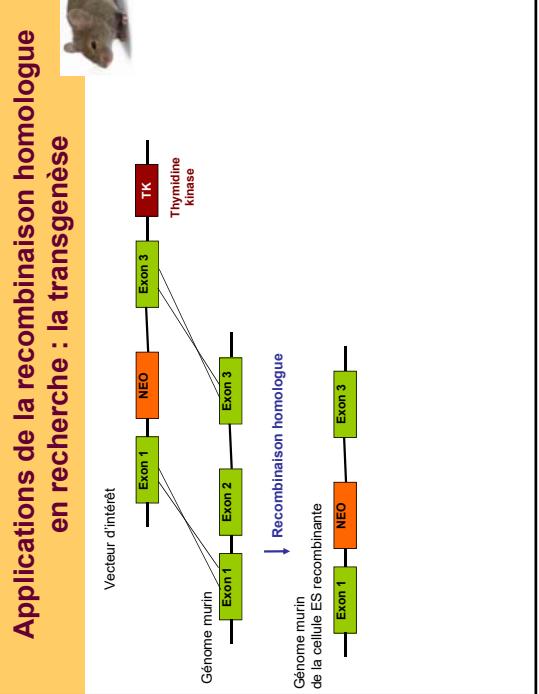
Allèle 2 de la mère

Rouge actif

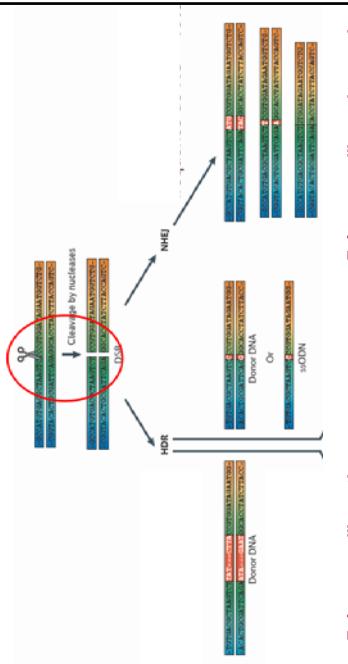
Vert actif

Vision du rouge et du vert normale chez le fils

12



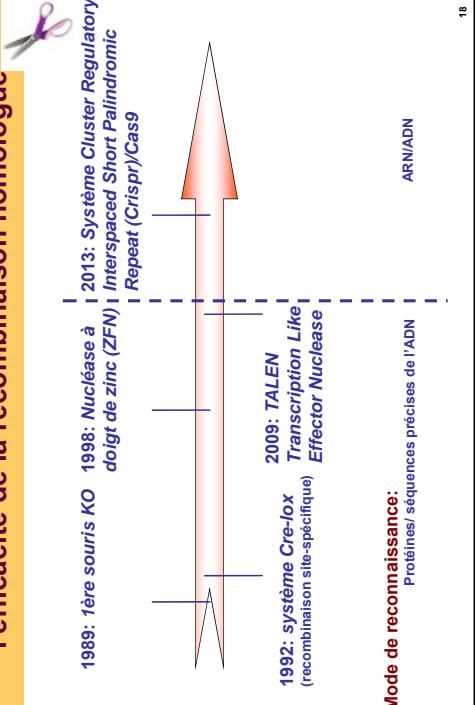
Si on coupe l'ADN du gène cible par des nucélasées, augmentation de la fréquence d'insertion par RH



Fréquence d'insertion par recombinaison non homologue > 10 %

17

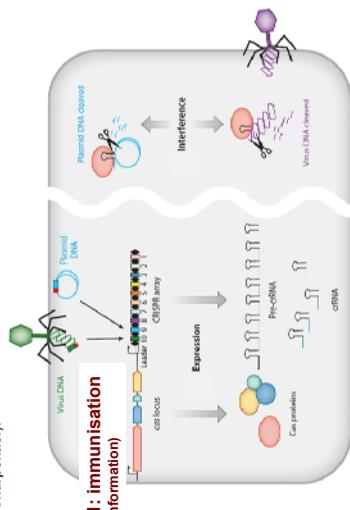
Historique des nouvelles stratégies pour augmenter l'efficacité de la recombinaison homologue



18

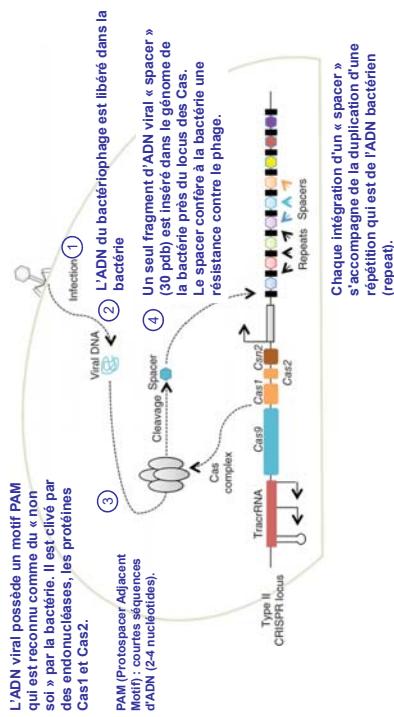
Le système CRISPR/Cas chez la bactérie : un mécanisme immunitaire adaptatif

Découvert dans les années 2000 (Drs Martinez Mojica, Jansen, Pociell, Bolotin, Bröns, Van der Oost, Charpentier).



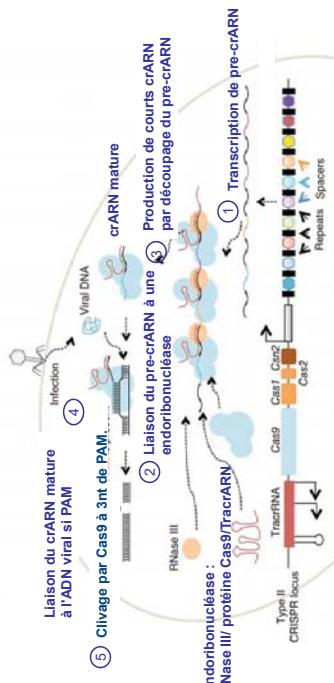
19

La phase 1 du système CRISPR/Cas: immunisation



20

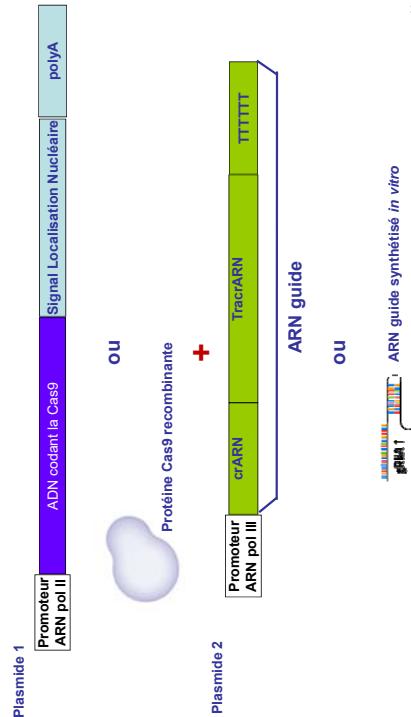
La phase 2 du système CRISPR/Cas: Immunité subdivisée en expression (étapes 1 à 3) puis interférence (étapes 4-5)



21

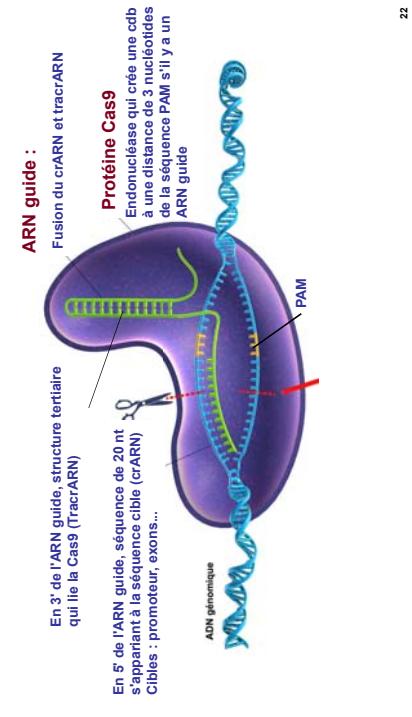
Reconstitution du système CRISPR/Cas9

Transfection (électroporation, lipidique...) des cellules par :



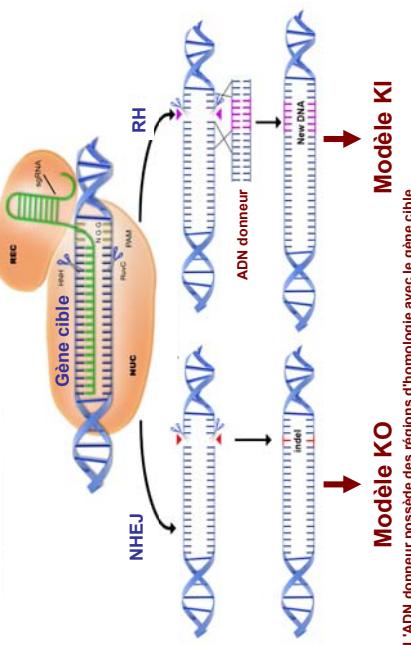
23

Reconstitution du système CRISPR/Cas9 pour créer une cible de l'ADN sur un gène cible

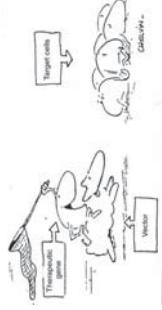
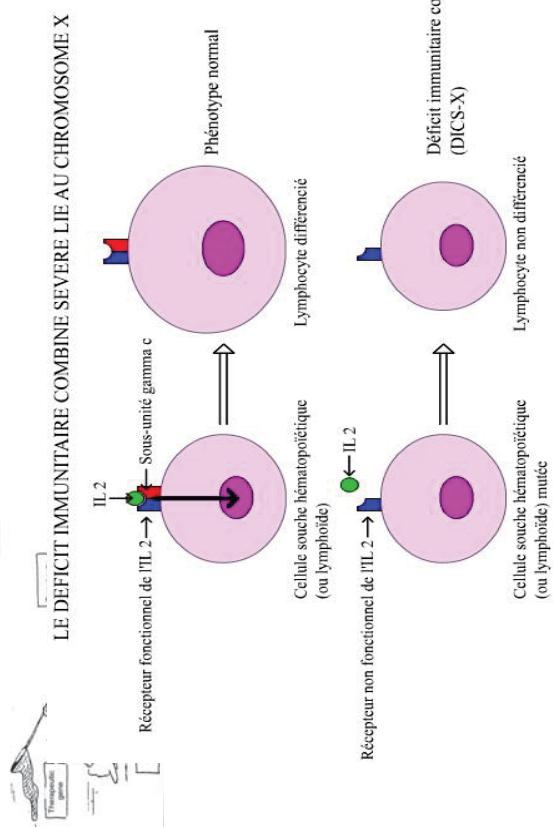


22

Le système CRISPR/Cas9 est réparé par 2 systèmes ce qui permet d'obtenir 2 types de transgénèse



24

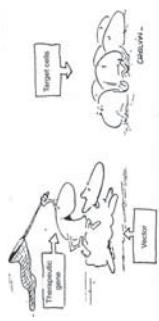


<http://sciences.blogs.liberation.fr/home/2009/11/succ%C3%A8s-d'une-th%C3%A9rapie-g%C3%A9nique-sur-le-cerveau.html>

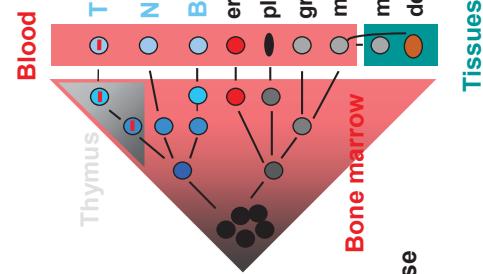
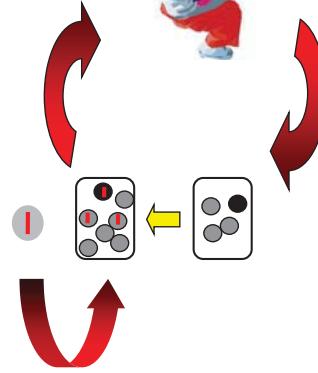
Traitements possibles

- transplantation de moelle osseuse
 - * si donneur HLA compatible : 90 % survie mais cela concerne 30 % des enfants
 - * si pas de donneur compatible (père ou mère) : 30 % de survie médiane avec séquelles importantes
 - Thérapie génique

Protocole



γ_c -chain retroviral vector



- L'expression de la sous unité γ C du récepteur et la différenciation des LT et A** a été obtenu après transfert de gènes chez la souris γ C -.
- L'expression à long terme de la sous unité γ C du récepteur a été obtenu apr Transfert de gènes dans les cellules CD34+ canines.**
- Pertinence de la stratégie**
Avantages sélectifs des cellules génétiquement modifiées : après interaction sous unité γ C du récepteur avec IL-7 et IL-15,
- Signaux prolifératifs et de survie aux NK et aux LT.**

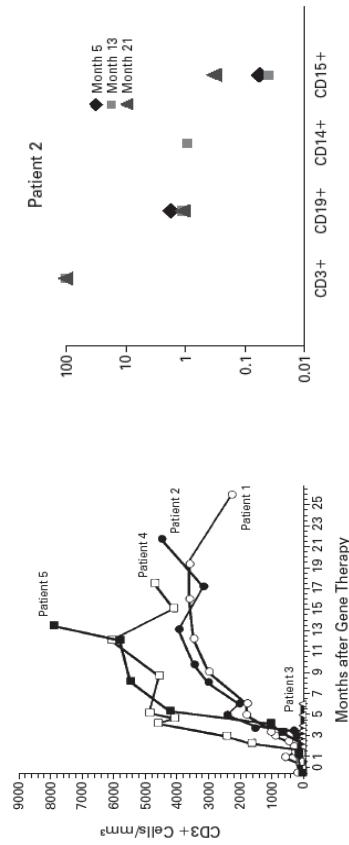
Protocole clinique



Evaluation de l'expression du transgène
PCR, RT-PCR : transgène détecté sur tous les patients
Immunofluorescence sur LT prélevés de patients

Prolifération des LT en présence de PHA ou anti CD3
Vaccination des enfants contre le tétanos, la poliomérite, le BCG : évolution de la prolifération des LT
Détection des anticorps anti-tétanos, polio etc IgG, IgM ...
Sortie des enfants du confinement stérile à J = 100 environ
Retour à la maison et scolarisation

The New England Journal of Medicine



11 patients traités de moins de 1 an
100 % des LT et des NK ont le transgène
1 copie/cellule
1 % des LB et des monocytes ont le transgène
0,1 % des polynucléaires
10/11 sont guéris de leur pathologie

PACES UE8

1- Le Système immunitaire inné (non spécifique)

- Barrières naturelles de surface : peau + muqueuses
- Cellules de défense du tissu conjonctif :

Phagocytes résidents: les macrophages

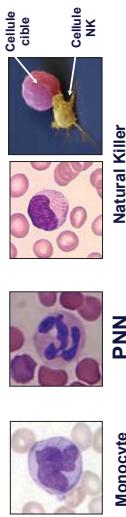
Phagocytes recrutés: polynucléaires neutrophiles, macrophages

- Lymphocytes tueurs : NK (Natural Killer), NKT, T₁γδ

Médiateurs solubles (système du complément, cytokines)

- La reconnaissance **sélective** du « non soi »:

PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) (ex. LPS)
PRR (Pattern Recognition Receptors) (ex. Toll-like receptors, TLR4)



Immunoanalyse

- A- Introduction à l'immunologie
- B- Préparation des réactifs d'immunoanalyse
- C- Principes et techniques d'immunoanalyse
- D- Immunoanalyse appliquée à la réponse immunitaire à médiation cellulaire
- E- Immunologie, maladies et traitements

Bruno Séguin
Professeur de Biologie Cellulaire
Service de Biologie cellulaire, Hématologie, Immunologie
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Université Paul Sabatier, Toulouse III

A- Introduction à l'immunoanalyse

I- Le système immunitaire (S.I.)

Ensemble des mécanismes de défense et de protection de l'organisme contre des éléments indésirables.

Le S.I. participe à la préservation du « soi » :

- 1- Il reconnaît et tolère le « soi ».
- 2- Il reconnaît et élimine le « non-soi » (les constituants étrangers).
- 3- Il reconnaît et élimine le « soi altéré ».

Le S.I. fait intervenir:

- 1- les **leucocytes** (globules blancs), cellules d'origine hématopoïétique
- 2- des **molécules solubles** (complément, cytokines, anticorps)

Le S.I. est constitué:

- 1- d'une **composante innée** (immédiate et non spécifique, mémoire immunitaire)
- 2- d'une **composante acquise** (spécifique, mémoire immunitaire)

Déregulation du S.I. et **pathologies**:

- 1- Maladies auto-immunes; le S.I. réagit contre le soi
- 2- Maladies infectieuses; le S.I. n'élimine pas efficacement le soi altéré
- 3- Cancers; le S.I. n'élimine pas efficacement le soi altéré

2- Système immunitaire acquis ou adaptatif (spécifique)

- Immunité à médiation humorale (anticorps ou immunoglobulines):

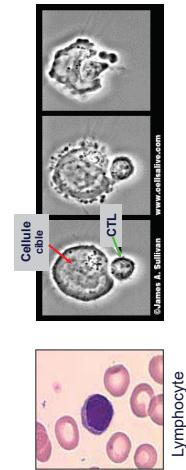
Lymphocyte B, Plasmocytes.

- Immunité à médiation cellulaire :

Lymphocytes T cytotoxiques (CTL = Cytotoxic T Lymphocyte)

Lymphocytes T sécrétaires de cytokines (LT auxiliaires/helpers).

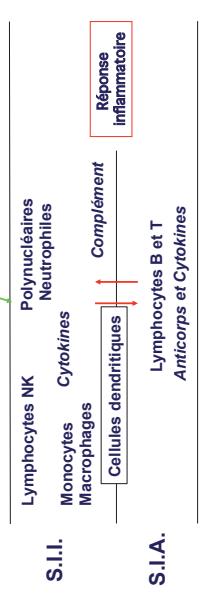
- La reconnaissance du « non soi » se fait par des récepteurs d'expression clonale : les BCR (B Cell Receptors) et les TCR (T Cell Receptors)
- Mémoire immunitaire



Lymphocyte

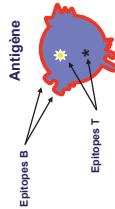
3- coopération entre le système immunitaire inné et acquis

Agression

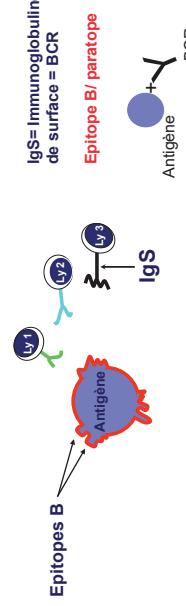


II- Les Antigènes

- Structure moléculaire (protéique ou non) reconnue par le BCR ou le TCR.
- L'**antigénicité**: capacité de l'antigène à être reconnu.
- L'**immunogénicité**: capacité de l'antigène à induire une réponse immune spécifique.
- L'antigène est constitué de plusieurs **épitopes**, petits motifs moléculaires reconnus par le TCR ou le BCR.
- Les épitopes T sont différents des épitopes B.

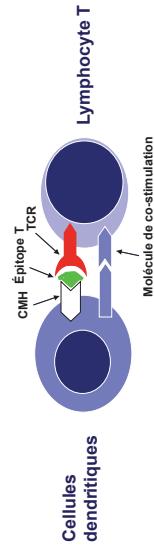


2- Épitopes B

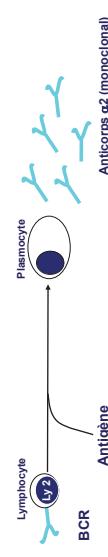
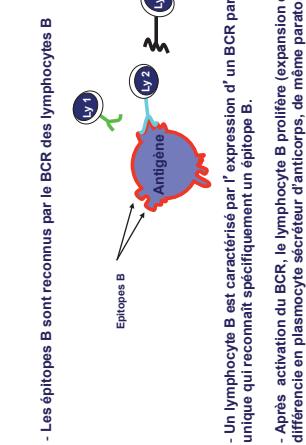


1- Épitopes T

- L'**épitope T** est séquentiel :
 - Reconnaissance après dégradation de l'antigène protéique natif en peptides (épitopes T) par des cellules présentatrices d'antigènes (ex. cellules dendritiques)
 - Présentation des épitopes T par les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité » (CMH)
 - Reconnaissance du complexe « épitope T/CMH » de la cellule dendritique par le TCR du lymphocyte T.

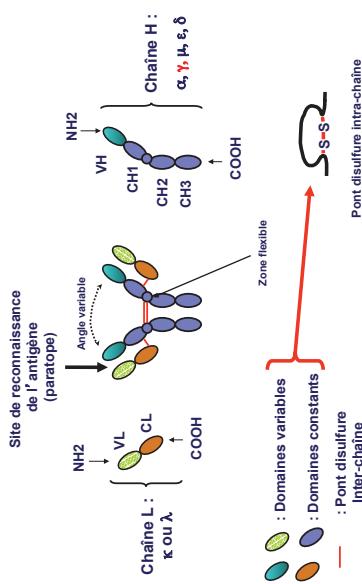


Prolifération (Expansion clonale) puis différenciation

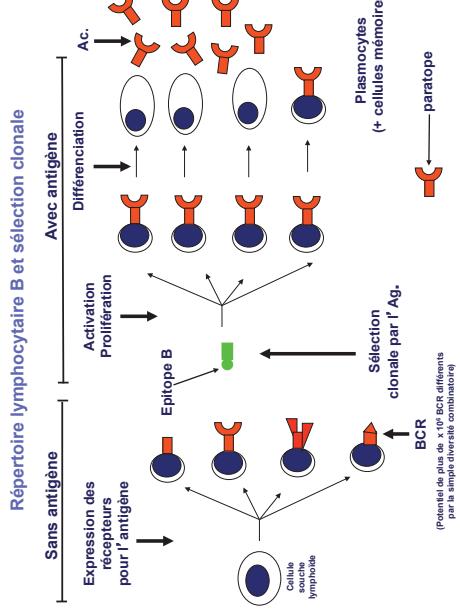
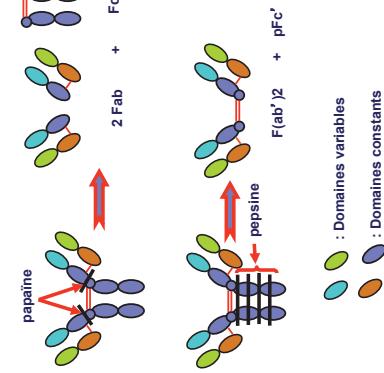


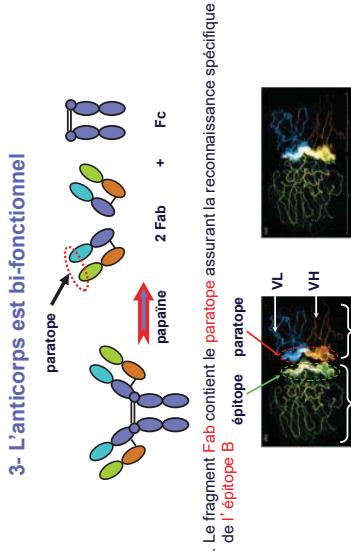
III- Les Anticorps

1 - Structure plane de l'IgG (Ig de type G)



2- Traitement enzymatique des IgG





Le fragment **Fab** contient le **paratope** assurant la reconnaissance spécifique de l'**épitope B**

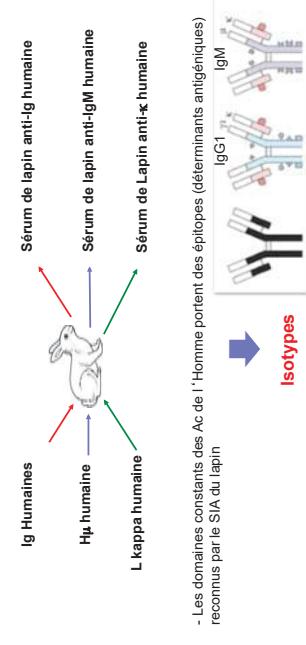
- L'anticorps (ou le BCR) reconnaît l'antigène **sous sa forme native**
- La partie **Fc** de l'anticorps porte des **sites fonctionnels non spécifiques de l'antigène** : activation du complément ou de récepteurs Fc

4- Les différentes classes d'anticorps

Classe S-classe	Masse kDa	Sédimen- tation	Valence avec Ag	plasma (g/L)	Demi-vie (J)	paratope	paratope
IgG1	150	7	2	65%	21		
IgG2	150	7	2	25%	20		
IgG3	170	7	2	8%	7		
IgG4	150	7	2	2%	21		
IgG							
IgM	950	19	10	1,5	5		
IgA1	160/400	7-14	2 ou 4	1,8	6		
IgA2	160/400	7-14	2 ou 4	0,2	6		
IgE	190	8	2	<200µg/L	2,5		
IgD	190	7	2	35mg/L	3		

5- Antigénicité des anticorps

- Les Ig d'une espèce sont des antigènes pour une autre espèce.



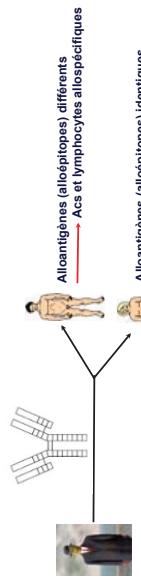
- Les domaines constants des Ac de l'Homme portent des épitopes (déterminants antigéniques) reconnus par le SIg du lapin

Déterminants antigéniques d'une immunoglobuline caractéristique de tous les individus d'une espèce donnée.
Les isotypes déterminent les différentes classes et sous-classes d'immunoglobulines.

5- Antigénicité des anticorps

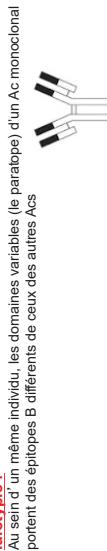
Allotype :

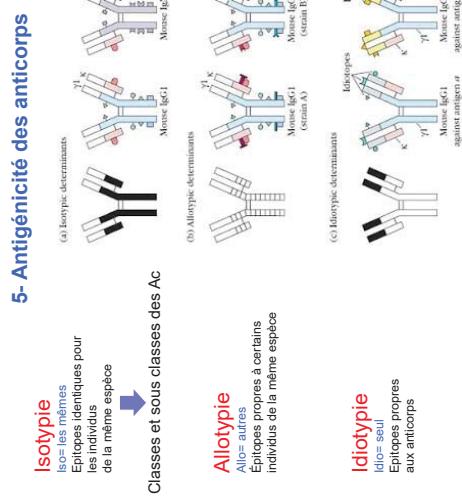
- Les Ig d'un individu peuvent porter des déterminants antigéniques pour un autre individu de la même espèce: allotypes (alloantigènes)



Acs et lymphocytes allospécifiques

→ pas de réponse immune acquise

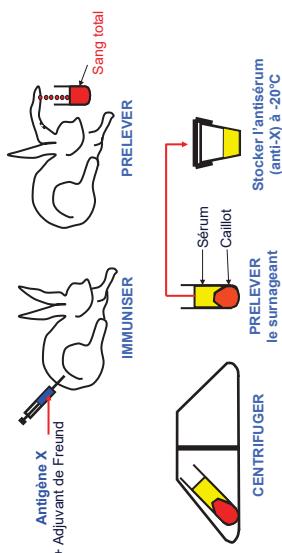




B- Préparation des réactifs d'immunoanalyse

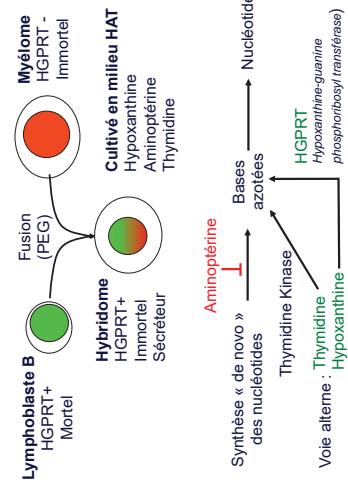
- 1- Anticorps :**
polyclonaux (antisérum) ou monoclonaux.
marqués, ou non.
liés à des supports, ou non.
- 2- Antigènes :**
solubles, ou non (cellules, particules).
liés à des supports, ou non.

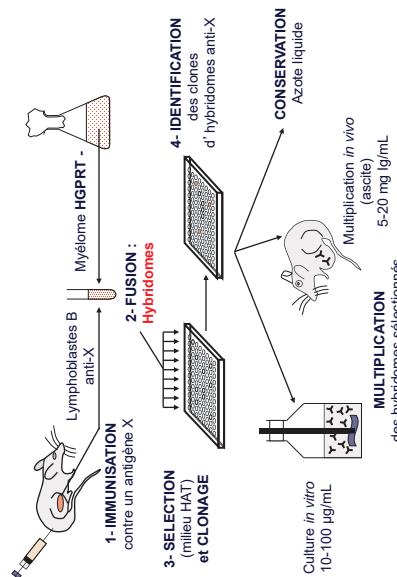
I- Préparation d'un antisérum (Ac polyclonaux)



II- Préparation d'un anticorps monoclonal

1- Génération d'hybridesomes





2- Anticorps monoclonaux de souris modifiés par génie génétique

Génie génétique :

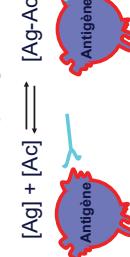
*Domaines variables « souris » + parties constantes « humaines »

**Paratope souris + autres parties humaines



III- La réaction antigène-anticorps

1- Caractéristiques générales



$$K_A = \text{Constante d'équilibre}$$

$$K_A = \frac{[Ag-Ac]}{[Ag][Ac]}$$

- Spécifique, réversible, exothermique
- Liaisons non covalentes (hydrogènes, hydrophobes, Van der Waals, ioniques)
- Spécificité dépend de la complémentarité conformationnelle entre épipole et paratope
- L' **affinité** d'un Ac résulte de la sommation des forces attractives et répulsives et dépend du niveau de complémentarité stérique entre un épipole et un paratope
- L' **avidité** d'un antiserum dépend de l'affinité des différents anticorps présents dans le sérum = somme des affinités des différents anticorps.

3- Anticorps monoclonaux humains

- Immunisation chez l'homme
Lymphocytes B transformés par EBV
Fusion avec myélome murin : hétéromyélome homme-souris
- Sélection des hybrides sécrétants
- Technique du « phage display »



- Souris transgéniques productrices d'Ig humaines

2- Caractéristiques moléculaires conditionnant la réaction Ag-Ac en immunoanalyse

a- Valence des anticorps et des antigènes

Un anticorp est une molécule soluble qui peut être :

- divalente (IgG, IgA, IgE),
- tétravalente (IgA-dimériques)
- décavalente (IgM, en pratique pentavalent)

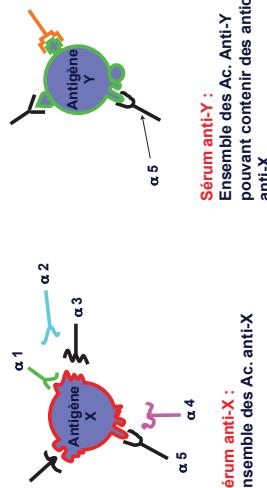
Un antigène peut être :

- monovalent (1 épitope pour un AcM)
- multivalent (plusieurs fois le même épitope)
- multiepitopiques (plusieurs epitopes différents)



2- Caractéristiques moléculaires conditionnant la réaction Ag-Ac en immunoanalyse

d- La réaction croisée: notion d'épitopes partagés



Sérum anti-Y :
Ensemble des Ac. Anti-Y
pouvant contenir des anticorps anti-X

Sérum anti-X :
Ensemble des Ac. anti-X

Immuno-adsorption du sérum anti-X par Y pour éliminer les anticorps qui croisent.

2- Caractéristiques moléculaires conditionnant la réaction Ag-Ac en immunoanalyse

b- La réactivité d'un anticorp pour un épitope dépend de l'accessibilité de l'antigène

Un antigène peut être soluble, lié à un complexe moléculaire, lié à une cellule ou présent dans un tissu.

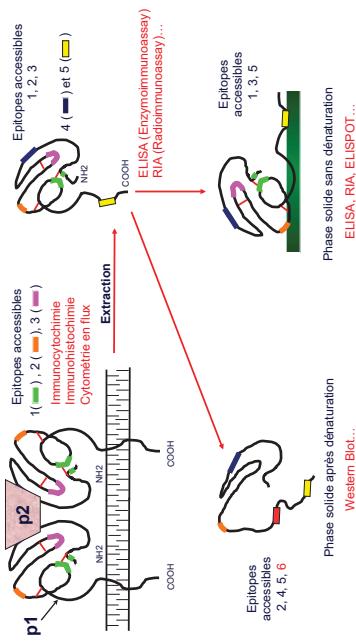


c- La réactivité d'un anticorp pour un épitope dépend de la conformation de l'antigène

- La conformation est conditionnée par le contexte réactionnel (conditions natives ou non).

2- Caractéristiques moléculaires conditionnant la réaction Ag-Ac en immunoanalyse

e- la réactivité d'un anticorp est conditionnée par la technique

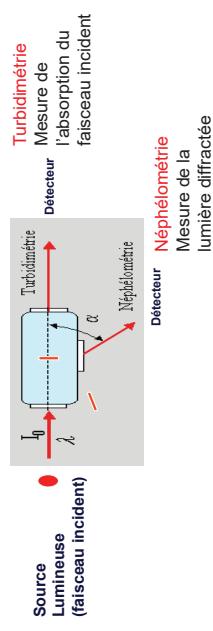


C- Techniques d'immunoanalyse basées sur la réaction Ag-Ac

Mise en évidence « directe » de la réaction [Ag-Ac]

- 1- Précipitation
 - 2- Agglutination
 - 3- Lyse cellulaire « dépendante du complément »
- Utilisation d'un Ac, ou d'un Ag, marqué**
- 1- Immuno-empreinte
 - 2- Immunofluorescence, immunohistochimie
 - 3- ELISA, RIA (dosage d'Ag soluble)

1- Précipitation en milieu liquide : Néphéloémétrie/turbidimétrie

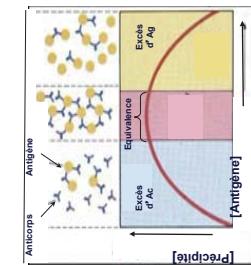
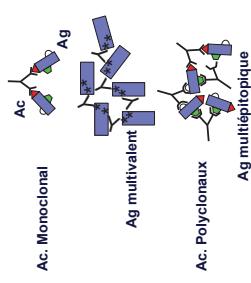


- Automatisation
- Dosage protéines sériques, urinaires, du LCR

I- La précipitation

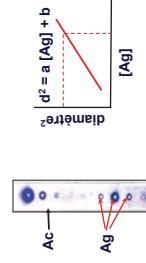
Formation d'agrégats Ag-Ac insolubles en milieu liquide ou en milieu gélié.

Ag soluble + Ac précipitants \rightleftharpoons agrégats de [Ag-Ac]



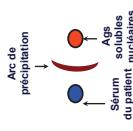
2- Précipitation en milieu gélié

a- Technique de Mancini

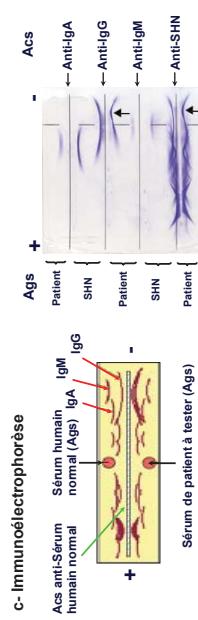


Ex : Dosage des Ig sériques

b- Immunodiffusion double d'Quichettiony

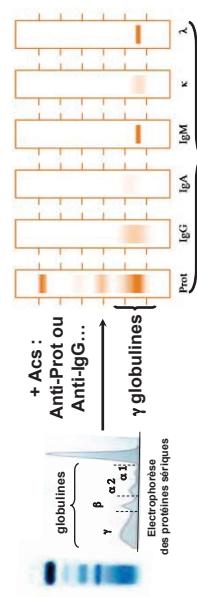


2- Précipitation en milieu gélifié



2- Précipitation en milieu gélifié

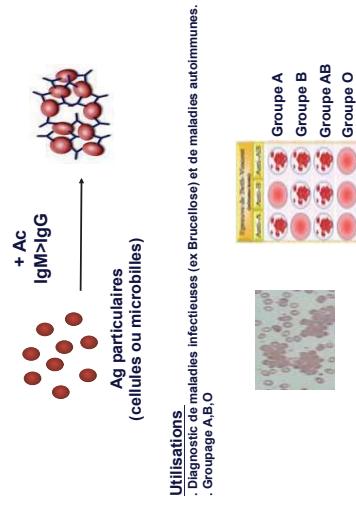
d- Immunofixation



Utilisations : Typage d'Ig monodimensionale dans le sérum ou l'urine (ex. myélome)

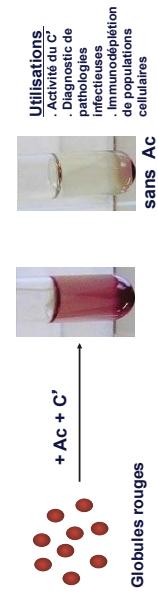
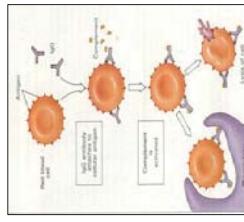
II- L'immunoagglutination

Formation d'agglutinats Ag-Ac en milieu liquide.



III- L'immunolyse

Dépend de l'activation de protéines du complément par les anticorps



IV- Techniques reposant sur un anticorps (ou un antigène) marqué

1- Les différents marqueurs



Radioisotopes : I^{131} , I^{125} , H^3 , C^{14} , P^{32} ...

Fluorochromes : Fluoresceine (FITC), Phycoerythrine (PE), Allophyccocyanine (APC)

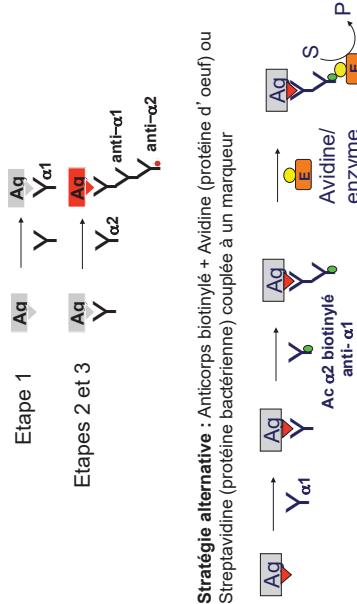
Luminophore : Luciferase, Luminescence

Enzyme : Peroxidase, Phosphatase alcaline

Métal : particules Au (or) ou Ag (argent), ferritine (protéine de stockage du Fer)

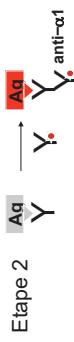
Biotine : ligand de l'avidine et de la streptavidine

c- Marquages indirects multicouches :



2- Dosage des antigènes par marquage direct ou indirect

a- Marquage direct



Etape 1 - Dépôt de protéines (anticorps) sur un support (membrane ou gel) :

- Dot blot : dépôt de protéines sur une membrane de nitrocellulose
- Western blot : électrophorèse (SDS-PAGE) + transfert sur membrane

électrophorèse bidimensionnelle (double électrophorèse) :
isolectofocalisation (separation des protéines en fonction du PI)
électrophorèse (separation des protéines en fonction du MW)
transfert sur membrane

3- Immuno-empreinte: Immunoblot

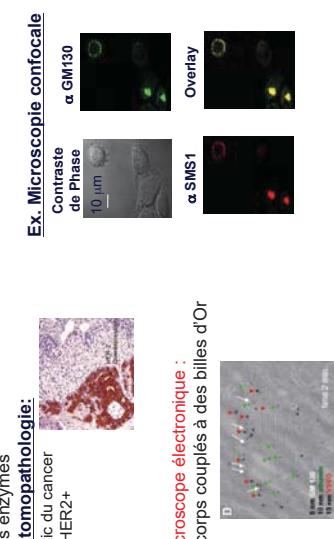
Etape 2 - Immunodétection :

Marquage indirecte, Ac2 marqué par enzyme

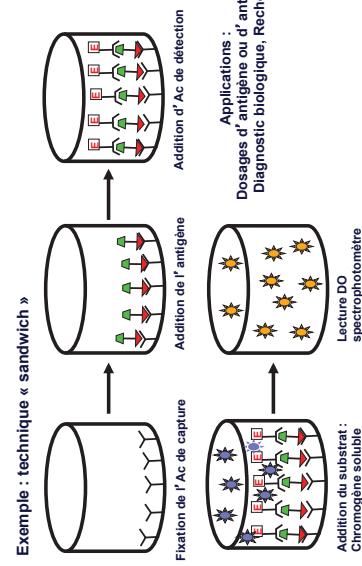
4- Immuno-marquage cellulaire et tissulaire

Immunohistologie (sur tissus fixés), immunocytologie (sur cellules fixées)

- **Microscope optique :** Anticorps couplés à des fluorochromes ou à des enzymes

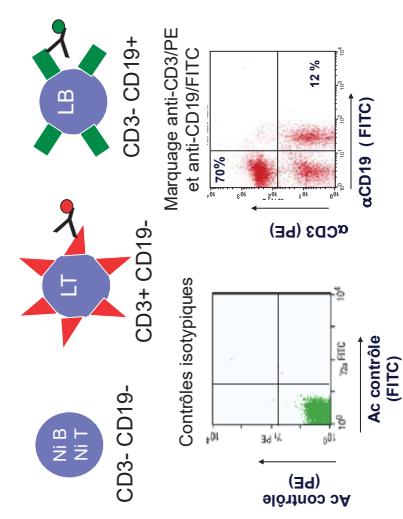


5- Dosage d'antigènes solubles dans un liquide biologique Technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

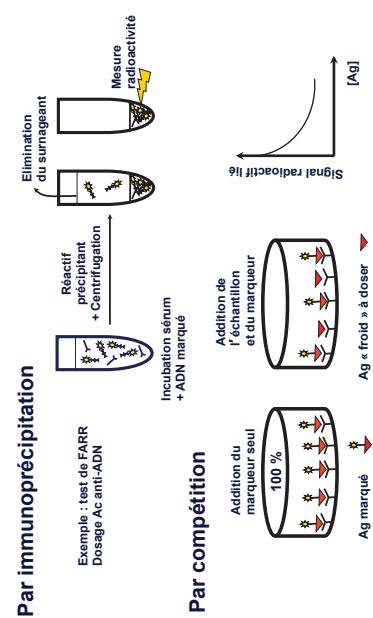


Cytométrie en flux

.Anticorps couplés à des fluorochromes



5- Dosage d'antigènes solubles dans un liquide biologique Technique RIA (radioimmunoassay)



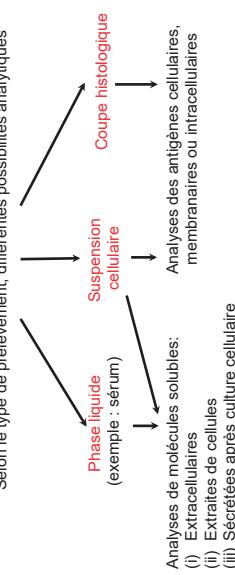
6- Exemples d'utilisation des techniques d'immunoanalyse

Prélèvements biologiques : sang, urine, LCR, MO, biopsie, prélevement d'organe.

Analytes :

cytokines, anticorps, hormones, protéines membranaires ou intracellulaires, antigènes de tumeurs (biomarqueurs), médicaments, toxiques, allergènes...

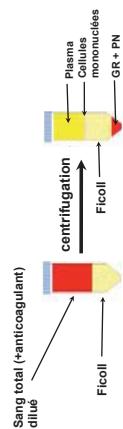
Selon le type de prélevement, différentes possibilités analytiques



I- Techniques de séparation cellulaire

1- Séparation sur gradient de Ficoll

Principe : différence taille et densité des cellules
($GR = 7 \mu\text{m} \cdot d = 1.098$ Lymphocytes = $9 \mu\text{m}$, $d = 1.063 \dots$)
différence de sédimentation sur gradient de Ficoll

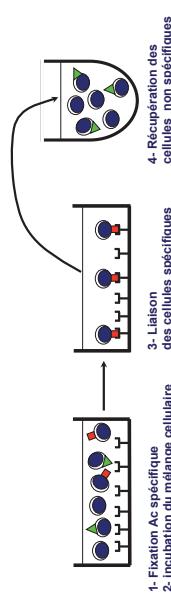


D- Immunoanalyse appliquée à la réponse immunitaire à médiation cellulaire

I- Techniques de séparation cellulaire

2- Séparation par réaction Ag-Ac

- Panning: capture par Ac



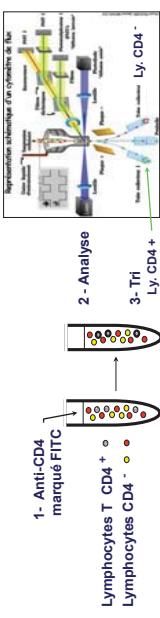
I- Techniques de séparation cellulaire

2- Séparation par réaction Ag-AC

- Sélection par lyse cellulaire



- Séparation par cytométrie en flux



I- Techniques de séparation cellulaire

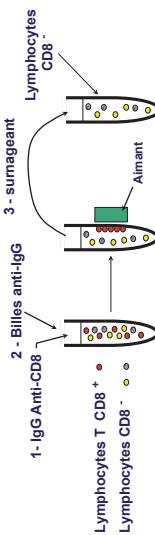
2- Séparation par réaction Ag-AC

- Séparation par cytométrie en flux

I- Techniques de séparation cellulaire

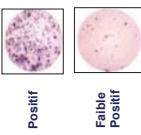
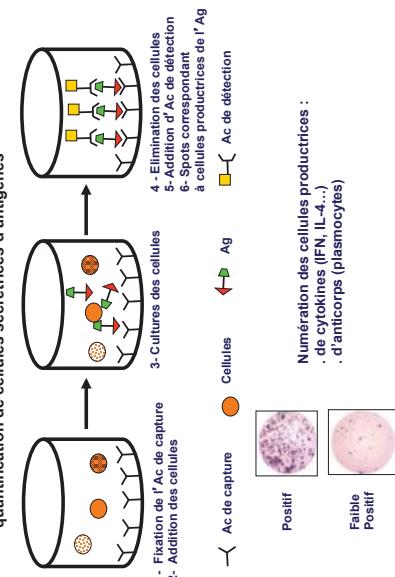
2- Séparation par réaction Ag-AC

- Séparation par billes magnétiques

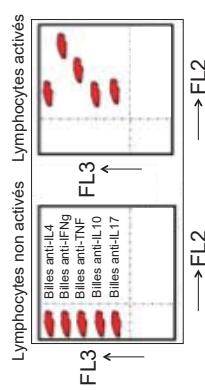
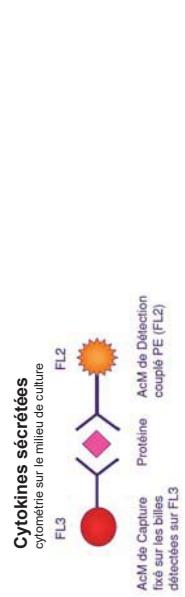


II- Analyses fonctionnelles

1- Technique ELISpot

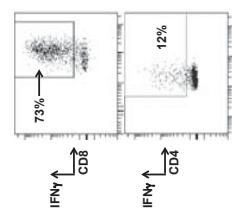


2- Cytométrie en flux : quantification de cytokines sécrétées.

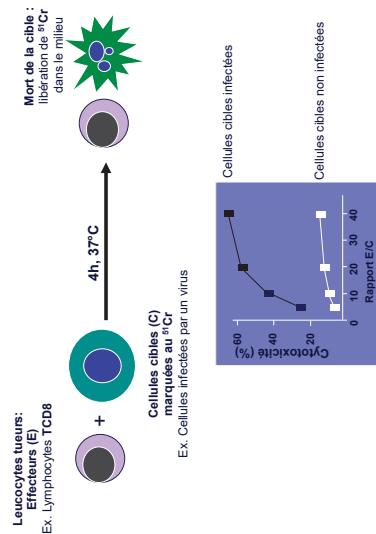


3- Cytométrie en flux: quantification de cellules productrices de cytokines

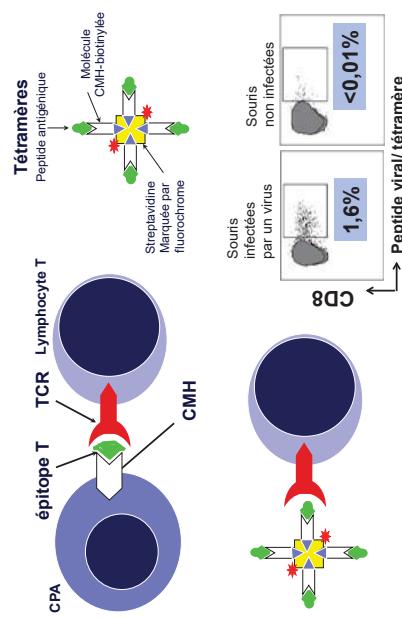
- Ag membranaires (CD4 et CD8)**
Ag intracellulaires (cytotype: IFN γ)
- Stimulation polyclonale (4h) (PMA/Anomycin bréfèfeline A)
 - Marquage anti-CD4+anti-CD8
 - Fixation/perméabilisation +anti-IFN γ
 - Cytométrie en flux



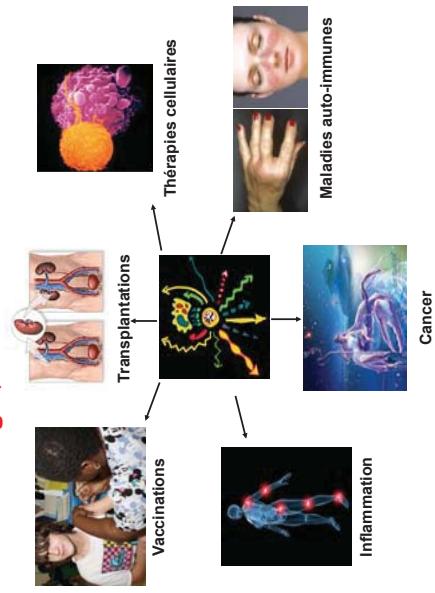
4- Technique d'étude de la cytotoxicité à médiation cellulaire



III- Identification de Lymphocytes T spécifiques d'Ag



E- Immunologie, maladies et traitements



Pourquoi les modèles animaux en recherche biomédicale ?

- Etudes des mécanismes fondamentaux du développement et d'homéostasie
 - Compréhension des mécanismes impliqués dans le développement des processus pathologiques
 - Compréhension des mécanismes d'action des médicaments
 - Criblage pharmacologique et toxicologique
 - Mise au point de nouvelles techniques thérapeutiques

UE8 Modèles animaux pour la recherche

Dr. Angelo Parini

La qualification du personnel

Selon la directive n° 2010/63/EU : Le bien-être des animaux utilisés dans des procédures dépend grandement de la qualité et des compétences professionnelles du personnel qui supervise les procédures, qui mène les procédures ou qui supervise les personnes chargées des soins quotidiens aux animaux.

L'autorisation nominative d'expérimenter sur animaux vivants

Il n'y a plus d'autorisation nominative d'expérimenter sur animaux vivants depuis le 1er janvier 2013. Cette mesure avait été instaurée par le décret n° 87-848 du 19 octobre 1987 qui a été abrogé.

Les formations

Le personnel travaillant avec les animaux doit être qualifié et avoir suivi une formation adaptée à son niveau de participation aux expérimentations et à sa fonction. Ces formations sont approuvées par le ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt après avis de la Commission Nationale de l'Expérimentation Animale (CNEA).

Le certificat de capacité pour l'élevage des espèces non domestiques

Il est nécessaire de détenir un certificat de capacité pour l'élevage et la détention des espèces non domestiques pour les personnes travaillant sur ces espèces, auquel sauf une déclaration d'ouverture pour les établissements détenant des espèces "non domestiques". Aucun niveau d'étude minimum n'est nécessaire pour l'obtention de ce certificat. Seule une justification des compétences pour assurer l'entretien des animaux, l'aménagement et le fonctionnement de l'établissement est requise.

Les formations

Le personnel travaillant avec les animaux doit être qualifié et avoir suivi une formation adaptée à son niveau de participation aux expérimentations et à sa fonction. Ces formations sont approuvées par le ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt après avis de la Commission Nationale de l'Expérimentation Animale (CNEA).

Quatre fonctions sont définies (décret 2013-118)

- la conception des projets utilisant des animaux à des fins scientifiques
- l'agencement et l'entretien des installations et des procédures expérimentales aux animaux
- la mise à mort des animaux

Les différentes formations spécifiques en expérimentation animale

Tous les personnes impliquées en expérimentation animale doivent suivre dans l'année suivant leur prise de poste une formation spécifique destinée à leur donner la qualification nécessaire à l'exercice de leur fonction en les sensibilisant au bien-être animal et aux bonnes pratiques expérimentales.

Jusqu'à présent, trois niveaux de formation étaient proposés par la CNEA :

- le niveau I (correspondant au niveau C FELASA dans les autres Etats de l'Union européenne)
 - 80 heures,
 - essentiellement destiné aux personnes affectées à l'hébergement, à l'entretien et aux soins des animaux et ne permet pas de participer directement aux expérimentations.
- le niveau II (niveau A FELASA)
 - 40 heures pour les personnes affectées à participer directement aux expérimentations.
 - Indépendante du niveau de formation initiale.
- le niveau III (niveau B FELASA)
 - 35 heures pour les personnes affectées à l'hébergement, à l'entretien et aux soins des animaux et ne permet pas de participer directement aux procédures expérimentales sur animaux.

Les modèles animaux employés en recherche biomédicale

Modèles naturels (parfois qualifiés de « spontanés »).

•Modèles expérimentaux.

•Modèles génétiquement modifiés

•Modèles négatifs.

•Modèles orphelins.

Maladies ou conditions présentes naturellement chez les animaux et identiques à des maladies ou affections humaines.

Le diabète, l'hypertension, l'arthrite et les déficits immunitaires en sont quelques exemples. On a caractérisé et conservé des centaines de souches et de stocks d'animaux atteints de maladies héréditaires.

Modèles expérimentaux.

Modèles on reproduit expérimentalement une affection ou une maladie. Par exemple, la streptozotocine est une substance chimique qui permet de provoquer le diabète en endommageant les cellules productrices d'insuline du pancréas; il est également possible de produire un certain type de cancer à l'aide d'un cancérogène chimique ou de déclencher un infarctus du myocarde chirurgicalement.

Modèles génétiquement modifiés.

Groupe particulier de modèles expérimentaux dont on a manipulé le code génétique pour provoquer la maladie à étudier. Dans le génome des animaux génétiquement modifiés, on a inséré un ADN étranger, ou bien certains gènes ont été remplacés ou neutralisés (modèles knock-out). Ces modèles permettent l'étude du fondement génétique de certaines maladies, la susceptibilité ou la résistance à celles-ci, le rôle de protéines spécifiques dans des processus pathologiques, etc.

Modèles négatifs.

Certains animaux sont résistants à une affection ou maladie donnée. En étudiant les causes de cet état, on peut trouver des indices sur la résistance à la maladie et ses fondements physiologiques.

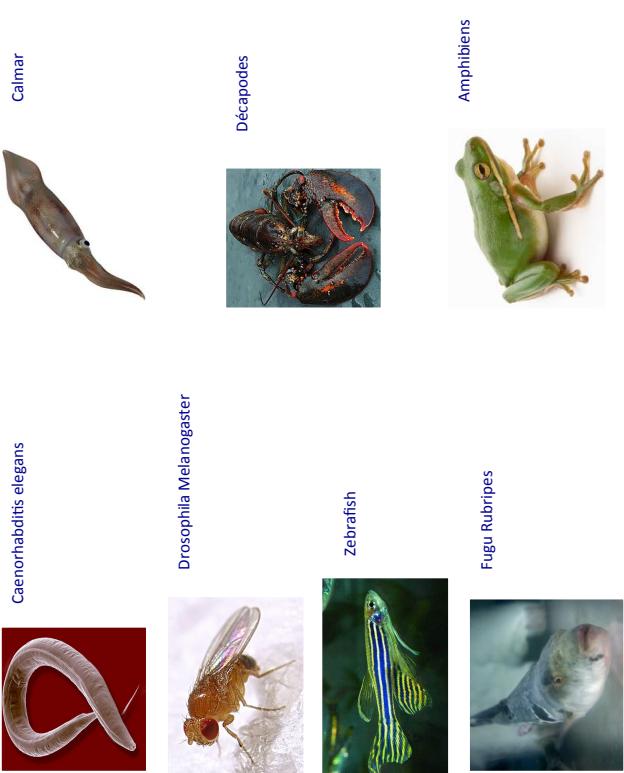
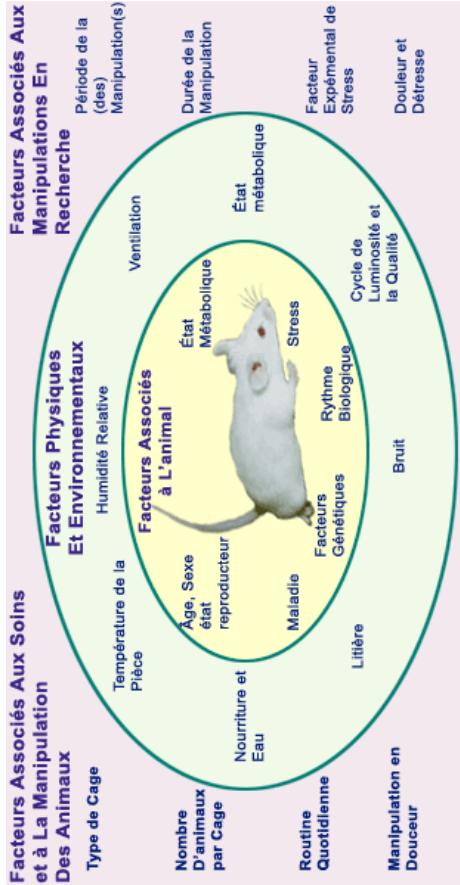
Modèles orphelins.

Affections apparaissant naturellement chez un animal et pour lesquelles il n'existe pas d'équivalent chez l'humain. Autrefois, la tremblante du mouton entrait dans cette catégorie, mais cette maladie constitue maintenant un modèle utile pour l'étude des encéphalopathies spongiformes humaines dont on entend si souvent parler (ESB ou « maladie de la vache folle ») ainsi que de l'encéphalopathie des cervidés, qui touche les cerfs.

Facteurs qui peuvent influencer le choix du modèle animal effectué par le chercheur :

- Pertinence du modèle ou du système d'organes pour l'étude envisagée;
- Caractéristiques génétiques du modèle;
- Modèles naturels par opposition à expérimentaux;
- Réponses de l'animal aux procédures;
- Aspects environnementaux importants pour le modèle;
- Données générales disponibles sur l'animal et sur le modèle en particulier;
- Disponibilité de l'espèce;
- Nombre nécessaire pour que l'expérience soit statistiquement valide;
- Besoins pour ce qui est de l'âge et du sexe;
- Durée de vie de l'animal employé comme modèle;
- Taille de l'animal employé comme modèle;
- Prix de l'animal et coût des soins à lui prodiguer;
- Installations nécessaires pour héberger l'animal de façon convenable;
- Expertise en entretien des animaux. Certains modèles nécessitent non seulement un type d'hébergement particulier mais également des soins spéciaux.

Facteurs qui peuvent influencer les résultats expérimentaux



Modèles animaux en recherche biomédicale

Avantages de *C. elegans* en tant que modèle animal

- Petite taille
- Transparent
- Temps de génération court
- Auto-fertilisation (hermaphrodite)
- Clonal
- Congélation à long terme (-80°)

Carte génétique
Séquence génomique

Domaines de recherche utilisant *C. elegans*:

- Apoptose
- Développement
- Neurosciences
- Immunologie
- ...



Poulet



caillie



Souris



Rats



Cochon d'Inde



Brebis



Lapin



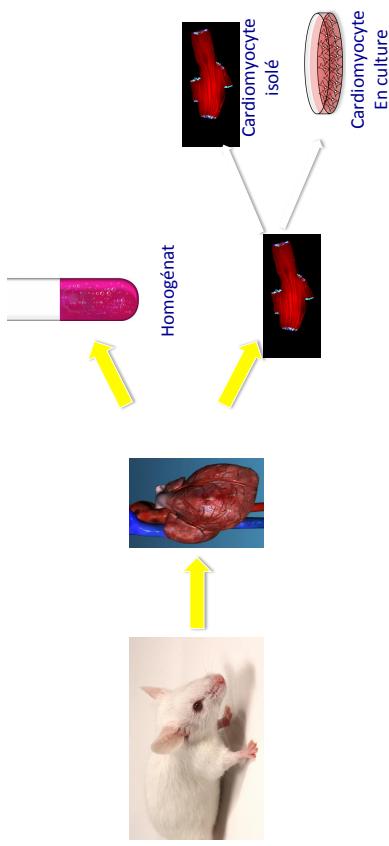
Porc



Organisme	Position systématique	Nombre de chromosomes par jeu haploïde	Taille du génome (en Mb)	Nombre de gènes
	Bactérie	circulaire unique	4.7	4 288
	Ascomycète	16	14	6 200
	Nématode	6	100	19 100
	Angiosperme	5	130	25 000
	Insecte	4	170	15 000
	Mammifère	20	3 000	30 000
	Mammifère	23	3 000	30 000

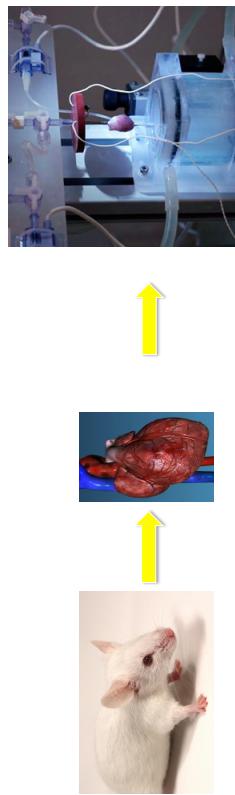
Approches Expérimentales

- *Ex vivo/in vitro: cultures cellulaires, homogénats de tissus,....*



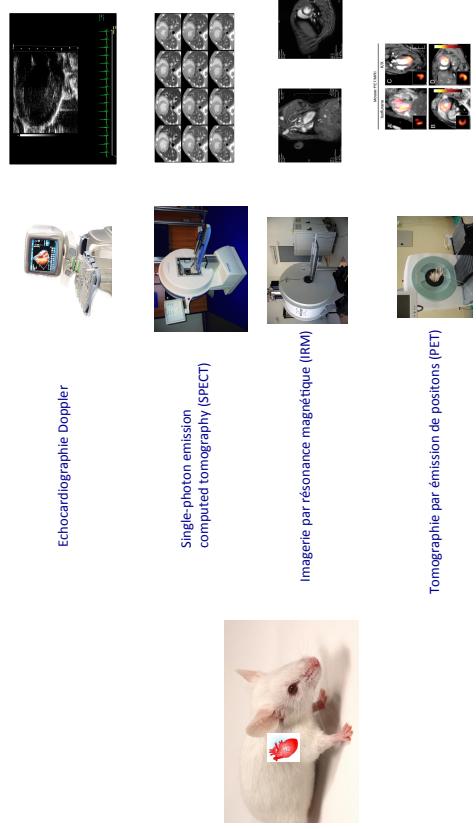
Approches Expérimentales

- *Ex vivo: organe isolé et perfusé,....*



Approches Expérimentales

- *In vivo: fonction d'un organe dans l'organisme intact:*



Echocardiographie Doppler
Single-photon emission computed tomography (SPECT)
Imagerie par résonance magnétique (IRM)



Tomographie par émission de positons (PET)

Epidémiologie

➤ Cancer : deuxième cause de décès dans le monde

- Dans le monde (OMS, 2012)
 - 14 millions nouveaux cas et 8,2 millions décès
 - Le nombre de nouveaux cas devrait augmenter de 70% environ au cours des 2 prochaines décennies

- En France (Institut national du cancer, 2015)
 - 385 mille nouveaux cas et 150 mille décès

De l'immunité des tumeurs à l'immunothérapie du cancer



Maha Ayoub
Professeur d'immunologie
Service de Biologie cellulaire, Hématologie, Immunologie
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Université Paul Sabatier, Toulouse III

2018/2019

Mécanismes

➤ Division incontrôlée des cellules

- Résultant d'altérations génétiques, dans la cellule cancéreuse, affectant les mécanismes
 - De contrôle de la division cellulaire ;
 - De contrôle de la mort cellulaire programmée (apoptose) ;
 - De la réparation de l'ADN

- Le caractère « malin » = tumeurs malignes
 - Provient de la capacité des cellules cancéreuses à quitter le tissu d'origine, à envahir d'autres tissus et à y proliférer
 - Conduit à la formation de métastases

Plan du cours

- Le cancer : épidémiologie, mécanismes et thérapies actuelles

- Immunité des tumeurs
 - Identification des antigènes des tumeurs
 - Mécanismes d'immunorégulation

- Immunothérapie anti-cancer :
 - Transfert adoptif de lymphocytes T
 - Vaccins
 - Anticorps monoclonaux anti-checkpoint

Thérapie

La chirurgie et la radiothérapie sont des traitements locorégionaux

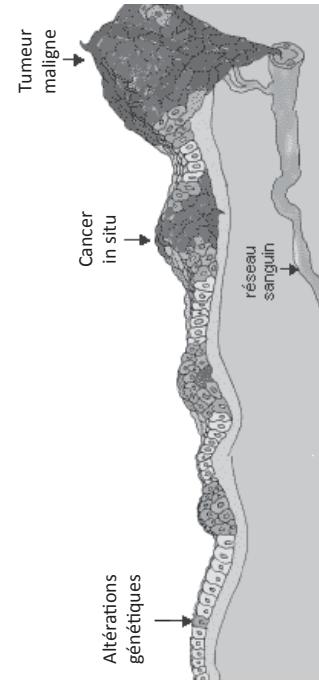
But : éliminer les cellules cancéreuses dans la région de la tumeur

Leurs limites

Toutes les tumeurs ou leurs métastases ne sont pas accessibles

Les cellules tumorales disséminées ou des micro-métastases invisibles ne seront pas touchées

Nécessité d'un traitement systémique



Mécanismes

Division incontrôlée des cellules

- Capacité à envahir des tissus distants

Leurs limites

- Toutes les tumeurs ou leurs métastases ne sont pas accessibles

- Les cellules tumorales disséminées ou des micro-métastases invisibles ne seront pas touchées

Nécessité d'un traitement systémique

Thérapie

Chimiothérapie anti-cancer

- Traitement médicamenteux systémique par une substance chimique
- Touche les mécanismes de division cellulaire
 - ✓ Mécanismes utilisés par les cellules cancéreuses et les cellules normales
 - ✓ Effet plus fort pour les cellules ayant une activité de division importante, c'est le cas des cellules cancéreuses
 - ✓ Traitement sélectif : ne touche pas uniquement les cellules cancéreuses, agit aussi sur les cellules normales (chute de cheveux, nausée...)

Chirurgie

- Lorsque la tumeur primitive ou les métastases sont accessibles
- Radiothérapie : rayonnements ionisants de haute énergie
- Créent des lésions sur différentes molécules dans la cellule : lipides, glucides, protéines et, surtout, acides nucléiques (dont ADN)
 - Si les lésions de l'ADN ne sont pas réparées, elles provoquent la mort cellulaire
 - Les mécanismes de réparation de l'ADN sont défectueux dans les cellules cancéreuses
 - Cette différence fait que l'effet des rayons sera plus important sur les cellules cancéreuses : notion de sélectivité

Thérapie

Réponse immunitaire

➤ Revoir le cours du Prof. B. Séguin

➤ Système immunitaire

- Reconnaît et tolère le « soi »
- Reconnaît et élimine le « non-soi » : les agents infectieux
- Reconnaît et élimine le « soi altéré » : le cancer

➤ Deux types de réponses

- Innée : immédiate, non spécifique, nécessaire à la mise en place de la réponse adaptative
- Adaptative : lente, spécifique, dotée de mémoire
 - ✓ Réponse humorale : lymphocytes B et anticorps spécifiques de l'antigène
 - ✓ Réponse cellulaire : lymphocytes T spécifiques de l'antigène

Thérapie

➤ Thérapies standards

- Chirurgie et radiothérapie : traitements locorégionaux -> pas de contrôle de la maladie systémique
- Chimiothérapie et radiothérapie : sélectivité pour les cellules cancéreuses mais effets sur les cellules normales aussi -> limite l'augmentation des doses

➤ Nécessité de développement de nouvelles stratégies thérapeutiques

- Innée : immédiate, non spécifique, nécessaire à la mise en place de la réponse adaptative
- Adaptative : lente, spécifique, dotée de mémoire
 - ✓ Réponse humorale : lymphocytes B et anticorps spécifiques de l'antigène
 - ✓ Réponse cellulaire : lymphocytes T spécifiques de l'antigène

Immunité des tumeurs

➤ Questions posées depuis la découverte du système immunitaire

- Les tumeurs peuvent-elles activer la réponse immunitaire innée (signal de danger) ?
- Même si elles sont issues du soi, les tumeurs peuvent-elles être des cibles de l'immunité adaptative (antigènes) ?

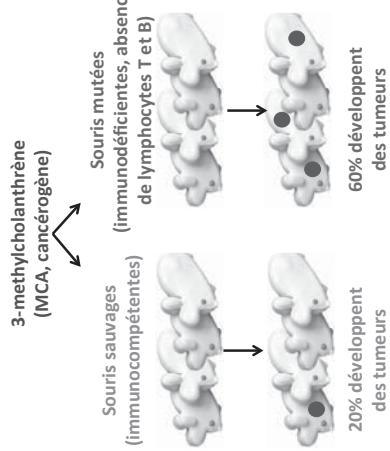
Thérapie

➤ Nouvelles thérapies

- La recherche en immunologie a montré que notre système immunitaire est capable de reconnaître et, potentiellement, d'éliminer les tumeurs
 - ✓ Développement de l'immunothérapie anti-cancer

Immunité des tumeurs

▶ Preuves expérimentales : souris



Shankaran V et al., *Nature* 2001

Immunité des tumeurs

▶ Preuves historiques : William B. Coley

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Observation initiale | ✓ Régression spontanée de tumeurs après contraction d'une infection à streptocoque |
| <input type="checkbox"/> Thérapie | ✓ Injection intra-tumorale de lysats de mélanges bactériens |
| <input type="checkbox"/> Toxine de Coley | ✓ Régression dans une proportion de patients |
| <input type="checkbox"/> Publication en 1910 | ✓ Régression spontanée d'un cancer après un épisode infectieux |



William B. Coley

1862 - 1936



Régression spontanée d'un cancer après un épisode infectieux

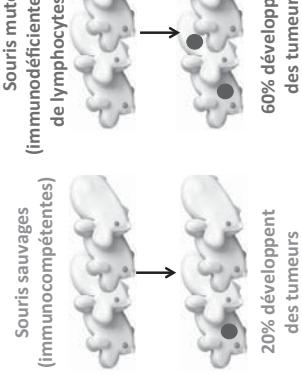
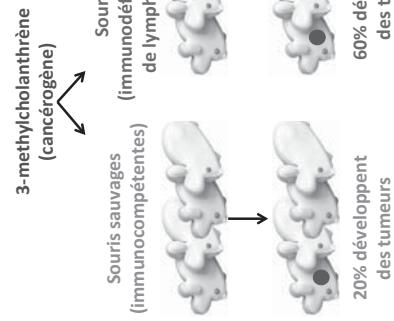
Immunité des tumeurs

▶ Preuves chez l'homme

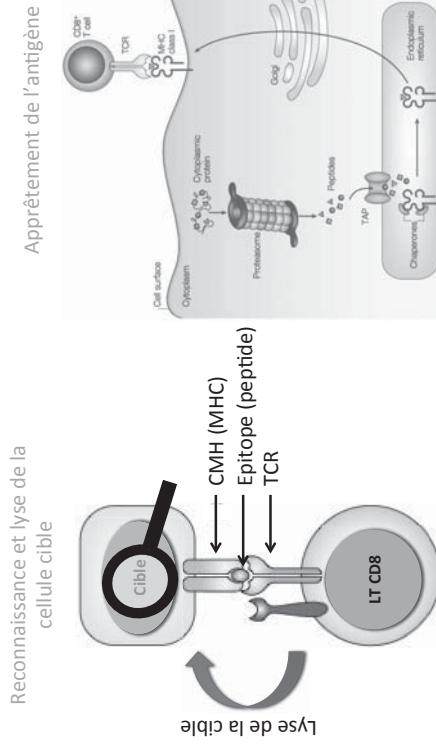
- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Les personnes immunodéprimées | ✓ Ex. : SIDA, traitement immunsupresseur pour éviter le rejet de la greffe/transplantation |
| <input type="checkbox"/> Ont une susceptibilité plus grande à développer des tumeurs | |

Immunité des tumeurs

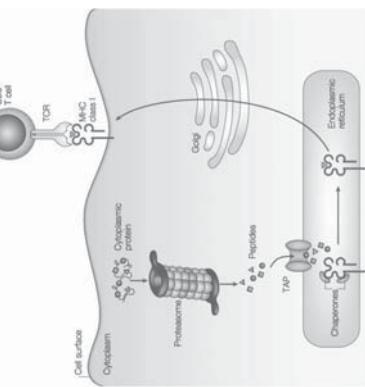
▶ Preuves expérimentales : souris



Reconnaissance de l'antigène par les CTL



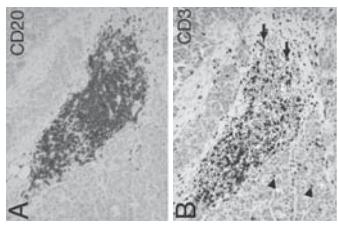
Apprêtement de l'antigène



Immunité des tumeurs

▶ Preuves chez l'homme

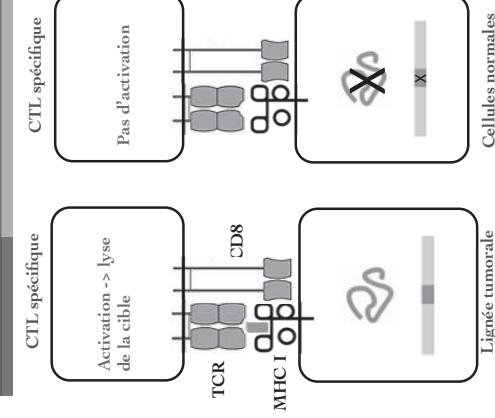
- Les tumeurs sont infiltrées par des cellules de l'immunité
 - ✓ Cellules de l'immunité innée et adaptative
 - ✓ Les patients porteurs de tumeurs fortement infiltrées par des lymphocytes T ont un meilleur pronostic



Analyse par immunohistochimie de l'infiltrat lymphocytaire B (CD20) et T (CD3) d'un cancer de l'ovaire

Sato E et al., PNAS 2005

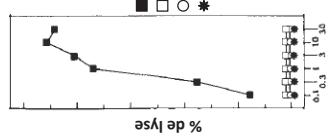
Identification des antigènes des tumeurs



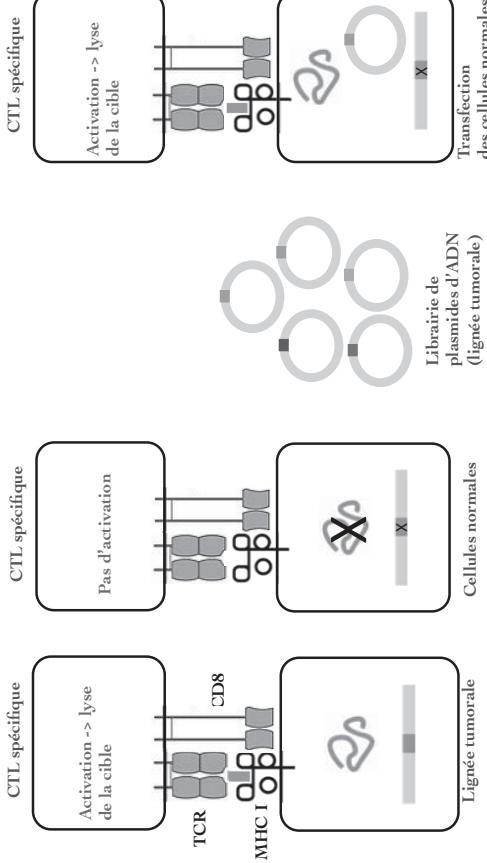
Immunité des tumeurs

▶ Preuves chez l'homme

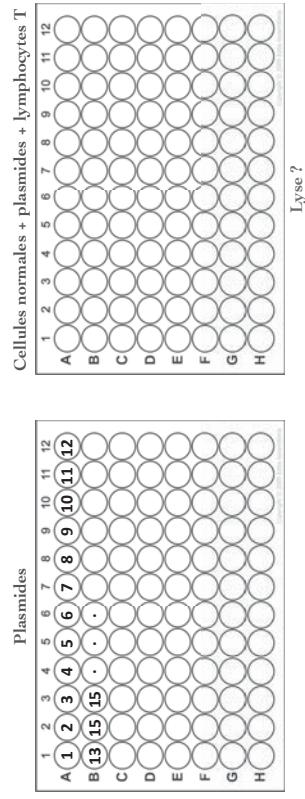
- Test de lyse in vitro
 - ✓ Culture des lymphocytes T CD8 (CTL) en présence de différents types cellulaires (cibles)
 - ✓ Les CTL des patients atteints de cancer sont capables de lyser la tumeur autologue (du même patient)
- Ce système expérimental (= une tumeur + lymphocytes T spécifiques de la tumeur) a permis l'identification des antigènes tumoraux reconnus par les lymphocytes T



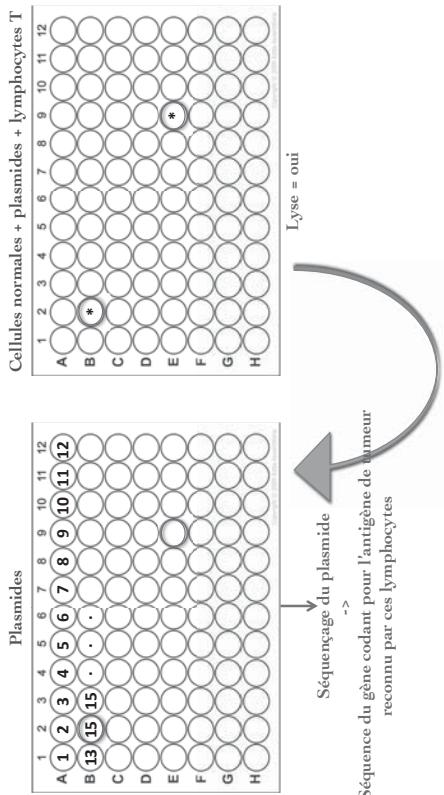
Identification des antigènes des tumeurs



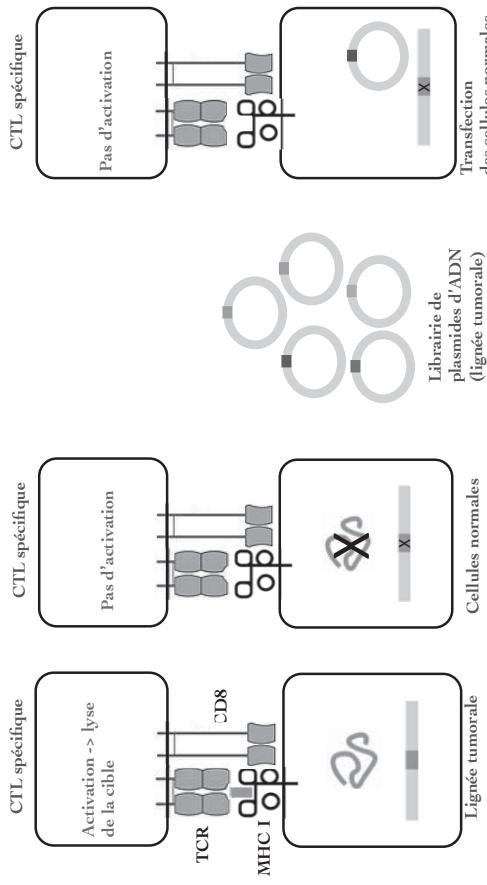
Identification des antigènes des tumeurs



Identification des antigènes des tumeurs

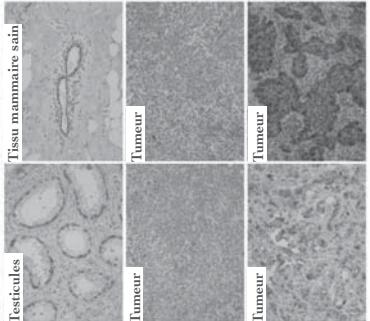


Identification des antigènes des tumeurs



Identification des antigènes des tumeurs

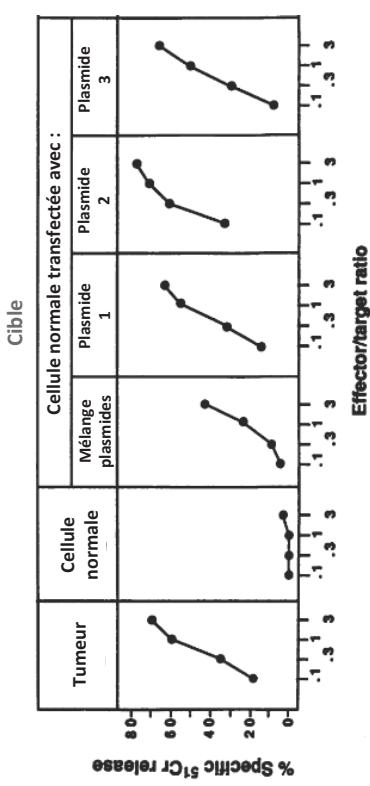
- L'antigène MAGE-1 est exprimé dans des tumeurs de différentes origines histologiques (mélanome, cancers bronchiques, cancers ovariens etc...)
- Il n'est pas exprimé dans les tissus sains à l'exception des cellules germinales (testicules, ovaires fœtaux)
- D'autres antigènes (plus de 140) ayant le même profil d'expression ont été identifiés depuis : comme SSX, NY-ESO-1...
- Il s'agit de la famille des « cancer testis antigens » ou « antigènes partagés spécifiques des tumeurs »



Expression (immunohistochimie) de NY-ESO-1 dans le cancer du sein

Hanai A et al., PLoS One 2011

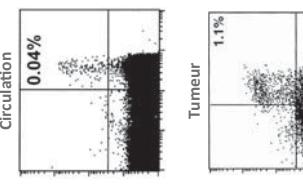
Identification des antigènes des tumeurs



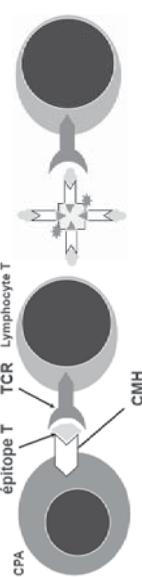
Van der Bruggen P et al., Science 1991

Réponse immunitaire spontanée spécifique des antigènes des tumeurs

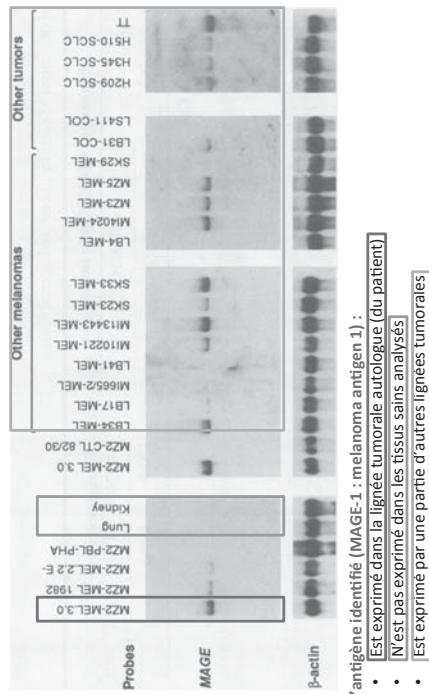
- Les patients atteints de cancer développent des réponses immunitaires contre les antigènes exprimés dans leur tumeur
- Les lymphocytes T CD8 (CTL) spécifiques de ces antigènes sont détectables dans la circulation sanguine et dans la tumeur



Détection des CTL spécifiques de NY-ESO-1 à l'aide de tétramères
Anti-CD8



Identification des antigènes des tumeurs

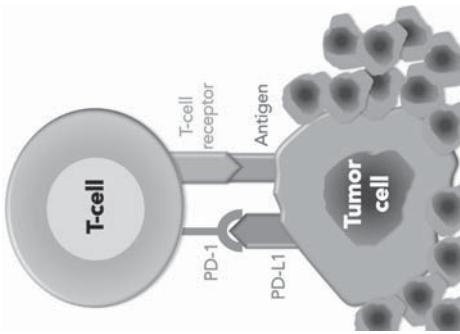


- L'antigène identifié (MAGE-1 : melanoma antigénique 1) :
- Est exprimé dans la lignée tumorale autologue du patient]
- N'est pas exprimé dans les tissus sains analysés
- Est exprimé par une partie d'autres lignées tumorales

Van der Bruggen P et al., Science 1991

Mécanismes d'immunorégulation

- Les tumeurs exploitent ces mécanismes pour échapper à la réponse immunitaire
 - Les lymphocytes T au site tumoral expriment le récepteur co-inhibiteur PD-1 (Programmed cell death protein 1)
 - Les cellules tumorales peuvent exprimer PD-L1, le ligand de PD-1, et ainsi inhibiter les lymphocytes T qui infiltrent la tumeur



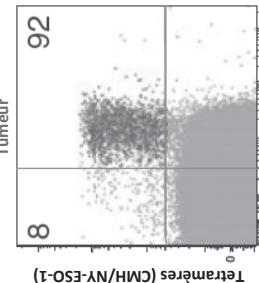
Mécanismes d'immunorégulation

- De façon générale, si la réponse immunitaire n'est pas contrôlée, elle pourrait causer des dommages aux tissus sains
- Plusieurs mécanismes existent pour limiter les réponses immunitaires :
 - mécanismes d'immunorégulation
 - Un des mécanismes d'immunorégulation de l'activité des lymphocytes T = récepteurs co-inhibiteurs

PD-L1, le ligand de PD-1, et ainsi inhibiter les lymphocytes T qui infiltrent la tumeur

Mécanismes d'immunorégulation

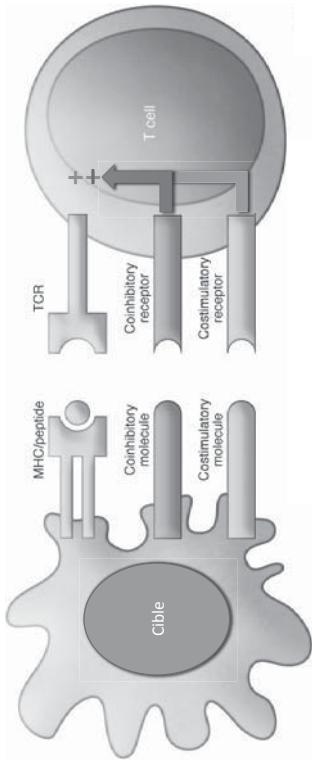
- Les tumeurs exploitent ces mécanismes pour échapper à la réponse immunitaire
 - Les lymphocytes T au site tumoral expriment le récepteur co-inhibiteur PD-1 (Programmed cell death protein 1)
 - Les cellules tumorales peuvent exprimer PD-1, le ligand de PD-1, et ainsi inhibiter les lymphocytes T qui infiltrent la tumeur



Dans la tumeur, les lymphocytes T CD8 spécifiques de NY-ESO-1 expriment PD-1

Mécanismes d'immunorégulation

- En plus du TCR, les lymphocytes T expriment des récepteurs co-stimulateurs et co-inhibiteurs (checkpoints immunitaires)
 - En fonction des récepteurs exprimés et de la présence ou pas de leurs ligands sur la cellule cible, l'activité du lymphocyte T, ayant reconnu l'antigène, sera modulée



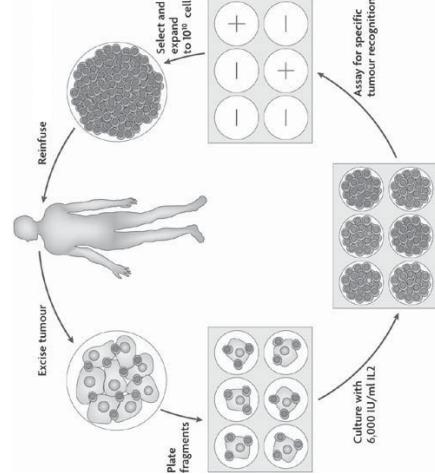
Transfert adoptif de lymphocytes T

Principe

- ❑ Sélection de patients porteurs d'une tumeur qui exprime un ou plusieurs antigènes
- ❑ Expansion *in vitro* des lymphocytes T autologues spécifiques de la tumeur
- ❑ Infusion de grands nombres de lymphocytes au patient
- ☞ Il s'agit d'une immunothérapie spécifique passive
- ☞ Actuellement au stade d'essais cliniques qui donnent des résultats très encourageants pouvant conduire prochainement à l'obtention d'une AMM

Transfert adoptif de lymphocytes T

- ☞ Préparation des lymphocytes T autologues spécifiques
- ❑ Lymphocytes T infiltrant la tumeur cultivés *in vitro* en présence d'IL-2 (cytokine importante pour leur prolifération)
- ❑ Sélection des cultures de lymphocytes T capables de lyser la tumeur *in vitro*



Balance entre mécanismes effecteurs et régulateurs

Principe

- Mécanismes effecteurs :
 - ✓ Les tumeurs expriment des antigènes
 - ✓ Les lymphocytes T reconnaissent ces antigènes
 - ✓ Les lymphocytes T spécifiques infiltrent et tuent les tumeurs
- Mécanismes régulateurs :
 - ✓ Les tumeurs se protègent du système immunitaire
 - ✓ Elles expriment des ligands qui inhibent les lymphocytes T
 - ✓ Les lymphocytes T dans la tumeur expriment des récepteurs co-inhibiteurs



Immunothérapie anti-cancer

- ☞ Le but de l'immunothérapie anti-cancer est d'augmenter le nombre et l'activité des lymphocytes T spécifiques de la tumeur

- Augmenter les effecteurs:
 - ✓ Transfert de lymphocytes T
 - ✓ Vaccination
- Lever l'inhibition :
 - ✓ Anticorps monoclonaux anti-PD-1/PD-L1

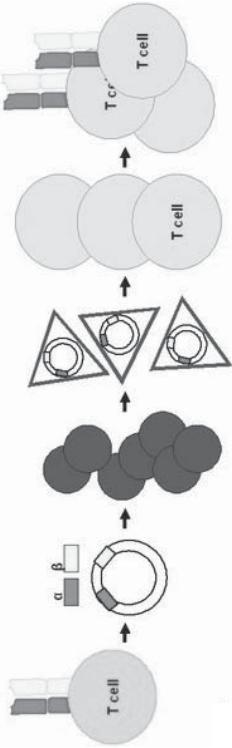


Vaccins anti-cancer

- ☞ **Principe**
 - Sélection de patients porteurs d'une tumeur qui exprime un ou plusieurs antigènes
 - Vaccination avec :
 - ✓ Un ou plusieurs des antigènes exprimés par la tumeur produits *in vitro* (peptides synthétiques, protéines recombinantes, vecteurs virus...)
 - ✓ Mélangés à un adjuvant (signal de danger) qui va stimuler l'immunité innée
- ☞ **Il s'agit**
 - D'une immunothérapie spécifique active
 - De vaccins thérapeutiques : administrés après le diagnostic (contrairement aux vaccins classiques anti-infectieux qui sont préventifs)
- ☞ Actuellement au stade d'essais cliniques qui montrent la faisabilité de l'approche : il est possible d'induire ou d'augmenter la réponse immunitaire spécifique de la tumeur chez les patients

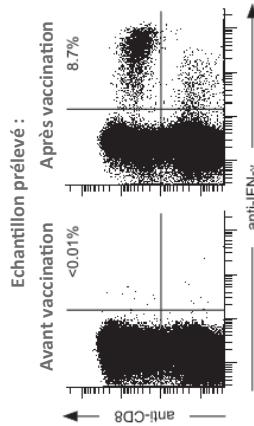
Transfert adoptif de lymphocytes T

- ☞ **Préparation des lymphocytes T autologues spécifiques**
 - Modification *in vitro* des lymphocytes circulants totaux du patient
 - Par transduction par un vecteur viral qui code pour un TCR spécifique d'un antigène
 - lymphocytes génétiquement modifiés exprimant tous un TCR spécifique de la tumeur → expansion en présence d'IL-2



Vaccins anti-cancer

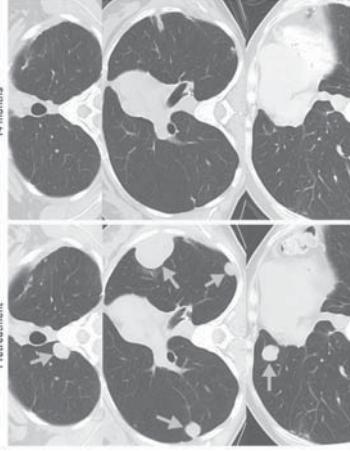
- ☞ **Exemple**
 - Vaccination avec la protéine recombinante NY-ESO-1 + 2 adjuvants (Montanide® et CpG)
 - Le vaccin induit une réponse CTL très forte
- ✓ Suiivi immunologique :
 - ✓ Stimulation *in vitro* des lymphocytes T circulants des patients avec l'antigène NY-ESO-1
 - ✓ Mesure de la production d'IFN-γ par marquage intracellulaire



Méthode d'analyse, voir cours du Prof. B. Segui
Quantification de cellules productrices de cytokines

Transfert adoptif de lymphocytes T

- ☞ **Exemple**
 - Transfert adoptif de lymphocytes T génétiquement modifiés spécifiques de l'antigène NY-ESO-1 chez des patients porteurs d'une tumeur NY-ESO-1⁺
 - Après une seule infusion, régression de métastases pulmonaires d'un sarcome



Inhibition des récepteurs co-inhibiteurs

- Plusieurs anticorps inhibiteurs de checkpoints ont obtenu l'AMM depuis 2011 et sont utilisés aujourd'hui pour traiter plusieurs types de cancers (mélanome, cancer bronchique, certains cancers du rein, cancers de la tête et du cou, lymphomes de Hodgkin...)
- Anti-PD-1 : Nivolumab (OPDIVO) ; Pembrolizumab (KEYTRUDA)
- Anti-PD-L1 : Atezolizumab (TCENTRIQ)
- Avantage majeur de l'immunothérapie par rapport aux thérapies classiques : effet à long terme observé chez certains patients dû à la mémoire immunitaire

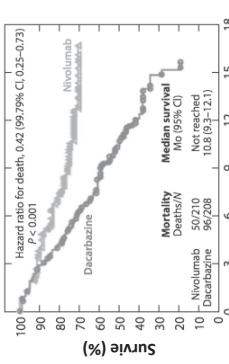
Inhibition des récepteurs co-inhibiteurs

- Principe
 - Administration d'un anticorps monoclonal
 - Spécifique d'un récepteur co-inhibiteur (ex : PD-1) ou de son ligand (ex : PD-L1)
 - Qui inhibe cette interaction et donc la signalisation négative par le récepteur dans les lymphocytes T
- Les essais cliniques menés depuis plus de 10 ans ont donné des résultats concluants

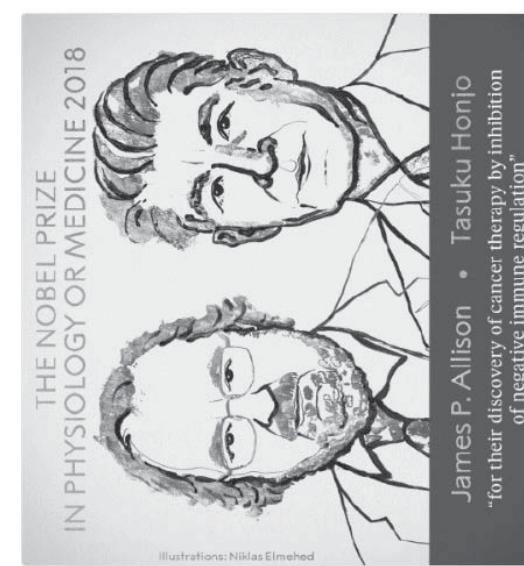
Inhibition des récepteurs co-inhibiteurs

- Exemple
 - Anticorps anti-PD-1

Essais clinique comparant la chimiothérapie (bleu) à l'immunothérapie par anti-PD-1 (jaune)



Baumeister et al., Annual Rev Immunol 2016



Récepteurs nucléaires : une grande famille !

Exemples en pathologie et pharmacologie ...

I – Introduction : les origines ...

II – La super-famille des récepteurs nucléaires

- 1 - Les ligands
- 2 - Structures et fonctions communes des récepteurs
- 3 - Modulation transcriptionnelle
- 4 - Modes de liaison des récepteurs à l'ADN
- 4 - Modes d'interaction entre récepteurs

III - Physiopathologies et approches pharmacologiques associées

- 1 - Exemples en physiopathologie
- 2 - Modulateurs des récepteurs des hormones stéroïdiennes

Sophie Sixou, PACES site Marañchés, UE spécifique "Démarches expérimentales", 2018-19

Etapes clés :

1930-1950 Isolation des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes et des rétinoïdes

1960-1980 Caractérisation biochimique de leurs récepteurs

1985 Clonage de GR et RE

1987 Structure modulaire des RNs

1990 Clonage d'autres gènes de RNs par homologie

1991 Première structure RX d'un complexe DBD/ADN

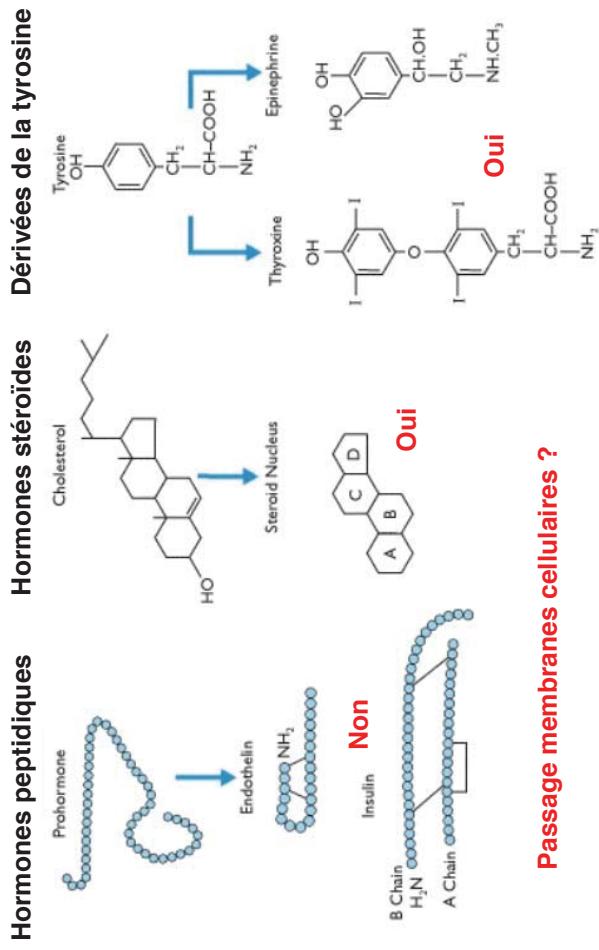
1995 Premières structures RX de LBD, avec et sans ligand

1995-2000 Recherche *in silico* de nouveaux gènes de RNs

2000 Séquençage du génome humain

2008 Première structure RX d'un hétérodimère de DBD-LBD en complexe avec l'ADN et un ligand

I - Introduction : 3 classes principales d'hormones humaines



Passage membranes cellulaires ?

+ eicosanoïdes, amines biogénes et dérivés

Séquençage du génome humain :

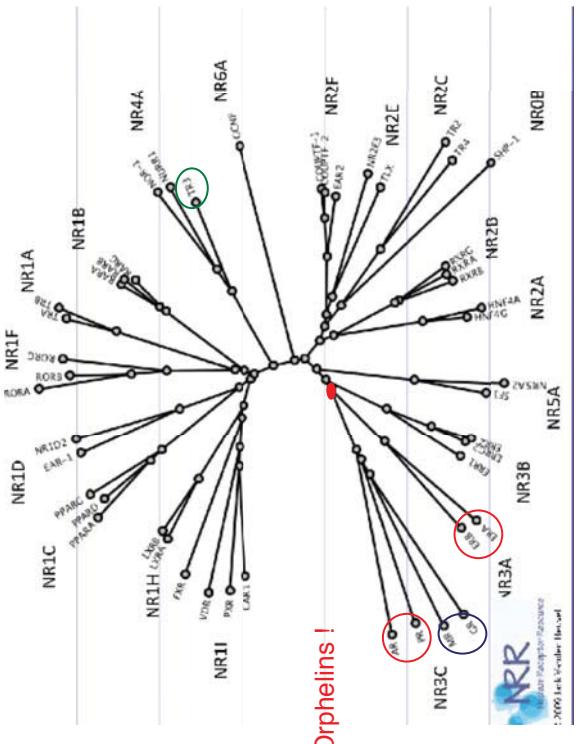
Ensemble des membres d'une famille pour un espèce donnée :

Génome	Taille (Mb)	RN
H. sapiens	3400	48
M. musculus	2500	
D. melanogaster	137	21
C. elegans	80	@250



+ variants d'épissage, mod° post-traductionnelles, dimérisation, cofacteurs, ...

Arbre phylogénétique des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires



Orphelins !

Défis analyses structurales :

- Déterminants de la **sélectivité d'un ligand** pour son récepteur ?

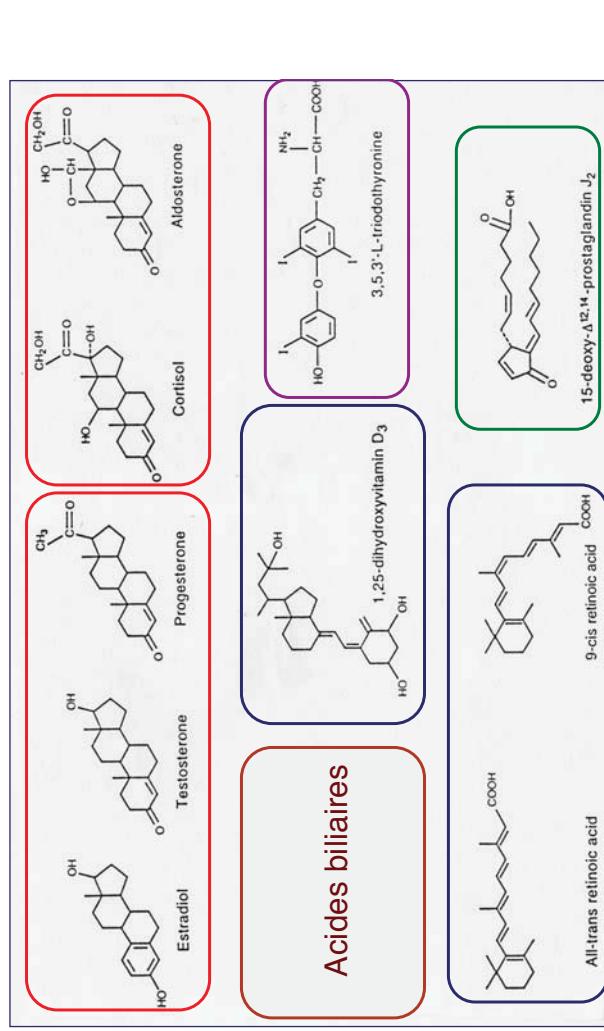
- Mécanisme moléculaires des **modulations transcriptionnelles**

activées par la fixation d'un ligand ?

- Reconnaissance d'une **région d'ADN** par chaque récepteur ?

- Mécanismes d'actions de composés **agonistes/antagonistes** ?

- Quelques ligands connus de récepteurs nucléaires :



I I- La superfamille des récepteurs nucléaires :

1- Les ligands

H. stéroïdiennes et thyroïdiennes hydrophobes (et autres !)

Transport par **protéines porteuses** dans le sang

Passage **mémbranaire** dans cellules cibles

Liaison **récepteurs spécifiques** (@ 10 000/cellule)

Action nucléaire de **Régulation transcriptionnelle** : plusieurs heures

2- Structures communes des récepteurs

Superfamille de **48 récepteurs** chez l'Homme

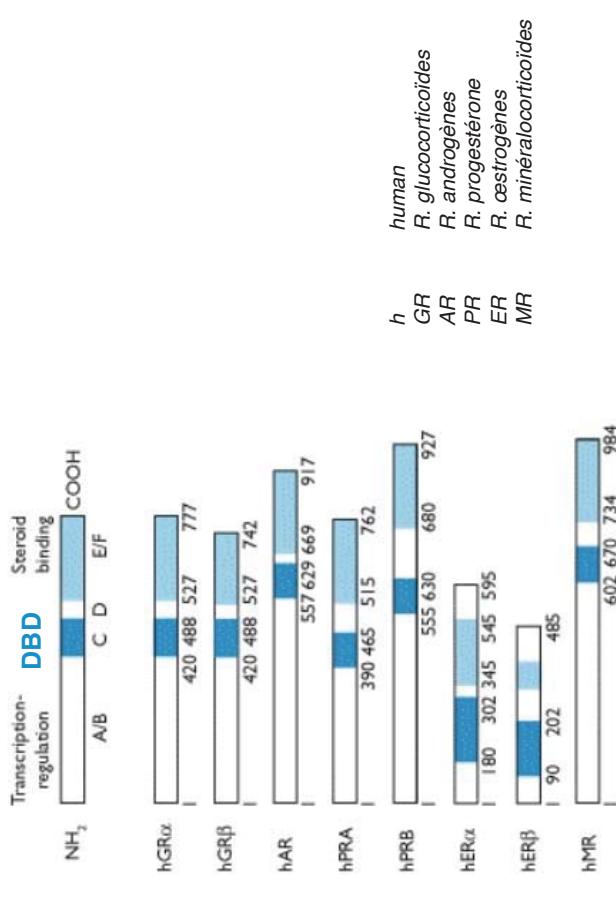
Protéines monocaténaires 430 à 1000 ac.a.

Réponse à des L. (stéroïdes, non stéroïdes et inconnus ...)

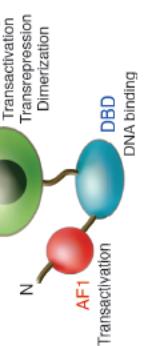
Facteurs de transcription : recrutement de **coA et/ou coR** (**AF1 et AF2**)

- Régulateurs de
 - prolifération cellulaire,
 - développement cellulaire
 - et **physiologie tissulaire**
 - (reproduction, homéostasie, métabolisme, ...).

Homologies de structure de R. nucléaires



Structure et fonction des 6 régions



A à F

LBD + AF2

Ligand binding
Transactivation
Transrepression
Dimérisation

AF1

Transactivation

AF2

Dimérisation

DNA binding

AF2/TR2

Hélice 12

AF2

AF

DBD

NLS

LBD

AF2

Variable

+++

-

++

++

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

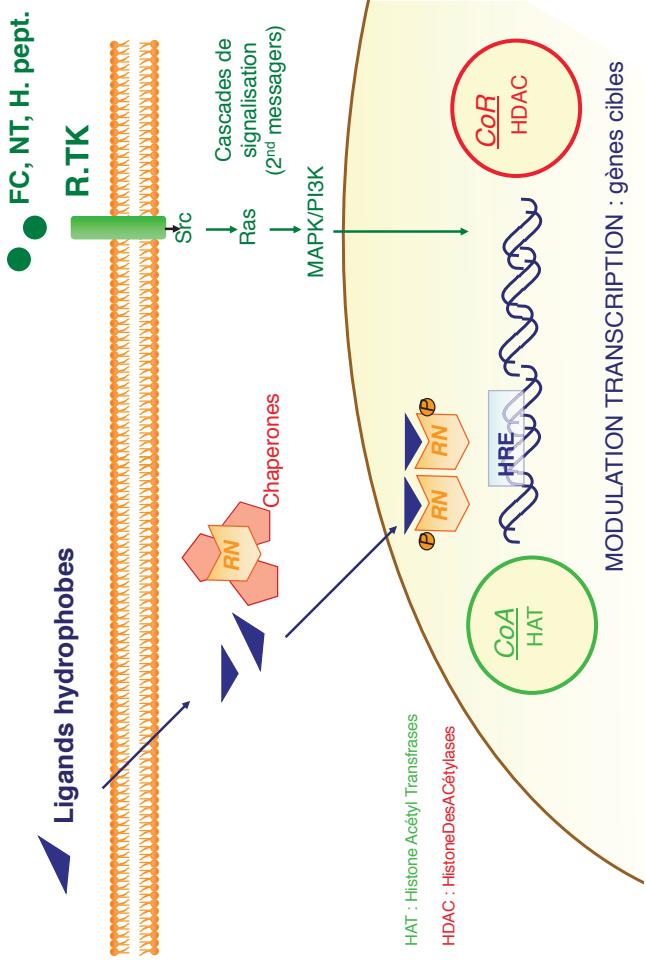
+

+

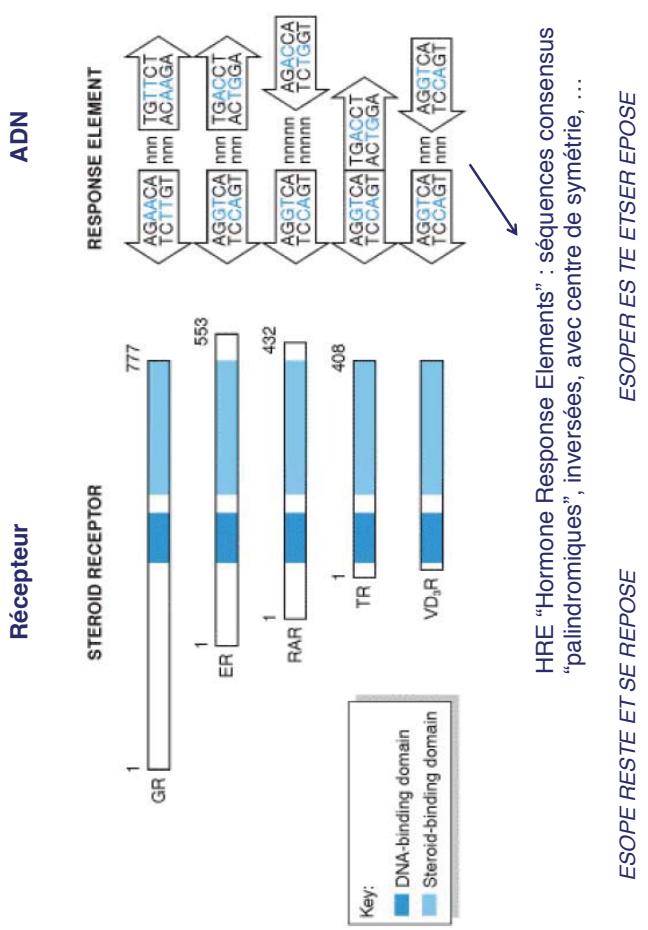
+

+

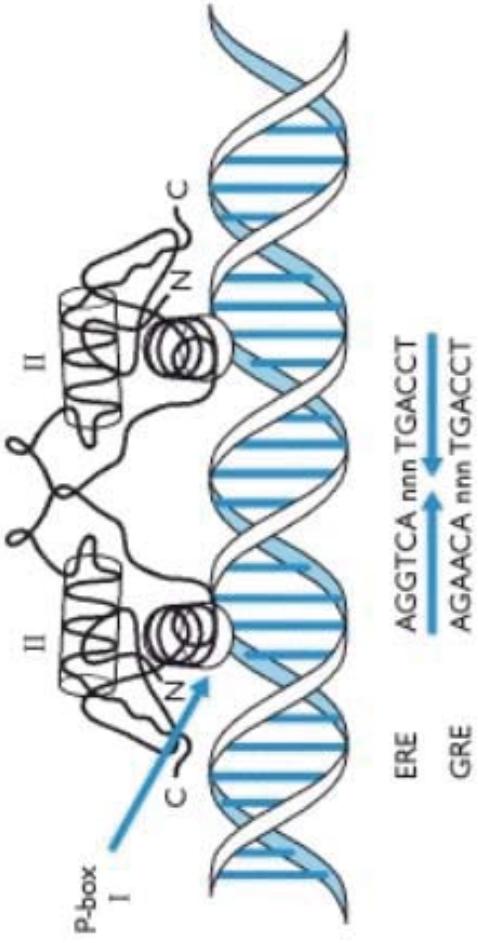
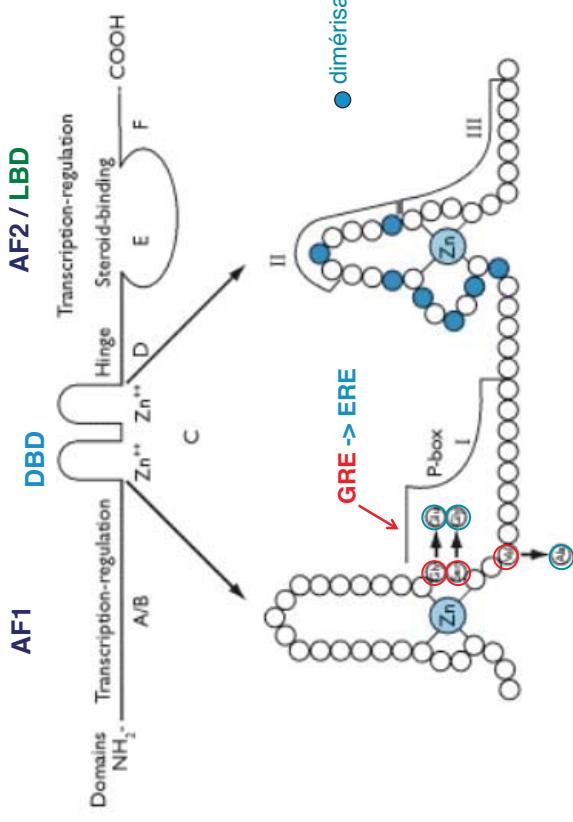
Mécanisme d'activation « classique » par le ligand



4- Mode de liaison des récepteurs à l'ADN

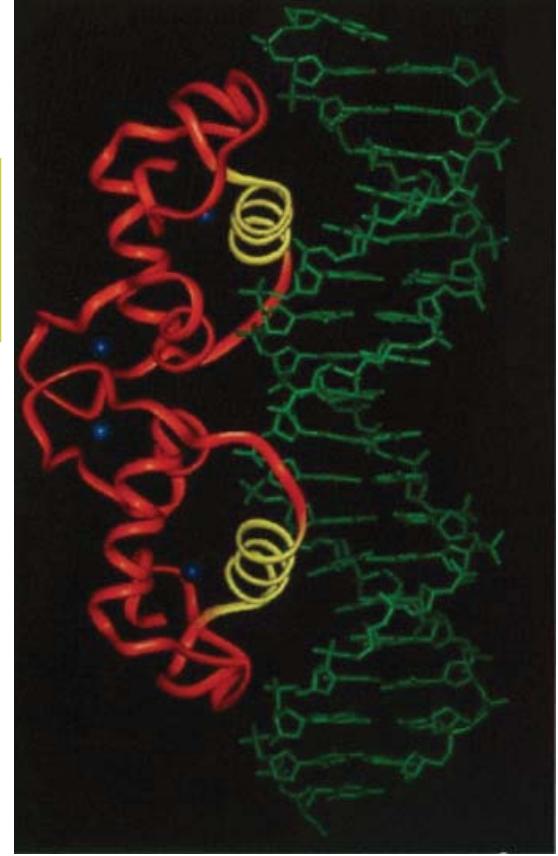


DBD et doigts de zinc ...

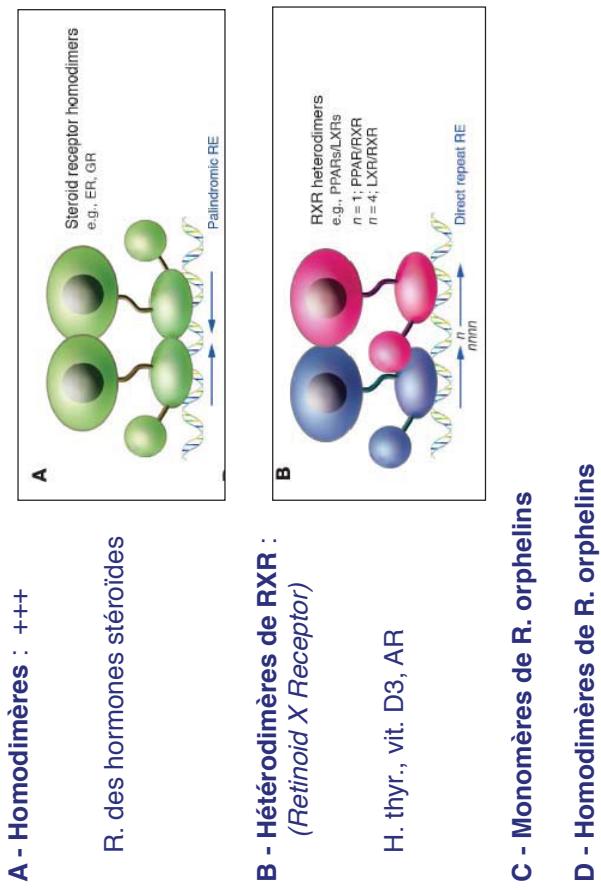


Structure 3D des DBD d'un homodimère de GR (cristallographie, Luigi 1991)

- Atomes de zinc



5 - Modes d'interaction des récepteurs nucléaires entre eux



III - Physiopathologies et approches pharmacologiques

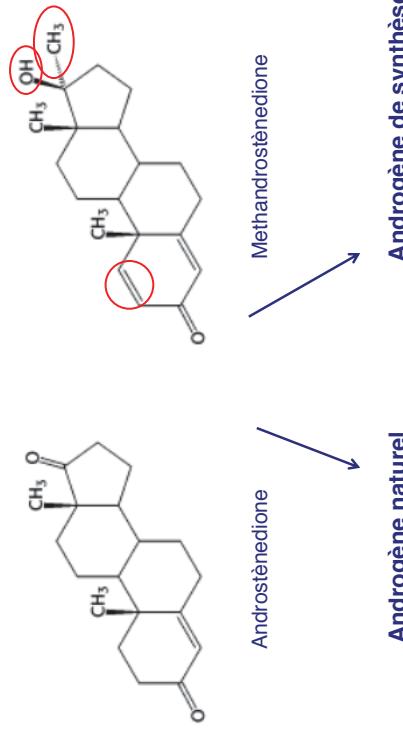
1- Exemples en physiopathologie → mutations géniques, translocations

(pour mémoire)

- . R. androgènes : phénomène féminin, stérilité inexplicable
- . R. œstrogènes : croissance anormale, ostéoporose, athérosclérose
- . R. Thyroïde : résistance aux H. thyroïdiennes
- . R. vitamine D : rachitisme pseudocarentiel
- . R. glucocorticoïdes : syndrome de Cushing
- . Translocation RAR : leucémie aigue promyélocytaire

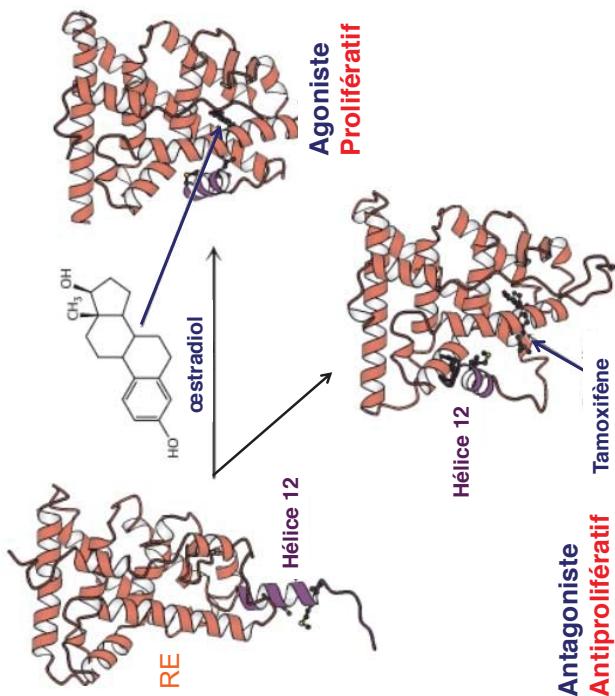
2- Modulateurs des récepteurs des hormones stéroïdes

- . R. androgènes : agonistes

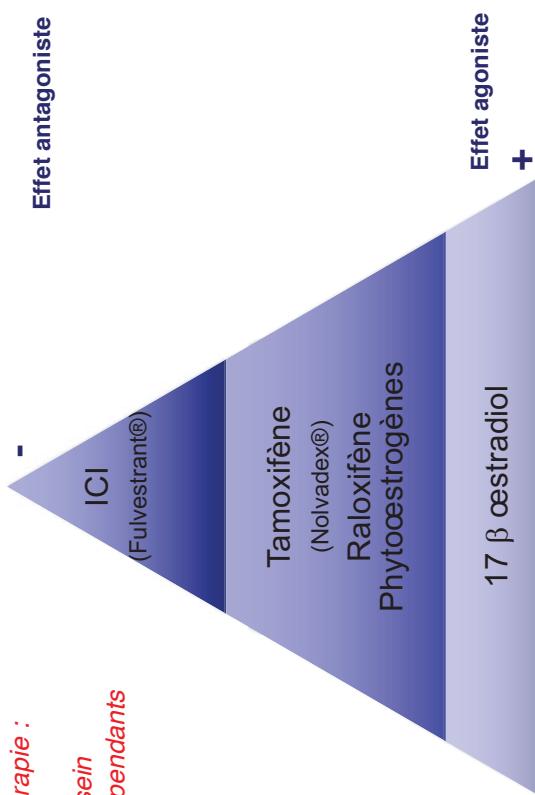


. R. œstrogènes : antagonistes et cancers du sein

SERM : Modulateurs spécifiques des récepteurs des œstrogènes



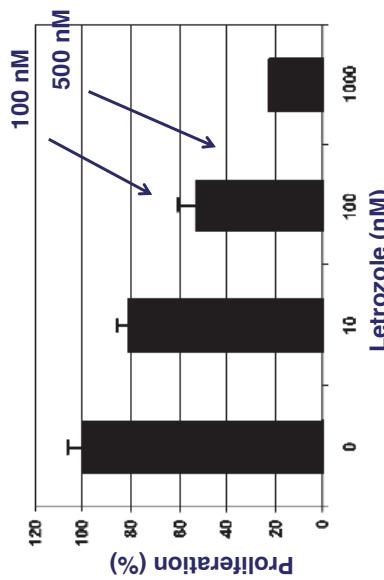
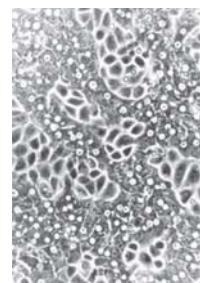
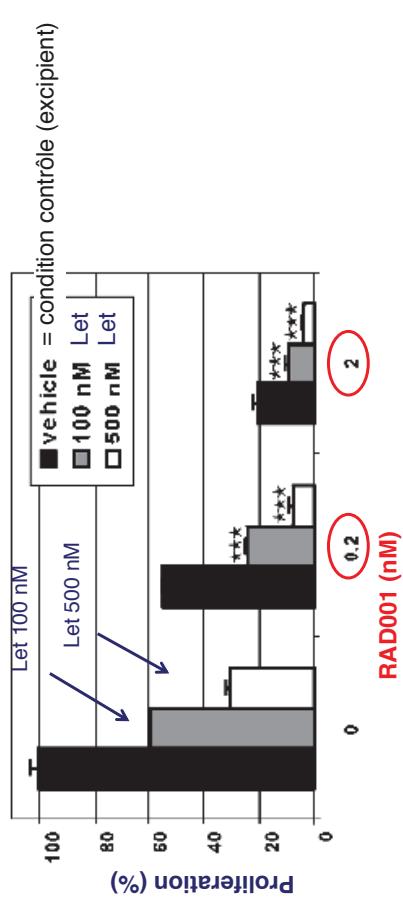
Hormonothérapie :
cancers du sein
hormono-dépendants

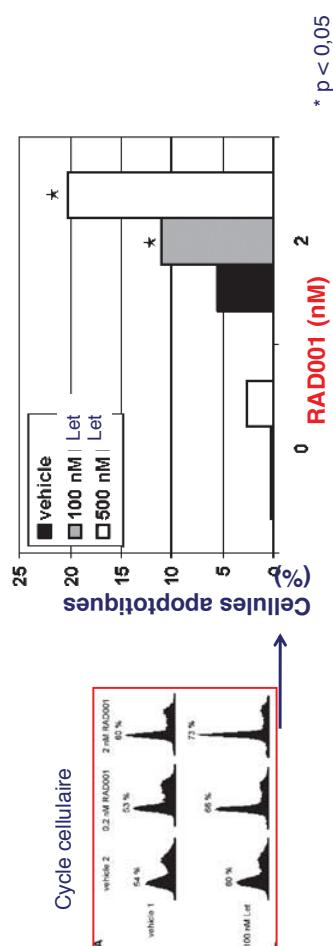
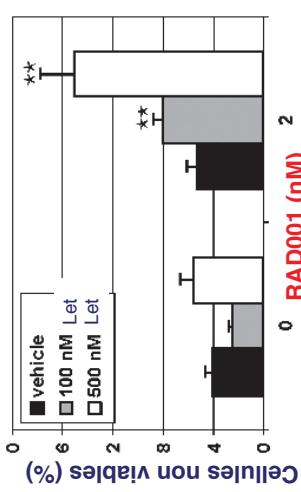


Effet de la combinaison du Letrozole et de Rad001
sur la prolifération de cellules MCF-7



Effet du Letrozole (anti-aromatase)
sur la prolifération de cellules MCF-7
(cancers du sein hormono-dépendants)





Boulay et al. 2005, Clin. Cancer Res., 11 (14), 5319-5328

Découverte des mécanismes moléculaires à l'origine de la modulation de l'apoptose

Bruno Ségui
Professeur de Biologie Cellulaire
Service de Biologie Cellulaire, d'Immunologie et d'Immunopharmacologie
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Toulouse III

- I- Les premières descriptions de la mort cellulaire
- II- A la découverte des gènes pro-apoptotiques
- III- A la découverte des gènes anti-apoptotiques
- IV- Principales voies de signalisation modulant l'apoptose

I- Les premières descriptions de la mort cellulaire

Flemming: «**Chromatolysis** «Fragmentation du noyau et du corps des cellules en train de mourir»

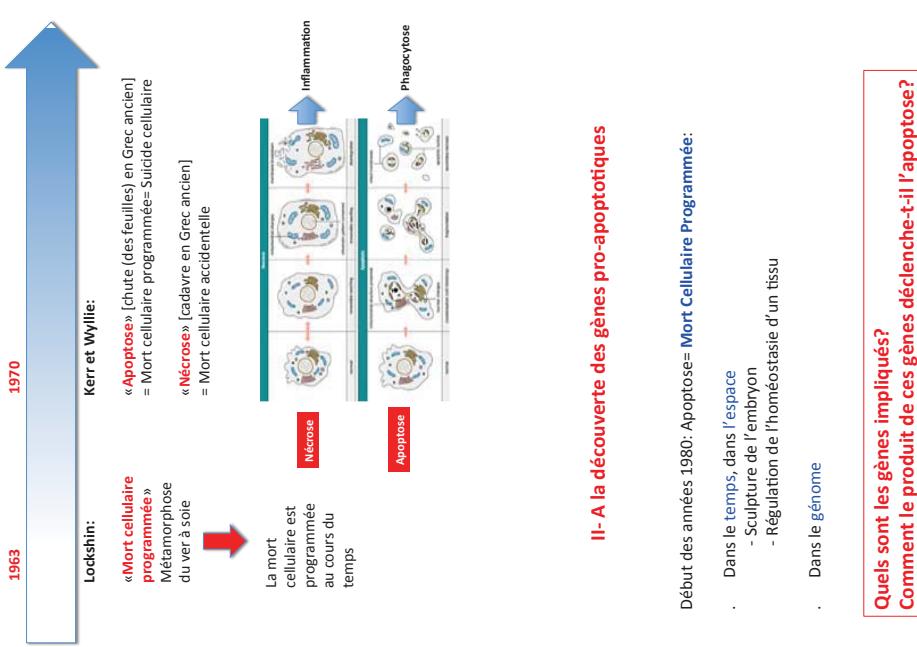
Glückmann: «Mort cellulaire au cours du développement embryonnaire»

Bessis: «Mort par fragmentation des **cellules du sang**»

→ Description caractéristiques morphologiques principales de l'**Apoptose**

→ Sculpture de l'organisme

Les cellules différencieront peuvent mourir



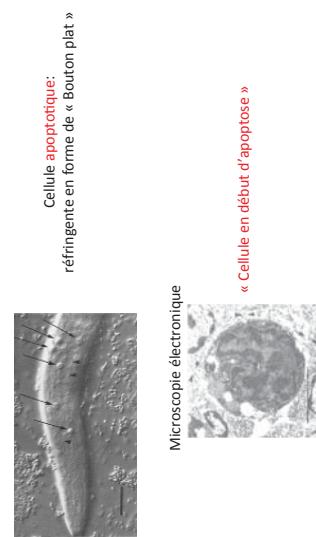
1- Le pari de la simplicité***Caenorhabditis elegans***

Sidney Brenner
Né en 1927 en Afrique du Sud
Né en 1942, en Angleterre

John Sulston
Né en 1947 aux États-Unis
Né en 1947 aux États-Unis



Identification des cellules qui meurent en microscopie
Sulston et Horvitz (Developmental Biology, 1977)

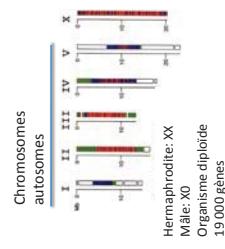
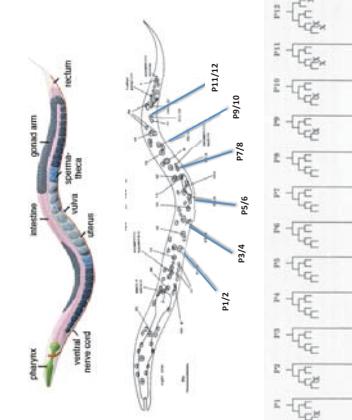
Embryon observé en microscopie à contraste de phase**2- Premières études sur *Caenorhabditis elegans***

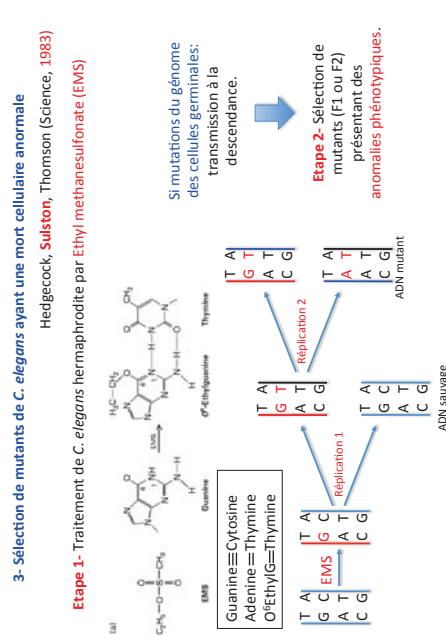
Métazoaire
Nématoïde, hermaphrodite ou mâle de 1 mm de long

Durée de vie: 3 semaines

Constitué de 159 cellules chez l'adulte

131 cellules meurent au cours du développement embryonnaire

Microscopie à contraste de phase**Cartographie des cellules qui meurent au cours du développement embryonnaire**

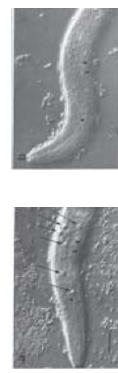


4- Identification de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques

Ellis et Horvitz, (Cell 1986)

Sélection de mutants ayant un défaut d'apoptose:

Mutant *C. elegans*

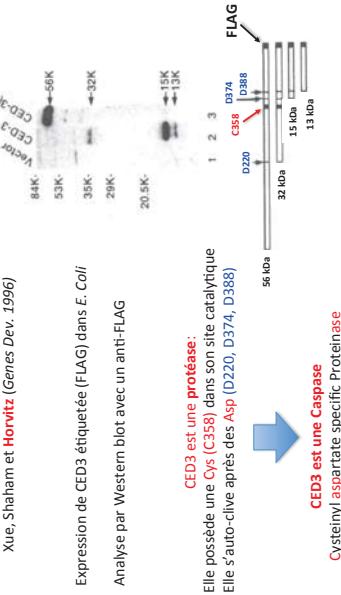


Identification des gènes *Ced-3* et *Ced-4: premiers gènes identifiés codant pour des protéines pro-apoptotiques**

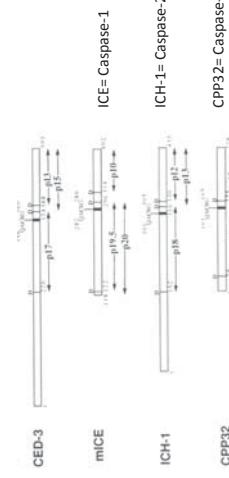
*Ced: Cell death abnormal

5- Découverte de la fonction du produit (CED3) du gène *Ced3*

Xue, Shaham et Horvitz (Genes Dev. 1996)



6- CED3 présente des homologies avec des cystéine protéases de mammifères



7- Les caspases sont impliquées dans le déclenchement de l'apoptose de cellules humaines

P-Juo, C. Kuo, J. Yuan, J. Blenis. Current Biology, 1998)

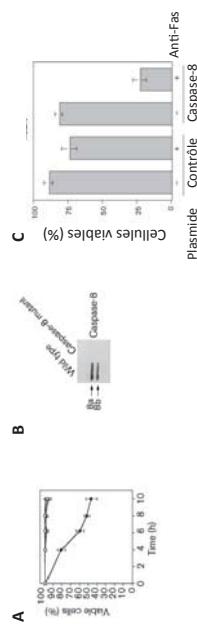
Exemple d'ordre de la caspase-8 dans la signalisation apoptotique de Fas (CD95)

Protocole expérimental:

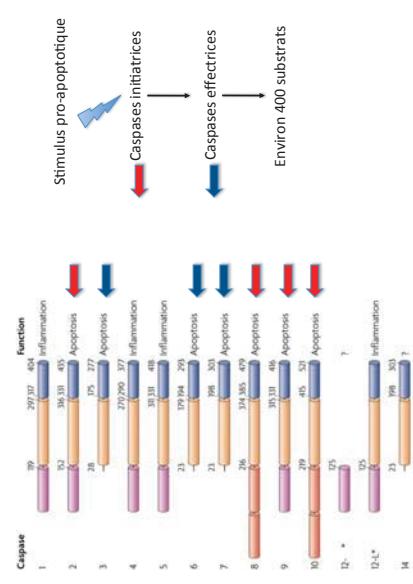
- 1- Traitement des cellules Jurkat avec un agent **mutagène**
- 2- Sélection des cellules **résistantes** à un anticorps anti-Fas agoniste (Figure A)

- 3- Étude par Western blot de l'expression de la caspase-8 (Figure B)

- 4- Complémentation génétique (Figure C)



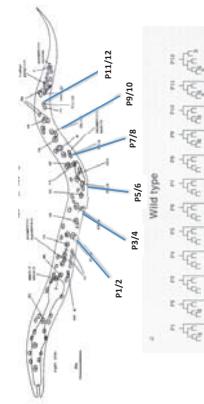
8- De 1990 à nos jours: découverte de différentes caspases chez l'Homme



III- A la découverte des gènes anti-apoptotiques

1- Isolement de mutants de *C. elegans* ayant un excès d'apoptose: identification de *Ced-9*.

Hengartner, Ellis, Horvitz (Nature, 1992)



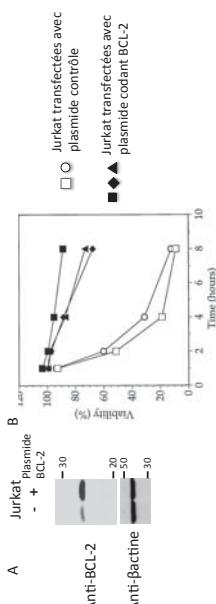
2- CED9 présente des homologies de séquence et de fonction avec BCL-2 (B-Cell Lymphoma 2)

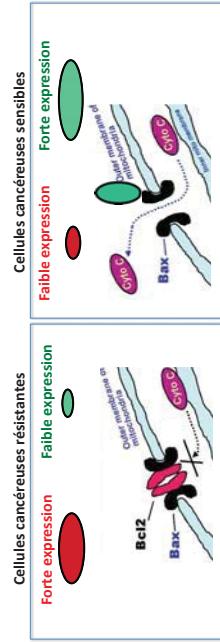
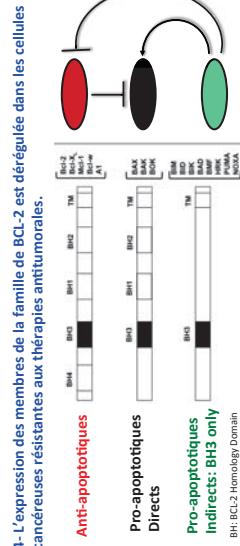
Hengartner, Horvitz (Cell, 1994)

3- L'expression de BCL-2 dans des cellules humaines inhibe l'apoptose.

Armstrong et al. (J. Biol. Chem., 1996)

- 1- Transfection de cellules Jurkat avec un plasmide permettant l'expression de BCL-2 ou avec un plasmide contrôle.
- 2- Validation de l'expression de BCL-2 par western blot (Figure A)
- 3- Incubation des cellules Jurkat exprimant fortement ou faiblement la protéine BCL-2 en présence d'anti-Fas agonite.
- 4- Analyse de la viabilité cellulaire (Figure B).

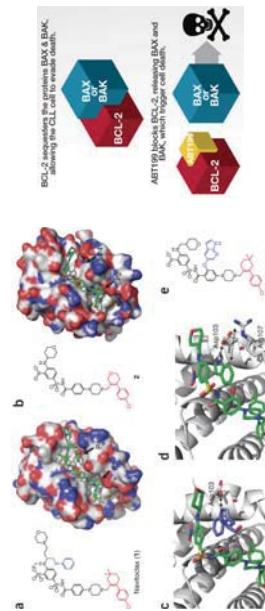




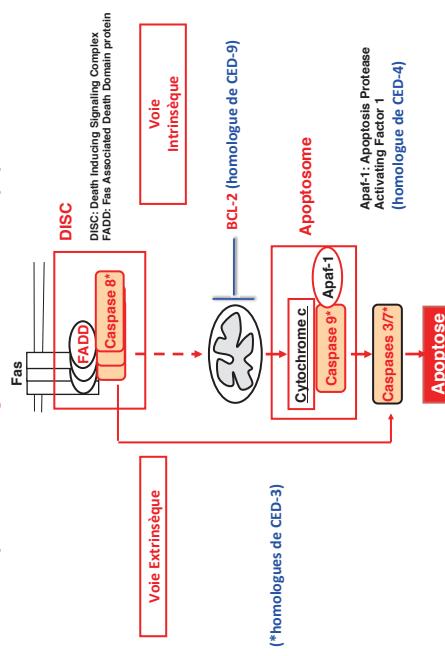
5- Stratégies pour inhiber les protéines anti-apoptotique de la famille de Bcl-2.

Inhibiteurs pharmacologiques (ABT199): peptidomimétiques

Peptidomimétiques: Composés conçus pour imiter un peptide biologiquement actif



IV- Principales voies de signalisation modulant l'apoptose



De la découverte du TNF α au développement de « protéines médicaments »

Bruno Ségui
 Professeur de Biologie Cellulaire
 Service de Biologie Cellulaire, d'Hématologie et d'Immunologie
 Faculté des Sciences Pharmaceutiques
 Toulouse III

- I- Découverte du TNF α [Tumor Necrosis Factor α]
- II- Clonage du gène codant pour le TNF et production de TNF recombinant
- III- Clonage des gènes codant pour les récepteurs au TNF
- IV- Génération des souris TNF-R1 KO
- V- Rôles biologiques du TNF et de ses récepteurs

Une anecdote intrigante:

- Opération d'un patient (Fred Stein, Allemand)
- Développement d'une infection bactérienne post-opératoire
- Disparition du sarcome et survie du patient



Hypothèse (controversée) de Coley:

L'infection bactérienne peut induire des effets anti-tumoraux

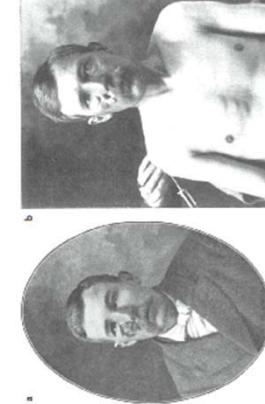
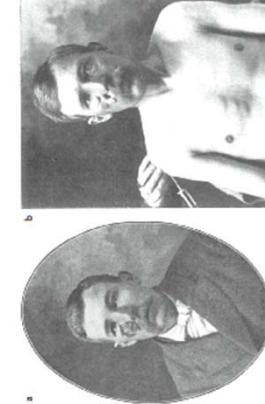
Les travaux controversés de William Coley...

Première stratégie thérapeutique:

Infection des patients avec des bactéries isolées... nombreux échecs

Deuxième stratégie thérapeutique:

Injection de lysats bactériens (Toxines de Coley)... quelques succès



L'héritage de William Coley...

1892: Début des travaux de William Coley (Chirurgien, New York.)

Cancer invasif se développant à partir du tissu conjonctif

(Gratia et Linz)

1944: Les **toxines bactériennes** (polysaccharides) sont impliquées dans la nécrose des tumeurs (Shear et Perrault)

1962: Les toxines bactériennes (polysaccharides) induisent la production d'un **facteur soluble dans le sérum des souris** (Shear et al.)



Souris A:
 Injection de cellules tumorales

Souris B:
 (i) Injection de cellules tumorales
 (ii) Injection du sérum des souris A

Souris C:
 Croissance tumorale
 Nécrose tumorale

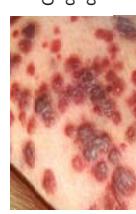
1- Injection de polysaccharides bactériens
 2- Prise de sang
 3- Coagulation sanguine, centrifugation:
Surmagéant = sérum

1899: patient atteint de sarcome avec métastases abdominales
 1910: après 63 injections des « Toxines de Coley »: diminution du sarcome

I- Découverte du TNF (Tumor Necrosis Factor)

1892: Début des travaux de William Coley (Chirurgien, New York.)

Opérations de patients atteints de sarcome cutané: nombreux échecs.



Cancer invasif se développant à partir du tissu conjonctif

Bruno Ségui

1975 : Les souris infectées par le BCG (Bacille de Calmette-Guérin) et injectées avec LipoPolySaccharide d'*E. coli* produisent un facteur de nécrose tumorale (TNF) qui est directement毒ique pour les cellules cancéreuses (Carswell et al., PNAS).

Le TNF est directement toxique pour des fibrosarcomes *in vitro*

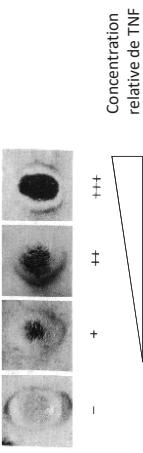
- A de souris A par le BCG.**
10 jours après, injection de LPS.
Sang 30 min à 4 heures après.
Prélèvement des sérum.

Développement tumoral:

 - 1- Injection sous-cutanée des **souris B** avec des cellules de fibrosarcome.
 - 2- 7 jours après: tumeur de 7-8 mm de diamètre

Nécrose tumorale chez les souris B:

- 1- Injection de 0,5 ml de sérum de souris A chez les souris B développant des tumeurs
- 2- 24 heures après, évaluation de la nécrose tumorale



II- Clonage du gène codant pour le TNF et production de TNF recombinant

1984: Pennica et al., Nature; Gray et al., Nature
Protocol

- Purification** biochimique du TNF (17 kDa)

 - [i] Digestion modérée par des protéases; génération de peptides
 - [ii] Séquençage des peptides
 - [iii] Déduction de la **SEQUENCE NUCLÉIQUE**
 - [iv] Amplification de l'ADN complémentaire par PCR
 - [v] Clonage de l'ADN complémentaire dans un vecteur d'expression
 - [vi] Transformation d'*E. coli*; synthèse de **TNF recombinant**
 - [vii] **Purification** du TNF recombinant

Le TNF recombinant induit:

- la mort des cellules tumorales

- La mort de cellules tumorales *in vitro*
 - La nécrose des tumeurs *in vivo*

A photograph showing a small, dark, irregularly shaped tumor growing on the ear of a mouse. The tumor has a slightly raised, granular surface and is situated on the dorsal side of the ear.

Peut-on utiliser le TNF recombinant chez l'Homme comme médicament anti-tumoral?

1997 Special Edition

- Injection intraveineuse de TNF (**administration systémique**)
219 patients

219 patientes
Injection intraveineuse de TNF (anti-TNF)
↓

Effets secondaires: syndrome inflammatoire, œdème pulmonaire, hypotension, hépatotoxicité

1992: Injection locale de TNF recombinant chez des patients atteints de sarcome et de mélanome.

- ▶ Régression tumorale
- Effets secondaires limités
- Traitement réservé au cancer non métastatique

III- Clonage des gènes codant pour les TNF récepteurs

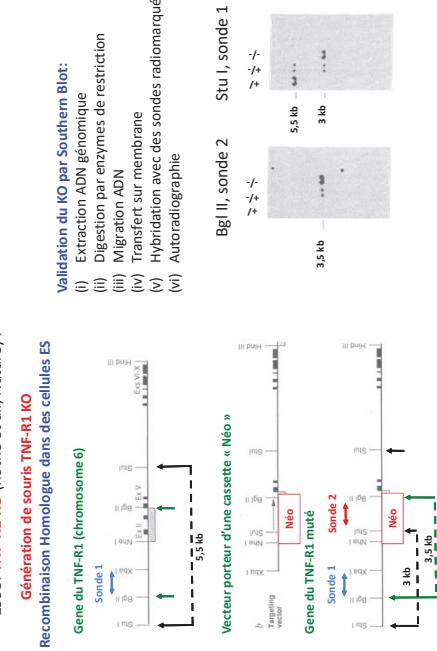
1990: Loetscher et al., Cell; Schall et al., Cell

Protocole

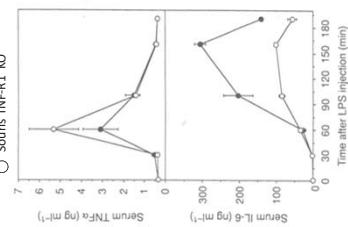
- Purification biochimique de protéines interagissant avec le TNF
 - Clonage modérée par des protéoses; génération de **péptides**
 - Clonage de l'**ADN complémentaire** dans un vecteur d'expression eucaryote
 - Transfection de cellules de mammifère
 - Etude de liaison** du TNF recombinant
- Le TNF interagit spécifiquement avec 2 récepteurs membranaires:
- TNF-R1, 55 kDa
 - TNF-R2, 75 kDa
-

**IV- Génération de souris TNF-R1 KO et étude de leur phénotype**

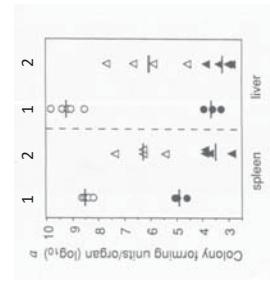
1993: TNF-R1 KO (Rothe et al., Nature):

Génération de souris TNF-R1 KO**Etude du phénotype des souris TNF-R1 KO:**

1993: Diminution de la réponse anti-infectieuse chez les souris TNF-R1 KO

Souris sauvages**Souris TNF-R1 KO****Protocole**

- Injection de *Listeria monocytogenes* (1: forte quantité; 2: faible quantité) chez des souris sauvages ou des souris TNF-R1 KO
- Sacrifice des animaux 4 jours après l'injection
- Broyat de rate et de foie
- Quantification de *L. monocytogenes* dans les broyats de rate et de foie sur des boîtes de pétri de « gélose au sang ».



1993: Diminution de la réponse anti-infectieuse chez les souris TNF-R1 KO

Souris sauvages**Souris TNF-R1 KO**

- Injection de *Listeria monocytogenes* (1: forte quantité; 2: faible quantité) chez des souris sauvages ou des souris TNF-R1 KO
- Sacrifice des animaux 4 jours après l'injection
- Broyat de rate et de foie
- Quantification de *L. monocytogenes* dans les broyats de rate et de foie sur des boîtes de pétri de « gélose au sang ».



1996: Diminution de l'arthrite chez les souris TNF-R1 KO
(Mori et al., J. Immunol)

Protocole
(i) Immunisation des souris sauvages ou TNF-R1 KO avec des injections de collagène de type II (deux injections à 21 jours d'intervalle)

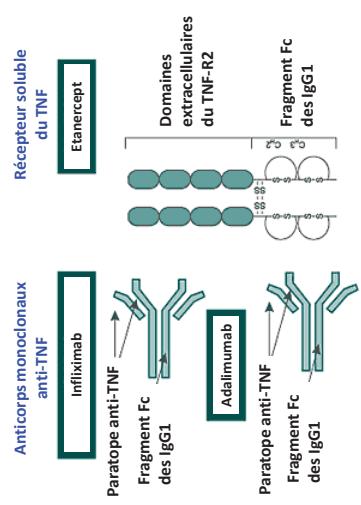


(i) Evaluation des atteintes articulaires: établissement d'un score proportionnel à la sévérité des atteintes articulaires des 4 pattes :
Grade 0: normal; grade 1: œdème; grade 2: déformation; grade 3: ankylose (flexion réduite)



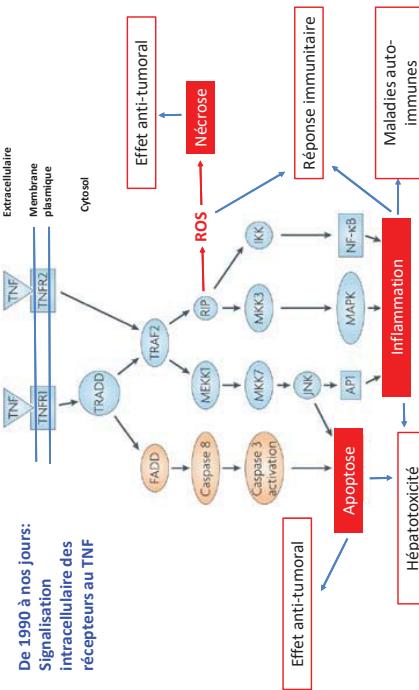
Souris	Souris avec Arthrite	Incidence %	Nombre de pattes atteintes	Score
Sauvages	9/14	64	3	9
TNF-R1 KO	6/33	18	1	3
Sauvages + TNF-R soluble	3/20	15	1	3

Peut-on utiliser des molécules qui neutralisent le TNF chez l'Homme comme médicament anti-inflammatoire?



Indication: polyarthrite rhumatoïde, maladie de Crohn
Effets secondaires: (i) infections; (ii) cancers

V. Rôles biologiques du TNF et de ses récepteurs





Introduction

Differentes stratégies pour l'obtention de substances chirales sous la forme énantiopure

PACES - « UE8 »



Faculté de Pharmacie
Enseignante : Pr. Vania BERNARDES-GENISSON





Introduction

J.-B. BIOT (1774-1862)

Biot a découvert en 1815 que lorsque la lumière polarisée pénètre certaines substances organiques en solution, son plan de polarisation peut dévier de son inclinaison initiale. Il peut tourner dans le sens des aiguilles d'une montre (+), ou en sens inverse (-), selon la substance traversée. Biot mesure ainsi la rotation optique d'une solution de l'acide tartrique.





Etude de différentes stratégies pour l'obtention substances chirales sous la forme énantiopure



Plan

1. Introduction et historique
2. Nomenclature de molécules chirales
3. Stéréochimie
4. Chiralité moléculaire dans le système du vivant
5. Exemples de médicaments chiraux
6. Modes d'obtention de molécules organiques optiquement actives
7. Résolution
8. Pool chiral
9. Synthèse asymétrique

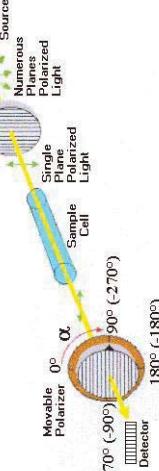




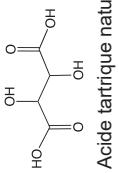
Introduction

J.-B. BIOT (1774-1862)

Schéma d'un polarimètre







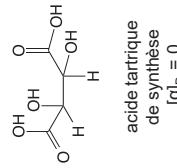
Acide tartrique naturel

Introduction



**L. PASTEUR
(1822-1895)**

En 1849 Pasteur a résolu en partie le mystère de l'activité optique de l'acide tartrique que Biot avait découvert. La question était la suivante : l'acide tartrique naturel a un pouvoir rotatoire alors que l'acide tartrique de synthèse n'en a pas.



Introduction



**J.-B. BIOT
(1774-1862)**

$$\text{Loi de BIOT : } [\alpha]_D = \frac{\alpha}{l \times c}$$

[α]_D = pouvoir rotatoire spécifique

α = angle de déviation

l = longueur de la cuve contenant la substance

c = concentration de la substance à analyser

T = 20° C en général

Introduction



**L. PASTEUR
(1822-1895)**

Pourquoi certaines substances dévient le plan de la lumière ?



Introduction



**L. PASTEUR
(1822-1895)**

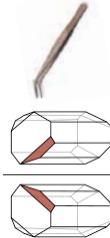
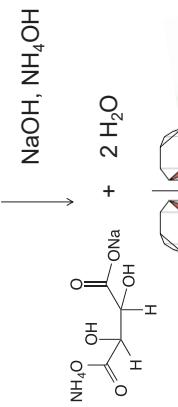


Image l'un de l'autre dans le miroir

Introduction



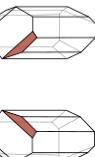
**L. PASTEUR
(1822-1895)**

Acide tartrique naturel



Actif optiquement

Acide tartrique de synthèse



Pas d'activité optique

O=C(OCC(=O)O)C(O)(O)C(=O)O

Introduction



En 1898, le physicien anglais Lord Kelvin donne le nom de **chiralité** à la propriété qui distingue les énantiomères d'une même molécule.

* du mot grec *cheir* qui signifie main



Un objet est dit **chiral*** si l'image de cet objet dans un miroir n'est pas superposable à l'objet d'origine.

Introduction



**L. PASTEUR
(1822-1895)**

Séparation des cristaux



Cristal non superposable



Image l'un de l'autre dans le miroir

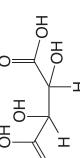
Nouvelle propriété : chiralité

Introduction



**L. PASTEUR
(1822-1895)**

Acide tartrique naturel

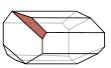


NaOH, NH₄OH

$\xrightarrow{\hspace{1cm}}$

[NH3+][OH-]C([NH3+])C(O)[C@@H](O)[C@H](O)C(=O)O + 2 H₂O

Sel d'acide tartrique cristallisé



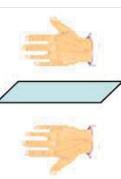
Introduction



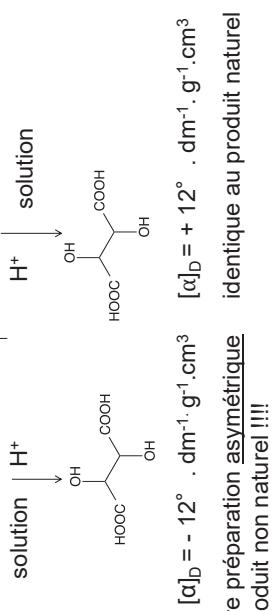
La chiralité (du grec: **cheir** = main) est une propriété fondamentale des objets tridimensionnels.

Une molécule est dite chiraile lorsqu'elle n'est pas superposable à son image dans un miroir (image-miroir).

Bien qu'il n'y ait pas de relation évidente entre la **chiralité macroscopique et la chiralité des molécules**



Introduction



Introduction



Chiralité moléculaire ou assemblage asymétrique de molécules symétriques ?

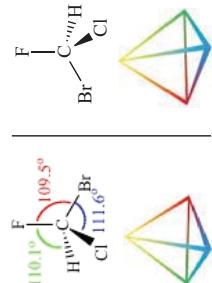
Pasteur a ainsi démontré que la chiralité avait une origine moléculaire. On savait à l'époque que les cristaux étaient des assemblages moléculaires. Mais on ne savait pas encore si la chiralité des cristaux de tartares était liée à un assemblage asymétrique de molécules symétriques, ou si les molécules constituant le cristal étaient elles-mêmes chirales.

L'asymétrie moléculaire \Rightarrow la base de la stéréochimie



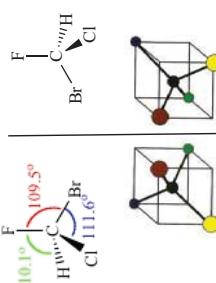
Introduction

Lorsque le carbone présente 4 substituants différents, on dit qu'il est asymétrique et que la molécule est chirale.



Introduction

Lorsque le carbone présente 4 substituants différents, on dit qu'il est asymétrique et que la molécule est chirale.



La chiralité peut être portée par un carbone asymétrique ou encore par d'autres éléments qui ne feront pas objet de ce cours.



Introduction

Question

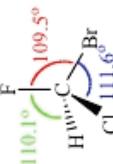
Quel est l'élément moléculaire qui est responsable de cette chiralité ?



Introduction

Friedrich Kekulé (1829-1896) : établit la valence 4 du carbone

Jacobs van't Hoff (1852-1911)/ J.-A. Le Bel: corrèlent l'activité optique d'un composé au fait que les liaisons chimiques entre le carbone et les groupes voisins sont disposées selon un tétraèdre.

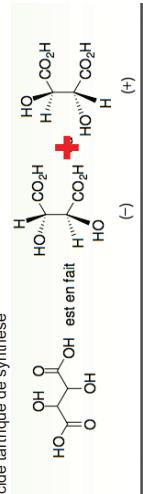


Introduction



Il a été compris que :

Acide tartrique de synthèse

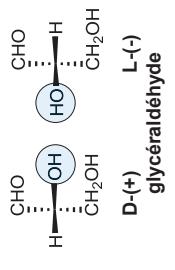


Mélange racémique
= Mélange équimolaire des 2 énantiomères

Nomenclature de molécules chirales



Nomenclature de Fischer



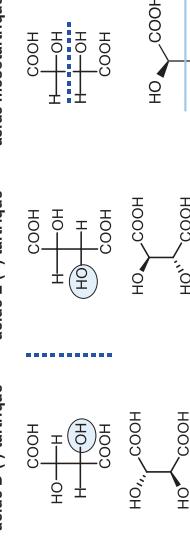
[représentation de Fischer]

Introduction



Comment définir la stéréochimie du carbone ?

acide D-(+)-tartrique acide L-(+)-tartrique acide mesotartrique



acide DL-tartrique (racémique)

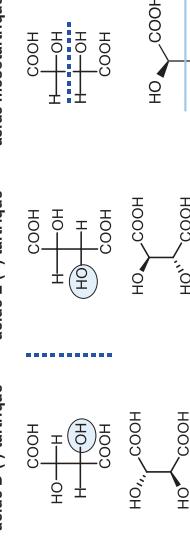
Plan de symétrie

Nomenclature de molécules chirales



Exemple

acide D-(+)-tartrique acide L-(+)-tartrique acide mesotartrique



acide DL-tartrique (racémique)

Plan de symétrie

Nomenclature de molécules chirales



Regles de Cahn-Ingold-Prelog : R et S notation

Composés tétraédriques: centre X porteur de 4 substituants différents.

On classe les ligands selon un ordre de priorité: (a>b>c>d) donné par les poids atomiques:

H < D < T < Li < B < C < N < O < F < Na < Mg < Al < Si < P < S < Cl < etc.... du premier atome fixé sur X.

Si deux atomes de la première analyse sont identiques, on considère les atomes suivants, etc.

S

Br : 80
Cl : 35,5
F : 19
H : 1

R

Br : 80
Cl : 35,5
F : 19
H : 1

Diagramme montrant deux molécules tétraédriques. La première molécule (S) a un atome central avec quatre substituants: un Br (1), un Cl (2), un F (3) et un H (4). Les liaisons sont indiquées par des traits courts et des points courts. La deuxième molécule (R) a un atome central avec les mêmes substituants dans l'ordre inverse: un H (1), un F (2), un Cl (3) et un Br (4).

Nomenclature de molécules chirales



Exemple

Diagramme montrant une molécule chirale avec un atome central portant quatre groupements: un COOH (1), un OH (2), un H (3) et un OH (4). Les liaisons sont indiquées par des traits courts et des points courts. L'atome est étiqueté avec une flèche vers le haut et une lettre S, indiquant qu'il s'agit d'un centre S (stéréo-isomère).

Nomenclature de molécules chirales



Regles de Cahn-Ingold-Prelog : R et S notation

Composés tétraédriques: centre X porteur de 4 substituants différents.

On classe les ligands selon un ordre de priorité: (a>b>c>d) donné par les poids atomiques:

H < D < T < Li < B < C < N < O < F < Na < Mg < Al < Si < P < S < Cl < etc.... du premier atome fixé sur X.

Si deux atomes de la première analyse sont identiques, on considère les atomes suivants, etc.

Nomenclature de molécules chirales



Diagramme montrant une molécule chirale avec un atome central portant quatre groupements: un OH (1), un OH (2), un COOH (3) et un H (4). Les liaisons sont indiquées par des traits courts et des points courts. L'atome est étiqueté avec une flèche vers le bas et une lettre R, indiquant qu'il s'agit d'un centre R (stéréo-isomère).

Chiralité moléculaire dans les systèmes du vivant

Au niveau moléculaire la dissymétrie prédomine

ACIDES AMINÉS

Diagram showing the chemical structures of various L-amino acids (L-Alanine, L-Arvadine, L-Asparagine, L-Aspartate, L-Cysteine) and D-amino acids (D-Glutamine, D-Alanine). A blue arrow points from the L-amino acids towards the DNA helix.

DNA

SUCRES

Diagram showing the chemical structures of D-glucose and D-fructose, with a blue arrow pointing from the D-glucose structure towards the DNA helix.

DNA

Chiralité moléculaire dans les systèmes du vivant

Au niveau moléculaire la dissymétrie prédomine

DNA

SUCRES

Diagram showing the chemical structures of glucose and fructose, with a blue arrow pointing from the glucose structure towards the DNA helix.

LIPIDES

Diagram showing the chemical structures of cholesterol, androstanone, and derivatives of sterols.

PROTEINES

Diagram showing the chemical structure of alanine, with a blue arrow pointing from the structure towards the DNA helix.

OSIDES

Diagram showing the chemical structure of sucrose.

ACIDES NUCLÉIQUES

Stéréochimie

La stéréochimie se réfère à la chimie en 3 dimensions

(grec: **stereos** = solide). C'est une science créée par Pasteur (1860), van'Hoff (1874) et Le Bel (1874): carbone au centre d'un tétrahèdre.

Diagram of a tetrahedral carbon atom bonded to four different groups: F (green), H (red), Cl (blue), and Br (purple). The bond angles are labeled: 110.1° (F-H), 109.5° (Cl-Br), and 111.6° (H-Cl).

Chiralité moléculaire dans les systèmes du vivant

A la première vue la symétrie paraît être une caractéristique dominante dans la nature...

PROTEINES

OSIDES

ACIDES NUCLÉIQUES

LIPIDES

DERIVES STÉROLIQUES

ANDROSTANE

SUCRES

GLUCOSE

ALANINE

ACIDES AMINÉS

DNA

SUCRES

DNA

PROTEINES

OSIDES

ACIDES NUCLÉIQUES

LIPIDES

DERIVES STÉROLIQUES

ANDROSTANE

SUCRES

GLUCOSE

ALANINE

ACIDES AMINÉS

DNA

SUCRES

DNA

Chiralité moléculaire dans les systèmes du vivant

Au niveau moléculaire la dissymétrie prédomine

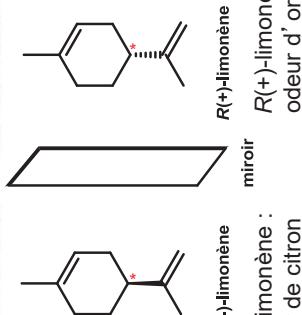
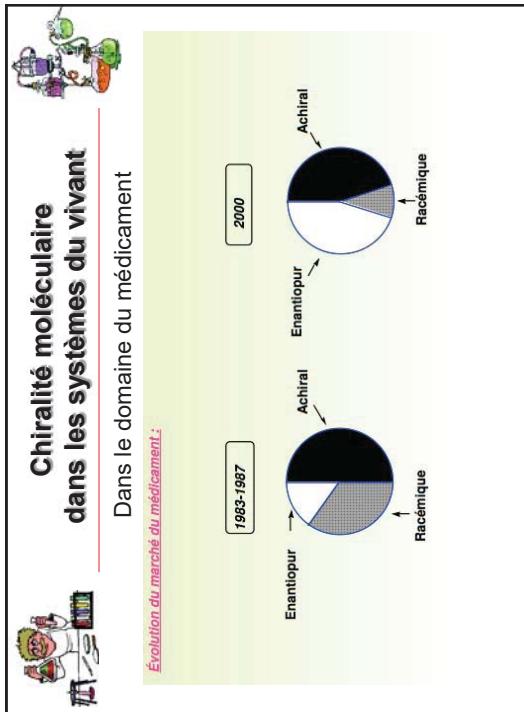




Stéréospécificité des récepteurs olfactifs

S(+)-limonène :
odeur de citron

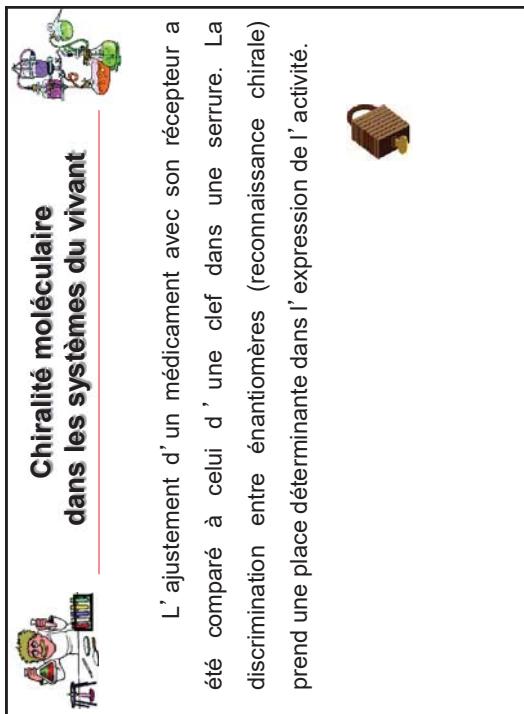
R(+)-limonène :
odeur d'orange

Chiralité moléculaire dans les systèmes du vivant

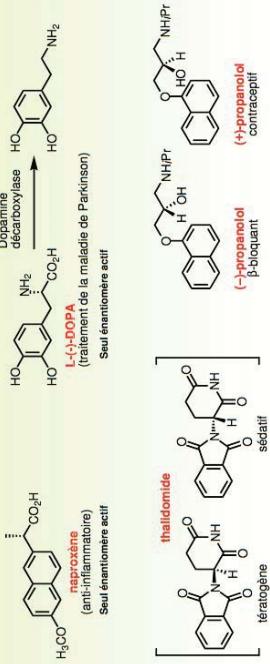



Les cibles des médicaments sont principalement des protéines, des enzymes, des récepteurs biologiques membranaires et nucléaires qui présentent une topologie spatiale tridimensionnelle bien définie et asymétrique. Il est évident que les interactions de médicaments chiraux avec ces cibles biologiques peuvent se dérouler plus favorablement avec l'un des deux énantiomères.



Exemples de médicaments chiraux



Dopamine décarboxylase

L-DOPA
(traitement de la maladie de Parkinson)

Seul énantiomère actif

Les exemples présentés précédemment démontrent la grande nécessité de développer des méthodes de préparation de médicaments énantiopures.



Exemples de médicaments chiraux

Dopamine décarboxylase

L-DOPA
(traitement de la maladie de Parkinson)

Seul énantiomère actif

Les exemples présentés précédemment démontrent la grande nécessité de développer des méthodes de préparation de médicaments énantiopures.



Exemples de médicaments chiraux

A ne pas oublier aussi :

L'interaction d'un médicament avec sa cible pharmacologique ou toxicologique n'est pas la seule étape critique au plan de la chiralité.

Depuis son administration jusqu'à son élimination de l'organisme, la chiralité du médicament peut jouer un rôle à différents niveaux :

absorption,
transport,
métabolisme,
excrétion ...



Modes d'obtention de molécules organiques optiquement actives

Méthodes

a) Résolution (séparation)

b) A partir d'un « pool » chiral

c) Par synthèse asymétrique à partir de substrats achiraux
(chimie ou biologie)



Modes d'obtention de molécules organiques optiquement actives

Méthodes

a) Résolution (séparation)

b) A partir d'un « pool » chiral

c) Par synthèse asymétrique à partir de substrats achiraux
(chimie ou biologie)

 **Résolution**

C'est la méthode visuelle de Pasteur

Approches

- physical
- biologie
- chimie

 **Résolution optique**

C'est la méthode visuelle de Pasteur appliquée à la séparation des tartrates d'ammonium et de sodium (cristaux hemihédriques). Cette méthode ne peut pas être employée industriellement. Elle peut, cependant, être utilisée pour obtenir des "semis" de cristaux énantiomériquement purs qui serviront à "inoculer" la cristallisation d'un énantiomère d'une solution sur saturée d'un mélange racémique.

 **Résolution optique**

C'est la méthode visuelle de Pasteur

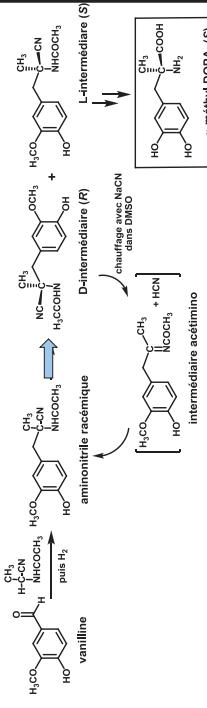
Dans le cas général, la cristallisation d'un racémique conduit à des cristaux associant au sein d'un même cristal et à part égale les 2 énantiomères. Dans l'expérience de Pasteur, par chance, la cristallisation du racémique a conduit à un conglomérat d'énantiomères (cristaux séparés pour chaque énantiomère).

Ce cas est très rare !!!

 **Résolution par cristallisation spontanée**

Cristallisation spontanée d'un énantiomère à partir d'un conglomérat :

cas de la synthèse de l' α -méthyl DOPA (antihypertenseur)



Ensemencement avec le bon énantiomère

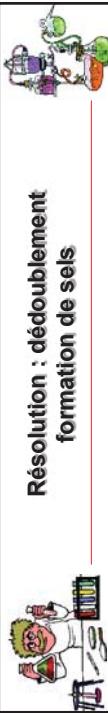


Résolution par cristallisation spontanée

C'est la méthode de l'entraînement, très utilisée dans l'industrie :

On provoque par entraînement la cristallisation sélective d'un énantiomère dans un mélange racémique grâce à l'ensemencement avec un germe énantiopur

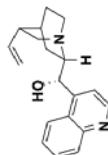
Cristallisation : opération pratique



Résolution : dédoublement formation de sels

Le dédoublement est la séparation des énantiomères par la formation d'intermédiaires diastéréoisomériques :

Pasteur en 1853 prépare des sels en combinant la cinchonine naturelle (énantiomériquement pure) et l'acide tartrique (*R,R*) et (*S,S*).



Modes d'obtention de molécules organiques optiquement actives

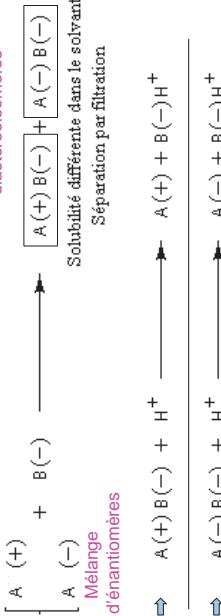
Principe de base

Pour la préparation de molécules chirales énantiomériquement pures, un outil chiral énantiomériquement pur est toujours nécessaire.



Résolution : dédoublement formation de sels

Mélange de diastéréoisomères
Solvabilité différente dans le solvant S
Séparation par filtration



Résolution : dédoublement chromatographie chirale

ex. de phase stationnaire (colonne) chirale : les cyclodextrines.

6 unités glucose

Auxiliaire

Résolution : dédoublement chromatographie chirale

Modèle pour explication avec une colonne simple

phase mobile

dépôt subst à séparer R + S

phase Stationnaire Chirale

Résolution : dédoublement formation de sels

Séparation des énantiomères par la formation d'intermédiaires de sels diastéréoisomériques (dédoublement) :

(R,R)-T-B(-) + (S,S)-T-B(-)

acidifier

(S,S)-T-B(-)

Séparation de 2 sels diastéréoisomères séparables → par cristallisation puis filtration

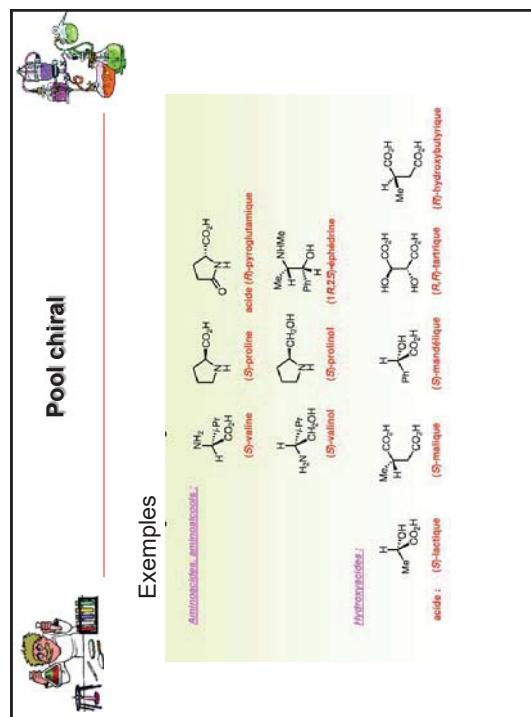
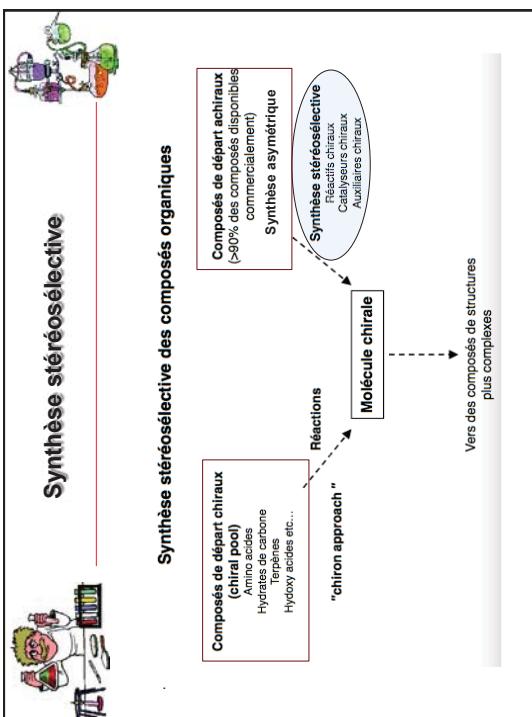
Auxiliaire

T = acide tartrique
B = auxiliaire de chirauté

Résolution : dédoublement chromatographie chirale

Séparation par la formation d'interactions diastéréoisométriques entre le produit et une phase stationnaire : séparation par chromatographie chirale.

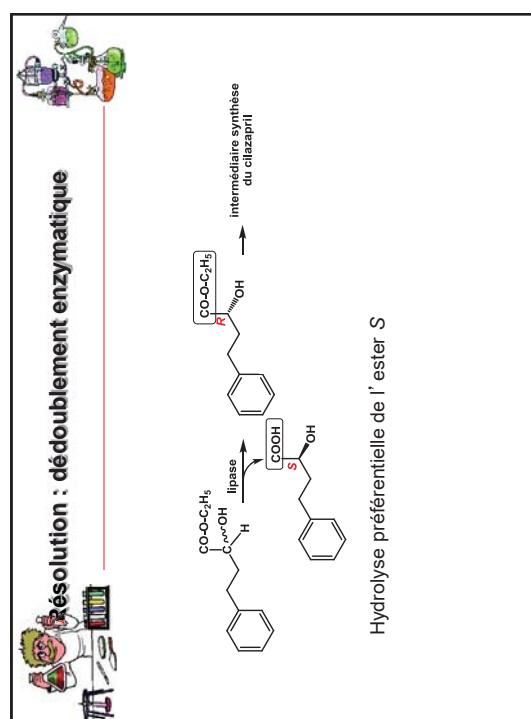
ex. de phase stationnaire (colonne) chirale : les cyclodextrines sont fréquemment utilisées. Ce sont des molécules cycliques qu'on peut considérer comme des oligomères du glucose. L' α -cyclodextrine comporte 6 unités de D-glucose, la β -cyclodextrine en comporte 7 et la γ -cyclodextrine 8. Il s'agit d'une structure chirale.



Résolution : dédoublement enzymatique

Les enzymes les plus utilisées sont :

- celles qui catalysent l’hydrolyse des esters et des amides (estérases, lipases, peptidases,...), enzymes d’obtention aisée, peu chères, pas besoin de cofacteurs (eau), acceptent une grande variété de substrats.
- celles qui favorisent l’oxydation des alcools en cétones ou en aldéhydes (déshydrogénases).





Synthèse asymétrique

L'auxiliaire chiral est volontairement introduit dans le substrat.

Cette façon de procéder offre beaucoup d'avantages par rapport aux méthodes précédentes.

Seul le catalyseur est nécessairement **chiral**. Il est utilisé en faible quantité et il peut être facilement séparé du milieu réactionnel par chromatographie. Il n'est pas « consommé » dans la réaction à la différence du réactif chiral.

Le catalyseur peut être biologique (enzyme ou microorganisme) ou chimique

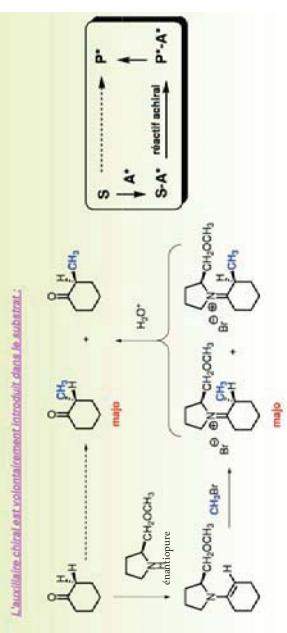


Fin
et

Merci de votre attention !!!



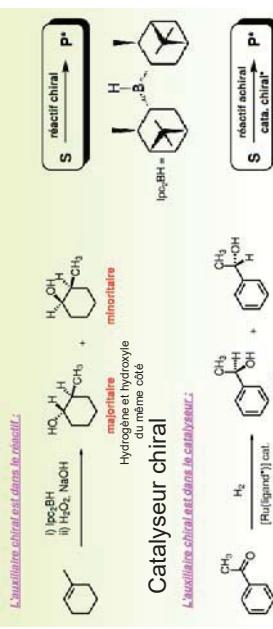
Par induction asymétrique



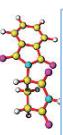
Introduction d'un auxiliaire de chirauté temporairement



Synthèse asymétrique



HISTORIQUE



Talimol®, Kevadon®, Contergan®, Distaval®, etc

R et S



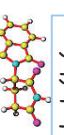
- 1957 : autorisation de mise sur le marché (AMM) (Chemie Grünenthal) indication comme sédatif. Une alternative aux barbituriques.

- Commercialisée sous la forme de racémate.

- Juste après : largement prescrit comme anti-nauséeux aux femmes enceintes.

- 1958 : une petite fille naît en Angleterre sans bras et sans jambes.

HISTORIQUE



- Nombre de naissances de bébés avec malformations (phocomélie) augmente.

- 1961 : Pédiatre de Hambourg met en accusation le thalidomide.

- Thalidomide et effet tératogène

R et S



- 1961 : retrait du médicament d'abord en Allemagne et puis dans d'autres pays. Pas commercialisé aux EUA.

- De 10 000 à 20 000 naissances de bébés avec malformations.

De la découverte du thalidomide à la compréhension de l'importance de la chiralité sur l'activité et la toxicité d'un médicament.

PACES - « UE8 Démarche recherche »

Enseignante : Pr. Vanja BERNARDES-GENISSON



INTRODUCTION

Le thalidomide

phthalimide

Acide glutarique

glutarimide

isoindol

Acide phthalique

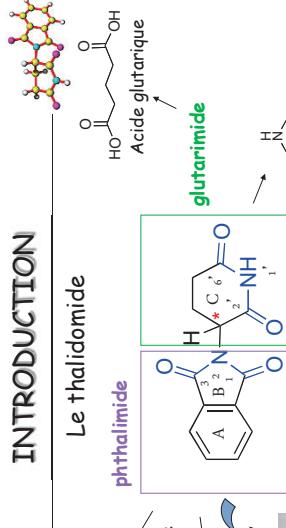
1 noyau benzène

2 fonctions imides

1 carbone asymétrique

pipéridine

N-[phthalimido]glutarimide ou 2-(2',6'-dioxo-3'-piperidin-yl)isoindoline-1,3-dione

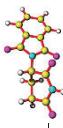



TERATOGENÈSE

La **teratogénèse** est la formation et le développement dans l'utérus d'anomalies du fœtus aboutissant à des malformations.



CONSEQUENCES



- d'autre part, ce désastre a fourni l'occasion de soulever de multiples questions : **interruption volontaire de grossesse, responsabilité médicale et pharmaceutique, indemnisation** en matière d'accident thérapeutique, entre autres.

CONSEQUENCES



Avec ce drame, il a apparut clair qu'il était urgent de :
 - réformer le **parcours du médicament** du laboratoire au consommateur.

- pas seulement de savoir si un médicament est dépourvu de toxicité pour l'organisme, mais aussi de déceler des éventuelles **actions nocives sur le fœtus**.
- développer la **pharmacovigilance**.

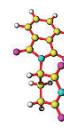
D'OU VIENT CETTE TOXICITÉ ??

ENANTIOMÈRES



- Qualitativement et quantitativement la même activité.
- Qualitativement le même type d'activité mais d'intensités différentes.
- Des activités biologiques différentes.
- Un des deux énantiomères est actif (eutomère) tandis que l'autre est inactif (distomère)
- Un des deux énantiomères est l'eutomère tandis que l'autre est toxique.

QUESTION



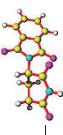
LES ACTIVITÉS PHARMACOLOGIQUES/ TOXICOLOGIQUES DU THALIDOMIDE SONT - ELLES ASSOCIÉES

DE FAÇON SPÉCIFIQUE À CHAQUE ÉNANTIOMÈRE

OU

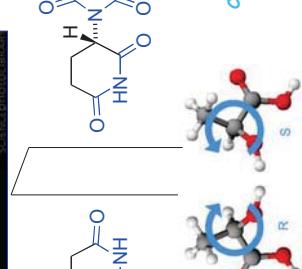
DE FAÇON INDIFFÉRENCIÉE AUX 2 ÉNANTIOMÈRES ?

MOLECULE CHIRALE



Paire d'énantiomères

= 2 molécules images l'une de l'autre dans un miroir et non superposables



ENANTIOMÈRES



Propriétés **chimiques** et physiques identiques à l'exception du pouvoir rotatoire

Propriétés biologiques :

Milieu biologique = environnement chiral

Les énantiomères doivent être considérés comme composés chimiques différents car leurs **propriétés pharmacodynamiques** et **pharmacocinétiques** peuvent être significativement différentes.

QUESTION



Etudier l' action de l'énanthiomère R et S indépendamment.

COMMENT LES SEPARER ?



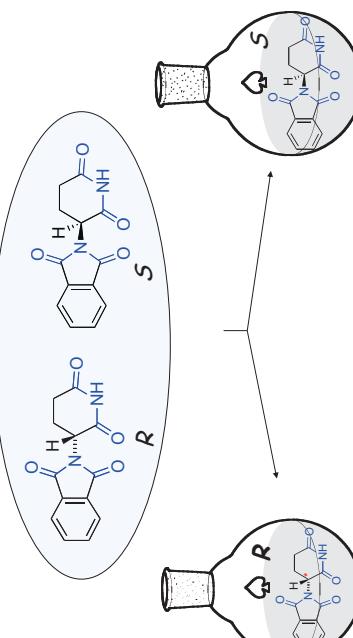
Techniques de séparation :

-Séparation par Chromatographie Liquide de Haute Performance (CLHP) chirale et préparative

En anglais : High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

STRATEGIE

Etudier les énanthiomères séparément !!

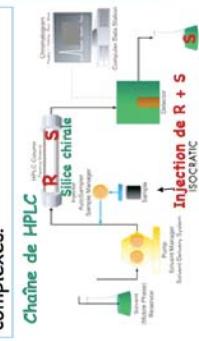


COMMENT LES SEPARER ?

CLHP-CHIRALE ou HPLC-CHIRALE

Qui est ce que c'est

C'est une technique analytique qui est largement utilisée pour la séparation de constituants chimiques dans des mélanges complexes.



Principe :

Basé sur la différence d'interaction de différents composés (R et S) d'un échantillon avec la phase stationnaire (chirale) et la phase mobile (éluant). La séparation est fonction des vitesses auxquelles les composés sont entraînés à travers la phase stationnaire par la phase mobile liquide.

ÉTUDES BIOLOGIQUES 	ENANTIOMÈRE S INHIBE L'ANGIOGENÈSE → TERATOGENE Danger !!!! Dose prise entre la 4ème et 6ème semaine de grossesse	 QUESTION
-------------------------------	---	---------------------

COMMENT LES SEPARER ? CHP-CHIRALE ou HPLC-CHIRALE 	Principe : <p>Basé sur la différence d'interaction de différents composés (<i>R</i> et <i>S</i>) d'un échantillon avec la phase stationnaire (chirale) et la phase mobile (éluant). La séparation est fonction des vitesses auxquelles les composés sont entraînés à travers la phase stationnaire par la phase mobile liquide.</p> <p>Chaîne de HPLC</p>
--	--

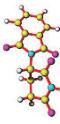
ÉTUDES BIOLOGIQUES 	<i>Une fois les énantiomères séparés ...</i> <i>évaluation biologique de chacun</i>	ENANTIOMÈRE R SEDATIF/ANTINAUVEUX
-------------------------------	--	--

La sédation et le sommeil corrèle bien avec la concentration de l'énantiomère *R* dans le sang et non avec le *S*-thalidomide.



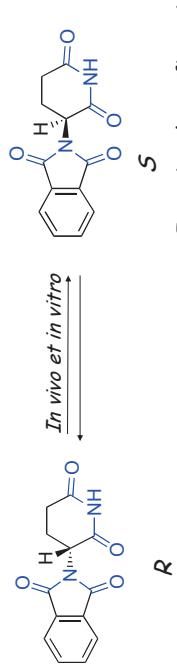
STRATÉGIE

Etudier la tératogénèse sur les énantiomères *R* et *S* et sur leurs métabolites

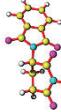
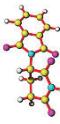
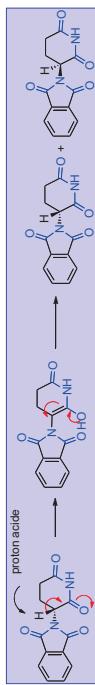


COMPRENDRE

Racémisation (interconversion des énantiomères)

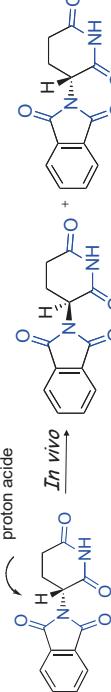


Inversion de configuration



RESULTATS

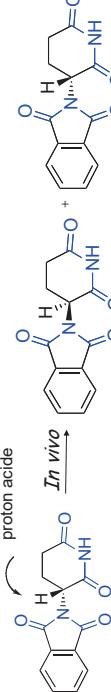
Essais indépendants des deux énantiomères dans un modèle animal approprié démontrent une équivalence tératogénique pour les 2 énantiomères.



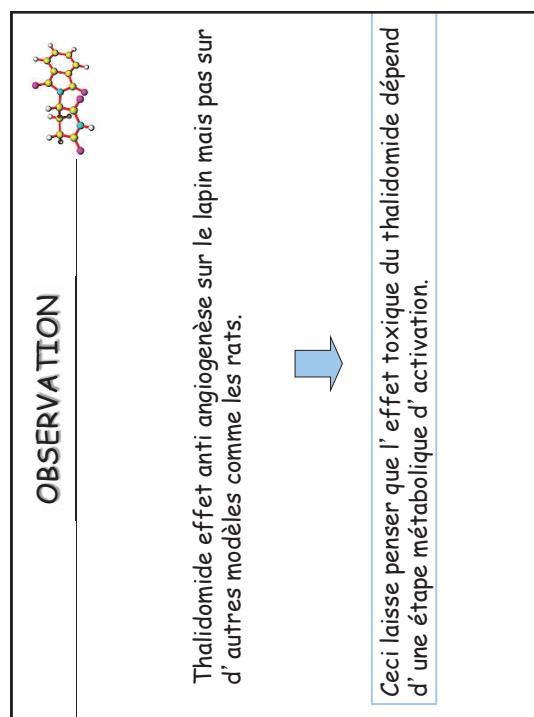
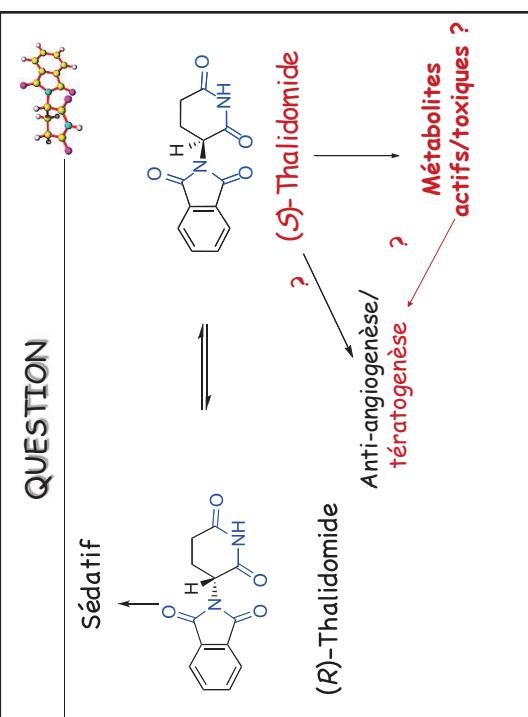
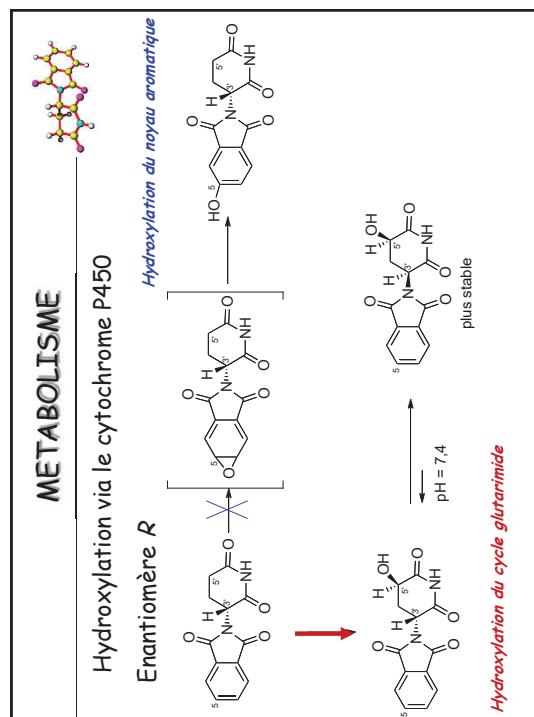
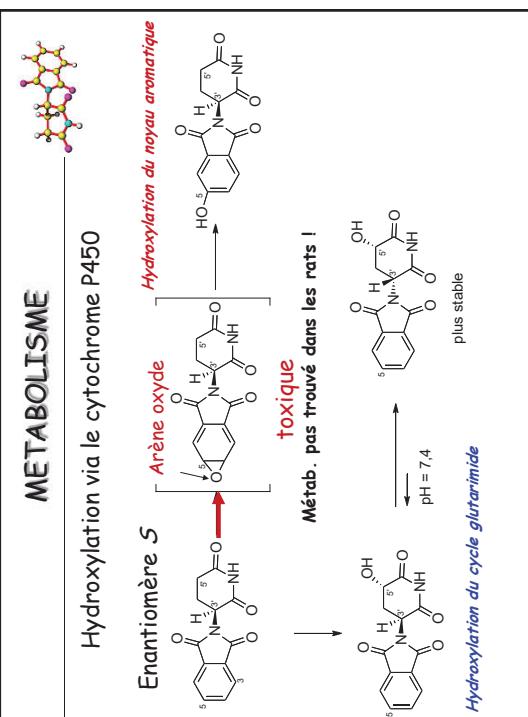
COMPRENDRE

- 1995 Eriksson et collaborateurs

Voie orale et intraveuseuse (*in vivo*)

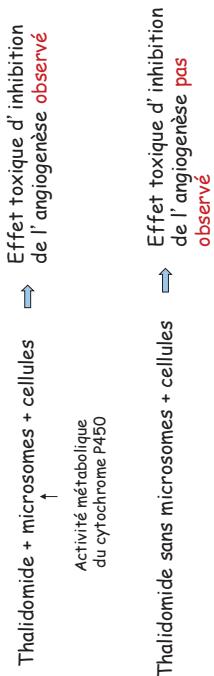


La commercialisation d'un seul énantiomère n'aurait pas évité la catastrophe du thalidomide



MÉTABOLISME

Expériences *in vitro* :



Le thalidomide lui-même n'a pas d'effet toxique.



QUESTION

COMMENT SE RENDRE COMPTE DE LA RACÉMISATION ?



DOSANT LES ENANTIOMÈRES

Déterminer la quantité de chaque énantiomère dans un mélange.

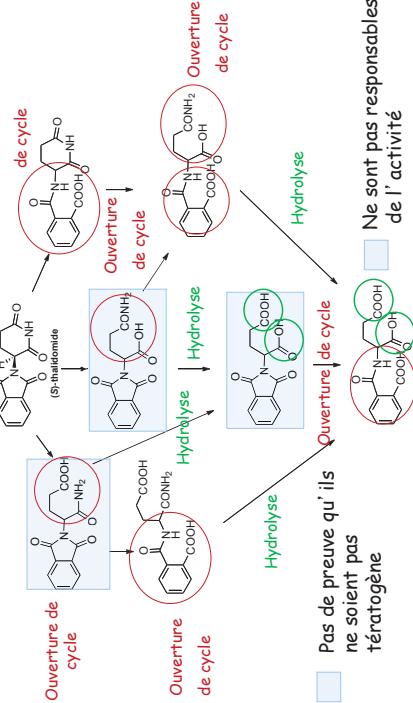
Techniques :

- Polarimétrie
- Chromatographie Liquide de Haute Performance Chirale



MÉTABOLISME

Hydrolyse : non dépendante du cytochrome P450



POLARIMETRIE

Définitions

Polarimétrie : est la science de la mesure de la polarisation de la lumière.

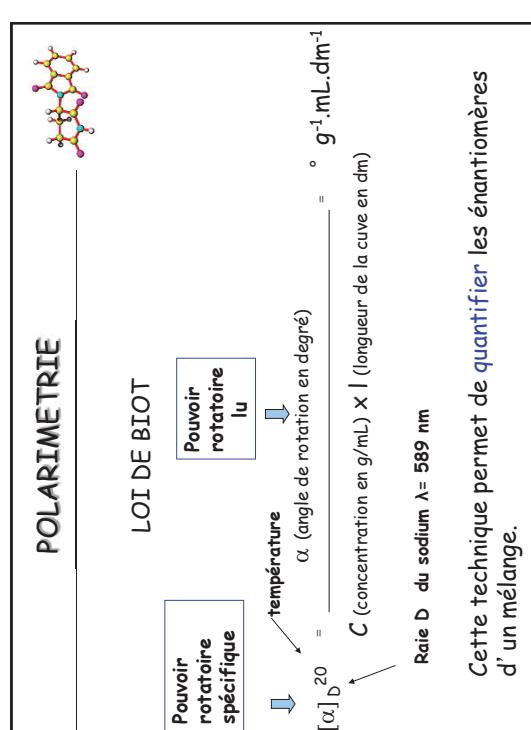
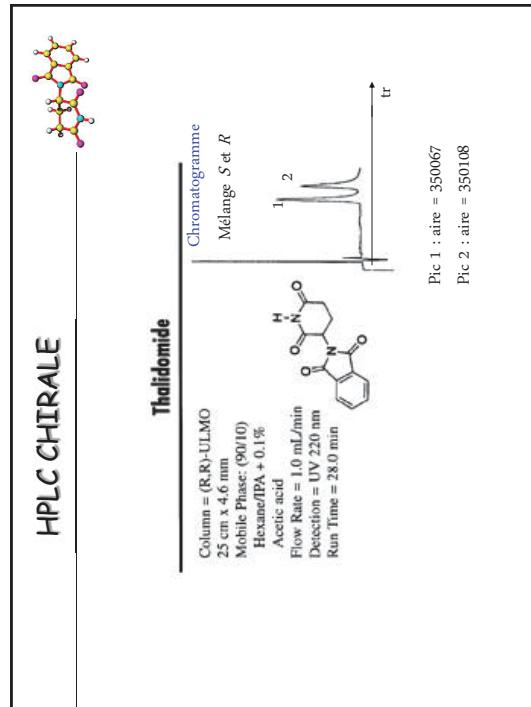
Pouvoir rotatoire (α) : un composé est optiquement actif lorsqu'il provoque une rotation angulaire, appelée pouvoir rotatoire, du plan de polarisation d'une lumière monochromatique préalablement polarisée par un polariseur.

Source de lumière	Lumière normale dans toutes les sens	Cellule contenant la molécule optiquement active	Analyseur	Observation de l'angle de déviation
-------------------	--------------------------------------	--	-----------	-------------------------------------

CLHP CHIRALE ou HPLC CHIRALE

Définition : C'est une technique analytique qui est largement utilisée pour la séparation et la quantification de constituants chimiques dans des mélanges complexes.

L'aire du pic est directement proportionnelle à la quantité du produit.





OBSTACLES

Le phénomène de la racémisation rend plus difficiles les études de l'attribution de l'activité pharmacologique aux énantiomères.

Une activité immunomodulatrice et anti-angiogénèse sont attribuées au *S*-thalidomide.



STRATEGIE

Bloquer l'inversion des énantiomères.

Comment ?

En réalisant des études sur un analogue synthétique non racémisable comme le méthyl-thalidomide ou fluor-thalidomide.



QUESTION

COMMENT S'ASSURER QUE LE RESPONSABLE DE L'ACTIVITÉ EST BIEN L'ENANTIOMÈRE *S* ET PAS LE *R* VU QU'ils SE RACÉMISENT ?



STRATEGIE

Bloquer l'inversion des énantiomères.

Comment ?

En réalisant des études sur un analogue synthétique non racémisable comme le méthyl-thalidomide.



Anti-angiogénèse et immunomodulatrice

LA PLACE ACTUELLE DU THALIDOMIDE



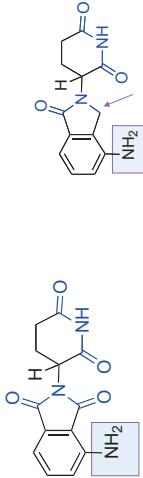
- Approuvé aux EUA (1998) pour le traitement de la douleur inflammatoire associée à la lèpre (érythème noueux lépreux) (inhibition TNF α).
 - En avril 2008, une autorisation de mise sur le marché européenne de la molécule a été accordée : elle est utilisée comme médicament orphelin dans le traitement de la lèpre et du lupus érythémateux disséminé (LED).
 - En phase d' étude pour être utilisé en tant qu' anticancéreux. La seule utilisation actuellement acceptée est contre le myélome multiple.

CONCLUSION



- ❑ Considérer les **2 énantiomères** comme 2 molécules à part entière.
 - ❑ Importance d'**évaluer** les risques de **tératogénèse** des nouvelles molécules sur **différentes espèces animales**.
 - ❑ Intégrer que les **métabolites** peuvent aussi être responsables d'une **toxicité**.
 - ❑ Effet accélérateur important dans la mise en place de normes beaucoup plus **strictes de sécurité sanitaire** pour la **mise sur le marché de médicaments**.

NOUVEAUX ANALOGUES



pomalidomide
lenalidomide

Activité anti-inflammatoire supérieur à celle du thalidomide. Ces molécules ne présentent pas d'effet sédatif. Cependant l'effet de tératogénicité est toujours présent.

CONCLUSION



- Le mécanisme de la tératogénèse n'est pas encore complètement élucidé.
 - La solution idéale serait bien évidemment la synthèse d'un analogue du thalidomide qui soit dépourvu de ces effets tératogénés !!

UE 8 Tronc commun

Grandes méthodes de découvertes

Conférences sur grandes découvertes biomédicales

- Étude des usages ancestraux, ethnopharmacologie
 - Amélioration de séries chimiques connues
 - Essais biologiques, criblage HTS*
 - Sérendipité
 - Approches rationnelles

avril 2020

Bruno DAVID

Institut de Recherche Pierre FABRE - Toulouse

2019-2020

1/40

*HTS = *High Throughput Screening* = criblage à haut débit

2/40

Grandes techniques utilisées lors de la découverte des taxoïdes antitumoraux

Essais biologiques

Chimie extractive

Extraction, chromatographie, fractionnement bioguidé
Analyse structurale
Spectrométrie de masse, de résonance magnétique nucléaire,
ultra-violet, infrarouge...

Chimie organique
Hémisynthèse (asymétrique)

Découverte propriétés anticancéreuses de l'If

Programme National aux USA:

Deuxième cause de décès aux USA dès les années 1960, le cancer est une grande cause nationale. La mission de recherche est confiée au National Cancer Institute (NCI).



Les deux objectifs 1960-1970 :

- 1- Conquête de la Lune (*We choose to go to the moon*)
- 2- Vaincre le cancer (*War on Cancer*)



3/40



Signature du National Cancer Act 1971

Richard NIXON

John Fitzgerald KENNEDY

4/40

Programme criblage NCI (1960-1986)

En 1960, le NCI demande aux botanistes du US Department of Agriculture 1 000 espèces de plantes par an.

Entre 1960 et 1986 :

35 000 plantes évaluées → 108 500 extraits

4 150 extraits actifs → 2 000 molécules pures

→ 11 composés anticancéreux

Activité cytotoxique : *in vitro*

Activité antitumorale : *in vivo*

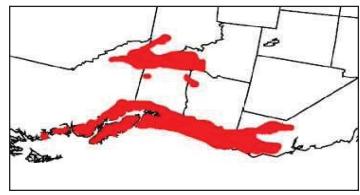
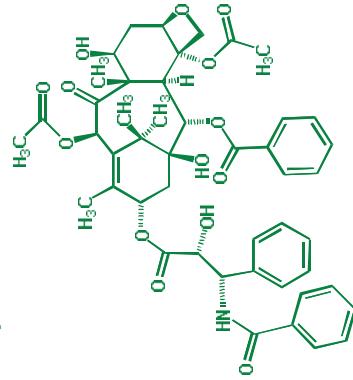
Activité anticancéreuse : patient

Plus de 50% des anticancéreux sont d'origine végétale !

5/40



Écorces de tronc de *Taxus brevifolia* Nutt.



Principe actif : paclitaxel
tenue très faible 0,001%
du poids sec d'écorce
→ Non breveté à l'époque

6/40

La plante, aspects botaniques

Taxus baccata L.



Pied ♂ (fleurs) Pied ♀ (fruits avec l'arille rouge)

Dioïque (du grec *di oikos* = deux maisons)



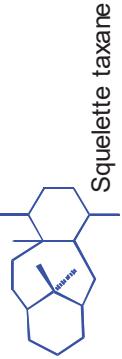
lf = Plante toxique

- Toxicité mentionnée dès l'antiquité
(J. César, Dioscoride)
- Poisons de flèches
- Bois apprécié pour arcs

« Canivela, rex dimidiatus partis Eburorum,... taxo, cuius magna in Gallia Germanique copia est, se examinavit. »
Julii Caesaris Commentarii de Belllo Gallico.
Jules César 52 av J-C, Liber VI, XXXI

« L'if est si dangereux à Narbonne, que quiconque dormira, ou même prendra le frais à son ombre, s'en trouvera très mal, et le plus souvent en danger de mort. »
Ilippius Ierpus (De Materia Medica)
Pedanius Dioscorides 70 après J-C, Livre IV

Produits toxiques = alcaloïdes
"la taxine" isolés en 1856
1956 = Mé lange d'alcaloïdes
1986 = Premières structures



Squelette taxane



Taxoïdes antitumoraux, très longue histoire

Problèmes écologiques



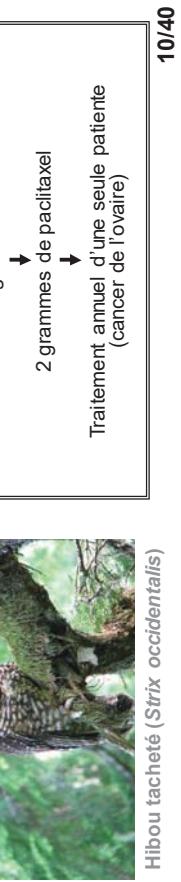
- Écorce : matériel **non renouvelable** car écorçage = mort de l'arbre
- peu abondante, **très fine** (3 mm)
- **Croissance des Ifs très lente**
- Récolte d'arbres centenaires
- Récoltes dans Parcs Naturels
- Habitat spécifique du Hibou tacheté



1992 : autorisation de mise sur le marché (AMM) du paclitaxel



Première récolte pour le NCI 21 août **1962**

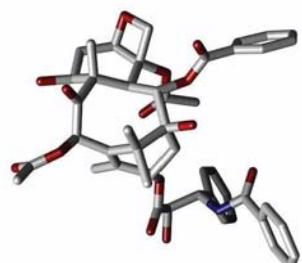


Hibou tacheté (*Strix occidentalis*)

Problèmes chimiques

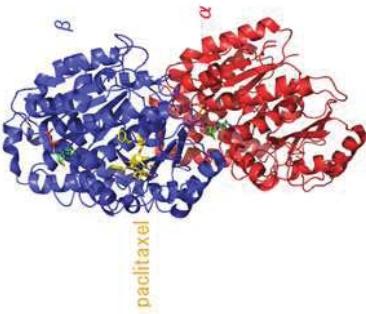
Très faible teneur
3 arbres centenaires
→ 10 kg écorces
→ 1 g paclitaxel

Purification difficile
Structure très complexe



Problèmes pharmacologiques & galéniques

- Mécanisme d'action du paclitaxel longtemps inconnu
- S. HORWITZ découvre le mécanisme d'action en 1979
- Nouveauté car **stabilise les microtubules**
- Produit **très peu hydrosoluble** donc difficilement administrable aux patients



La tubuline : cible des taxoïdes



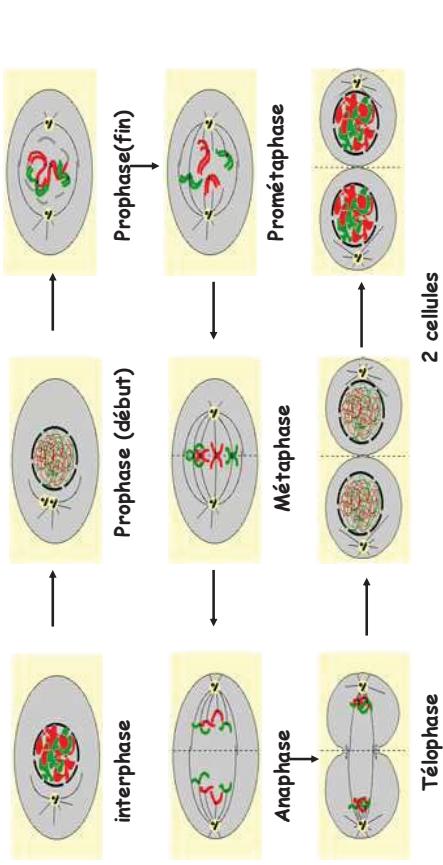
Mansukh WANI & Monroe WALL

1969 Isolation du paclitaxel

1971 Identification structurale

paclitaxel : poison du fuseau : poison mitotique

Sa cible est la tubuline
Constituant fuseau mitotique
Equilibre sous-unités \geq microtubules important pour rôle biologique
notamment division mitotique



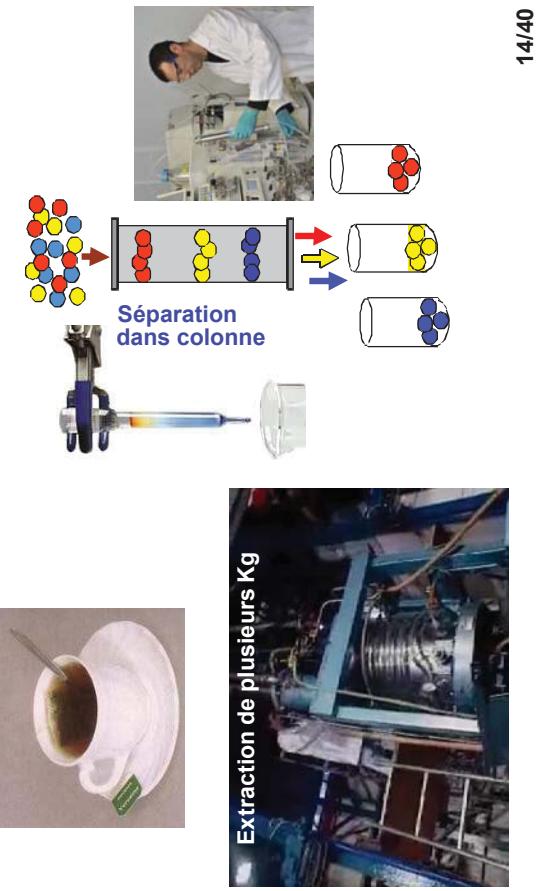
13/40

Chimie extractive

extraction...

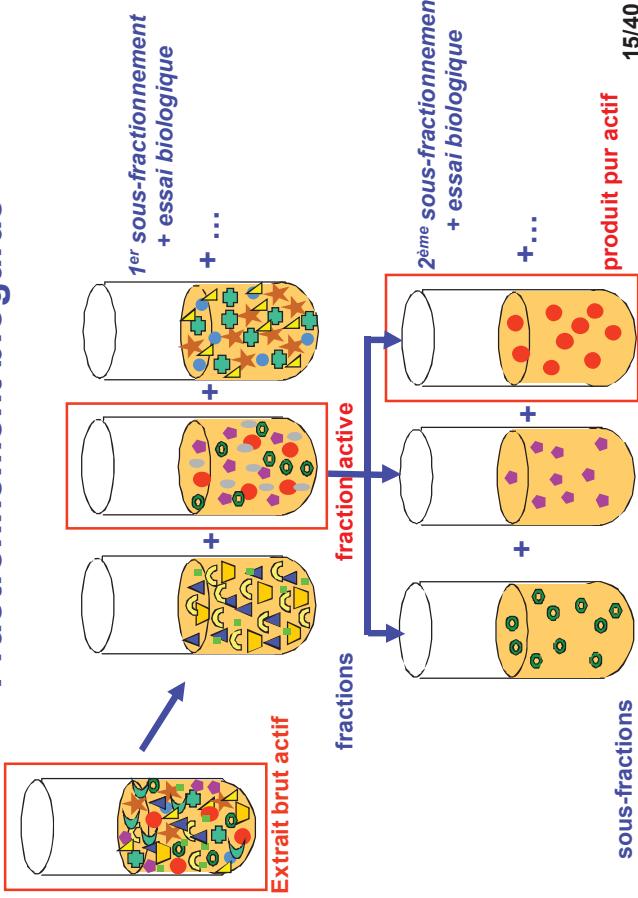


chromatographie...



14/40

Fractionnement bioguidé



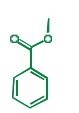
15/40

Elucidation structurale, les étapes

Masse moléculaire : 853,9061 u.m.a.

Formule brute (nombre insaturations + cycles) : $C_{47}H_{51}NO_{14}$

Fragments



Formule plane

Configuration relative

Configuration absolue

Conformations



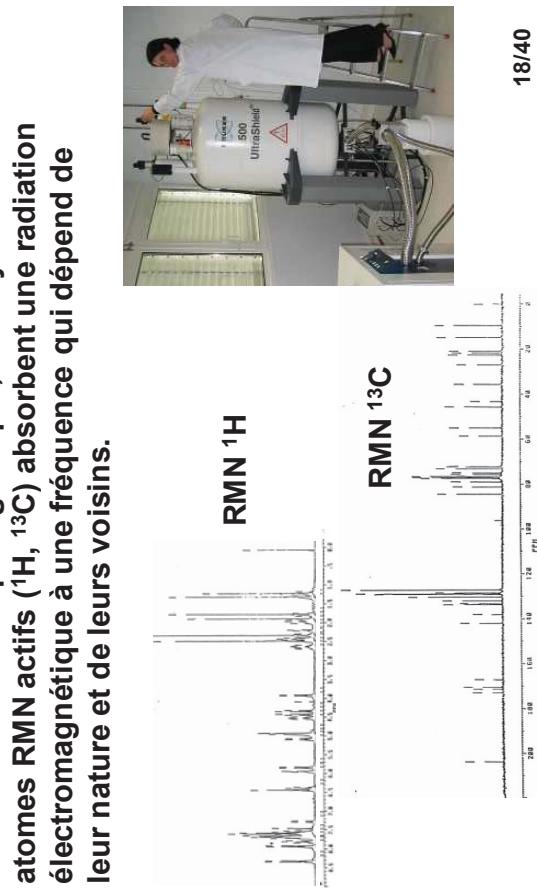
16/40

Spectrométrie de masse

Résonance Magnétique Nucléaire

Principe : molécule ionisée, fragments triés selon m/z (masse/charge)

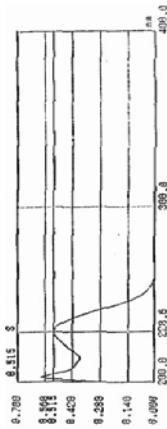
Placé dans un champ magnétique, les noyaux des atomes RMN actifs (^1H , ^{13}C) absorbent une radiation électromagnétique à une fréquence qui dépend de leur nature et de leurs voisins.



18/40

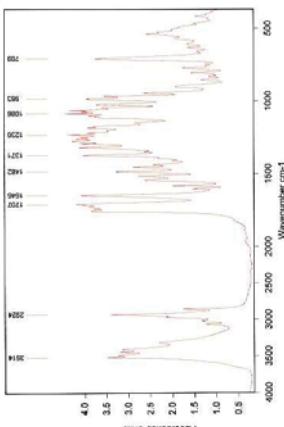
Spectrométrie UV

Absorption de radiations UV-visibles par molécule. Correspond à **peu d'informations structurales** surtout dosage



Spectrométrie IR

Absorption de radiations infrarouges par molécule entre (niveaux d'énergie de rotation) ou (niveaux d'énergie de vibration) → **informations sur groupements fonctionnels**

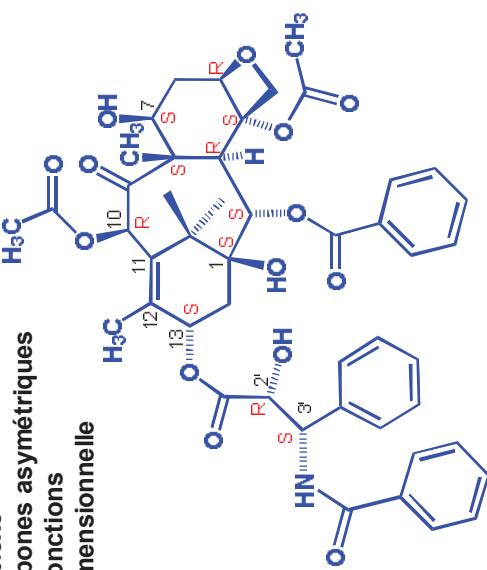


19/40

Le paclitaxel

Caractéristiques des substances naturelles

- Structure complexe
- Nombreux carbones asymétriques
- Nombreuses fonctions
- Structure tridimensionnelle

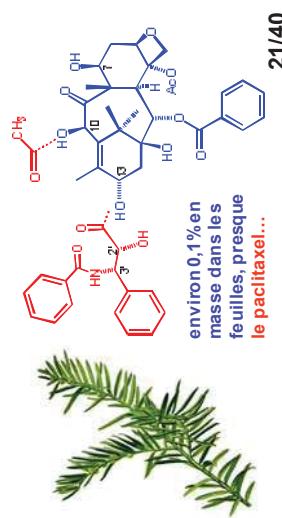


20/40

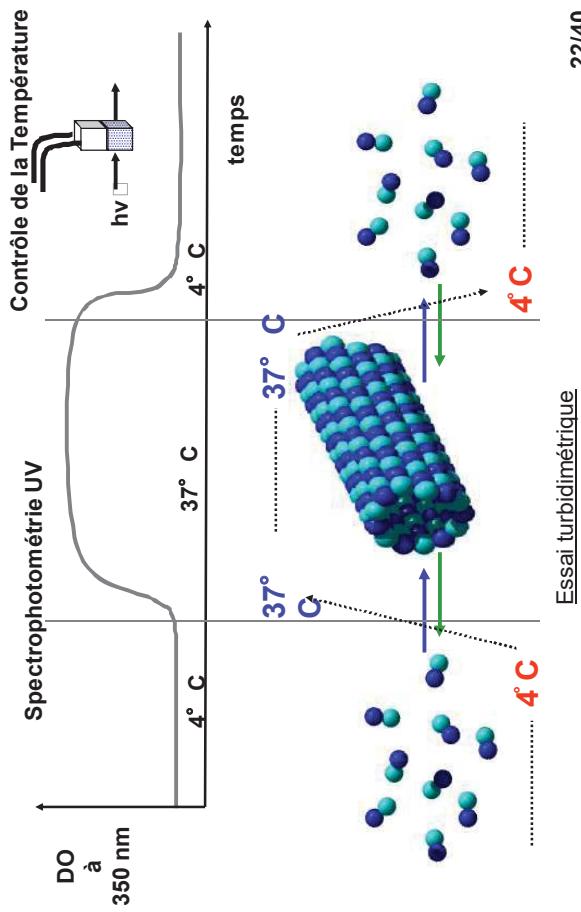
Travaux sur taxoïdes à Gif sur Yvette (CNRS)



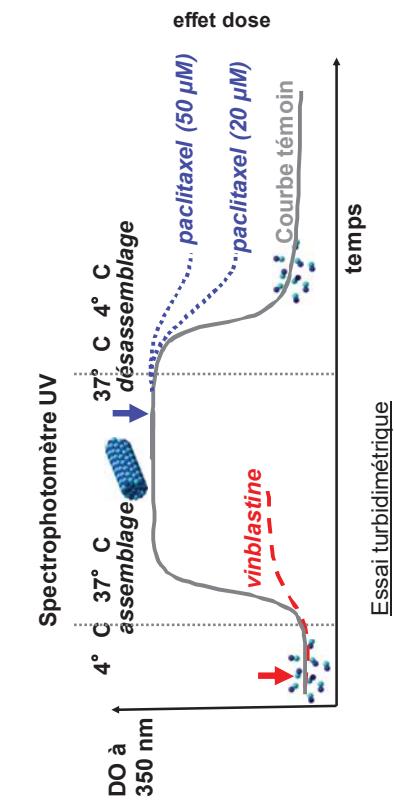
L'essai *in vitro* "tubuline" a permis de résoudre le problème de l'accès aux taxoïdes



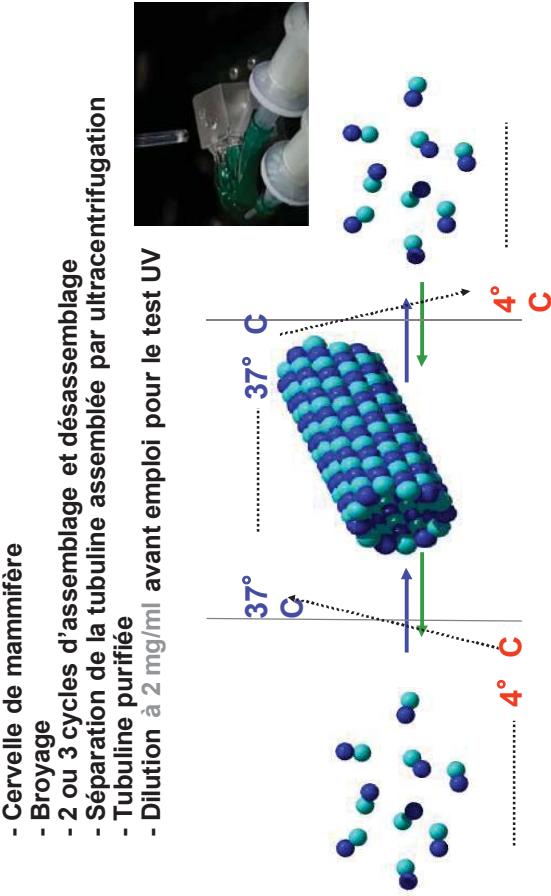
Assemblage - désassemblage de la tubuline



Principe du "test tubuline"



Purification de la tubuline



Repérage de la molécule active

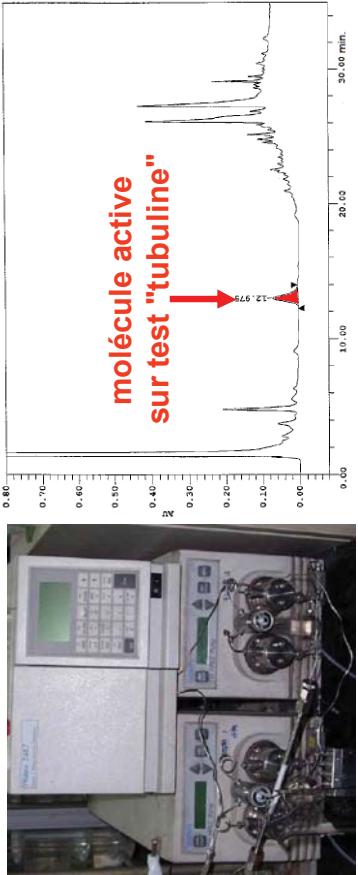


Fractionnement de l'extrait de feuilles d'If par chromatographie sur couche mince et repérage du produit actif.



Isolement de la molécule active pure

Analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)
d'un extrait brut de feuilles de *Taxus baccata*
Isolement avec même technique



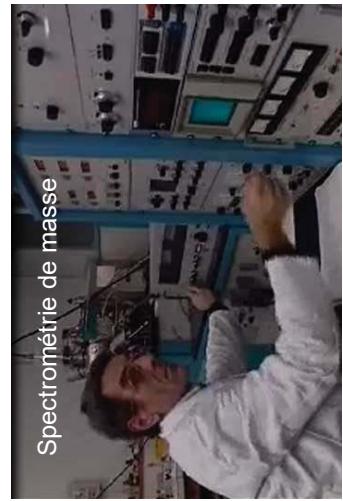
26/40

Analyse structurale du produit actif

Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire



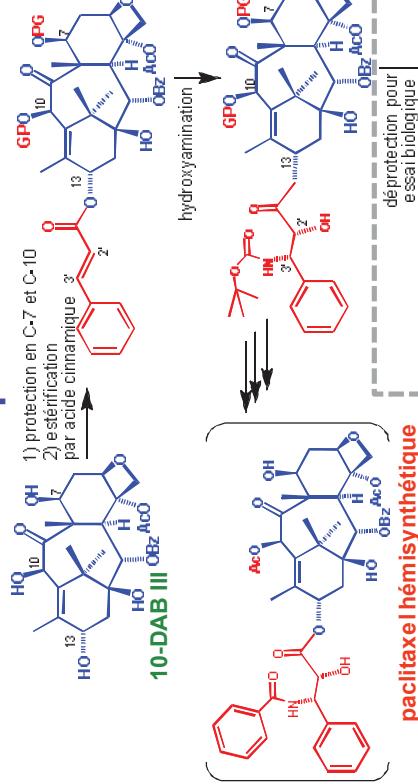
Spectrométrie de masse



Spectrométrie de masse

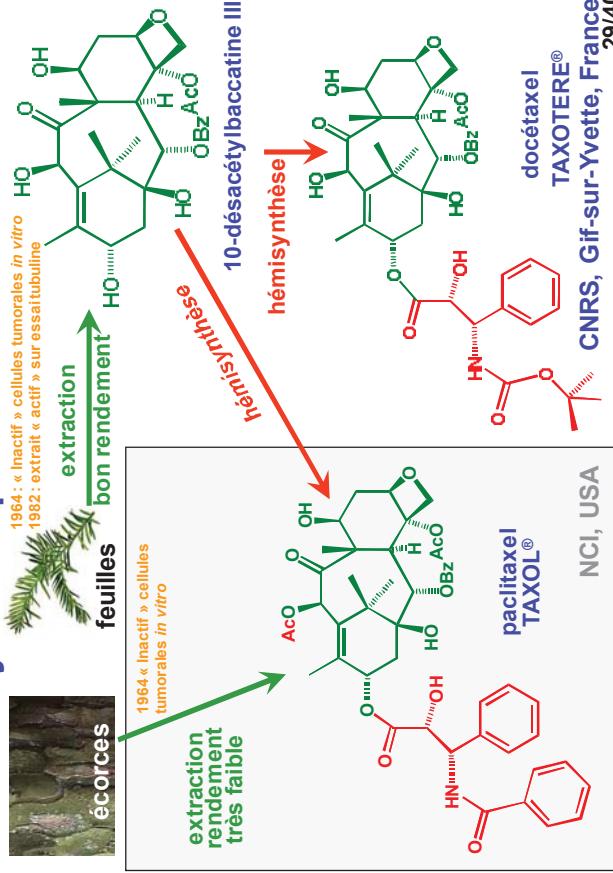


Découverte du docetaxel lors hémisynthèse du paclitaxel

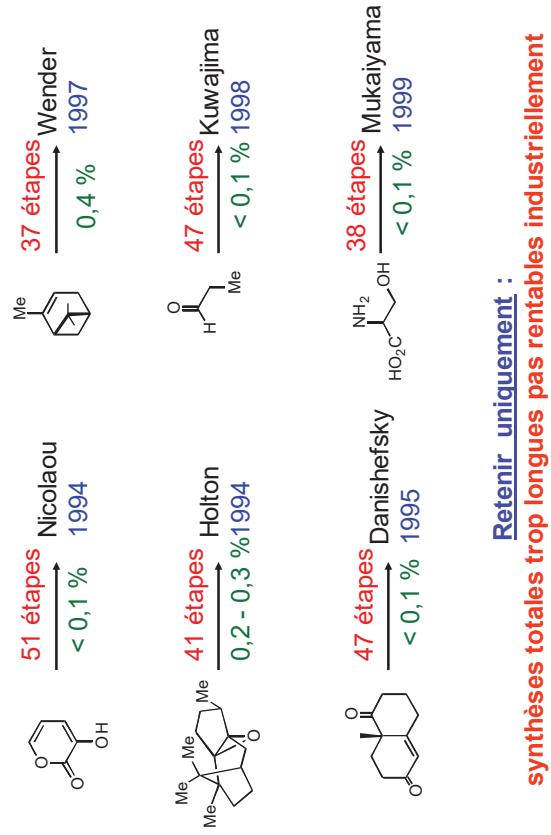


27/40

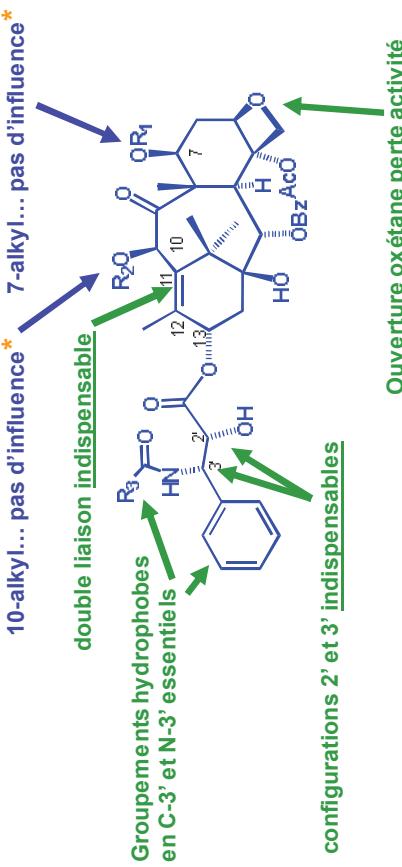
Hémisynthèse paclitaxel et docétaxel



Synthèses totales du paclitaxel



Relations structure activité sur tubuline



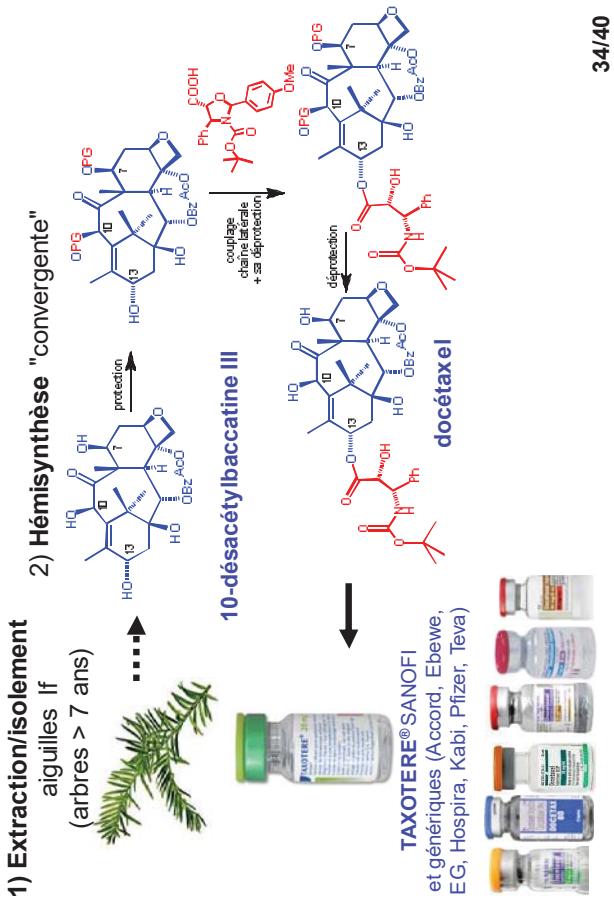
Historique développement des taxoïdes

- 1962 Récolte Packwood, WA (A. BARCLAY)
- 1964 Mise en évidence activité (NCI)
- 1969 Isolement du paclitaxel (WALL)
- 1971 Identification structurelle (WALL)
- 1979 Élucidation mode d'action (HORWITZ)
- 1983 Début développement paclitaxel (BMS/NCI, 1983)
- 1984 Hémisynthèse docétaxel (CNRS Gif)
- 1987 Début du développement (Rhône Poulenc)
- 1992 AMM paclitaxel (USA), 1995 France
- 1994 AMM docétaxel (France, Europe, USA...)

Grandes étapes production du paclitaxel



Production du docétaxel



33/40

34/40

Mécanisme d'action

Le paclitaxel et le docétaxel :

- se lient à la tubuline
- favorisent son assemblage en microtubules
- stabilisent les microtubules
- inhibent capacité de désassemblage
- Interrompent la mitose et la réplication cellulaire
- Sont essentiellement actifs en phase S du cycle
- Peuvent induire fragmentation de l'ADN donc sont des inducteurs d'apoptose

Induisent résistance "multidrug" (MDR) avec anthracyclines, vinca-alcaloïdes, épipodophyllotoxines

Indications thérapeutiques

Le paclitaxel est très peu soluble dans l'eau < 0,01 mg/mL
Le docétaxel un peu + hydrosoluble que paclitaxel



Paclitaxel
Cancer de l'ovaire
Cancer du sein
Cancer du poumon non à petites cellules
+ endoprothèse coronaire (stent) enrobée de paclitaxel

Taxus Element® (BOSTON SCIENTIFIC)

Docétaxel
Cancer du sein
Cancer du poumon non à petites cellules
Cancer de la prostate
Cancer gastrique
Cancer des voies aéro-digestives supérieures

Nouveaux produits en développement

Problèmes

Formulation injectables	Solutions
	- Nouvelles formes galéniques - Administration per os
Faible solubilité dans eau	- Prodrogues hydrosolubles - Taxoïdes solubles dans l'eau
Résistance multidroge	- Taxoïdes avec moins de résistances croisées ou non reconnus par la protéine MDR que paclitaxel et docetaxel



37/40

Nouvelles formules galéniques

Objectif : contourner le problème de la mauvaise hydrosolubilité



Nanoparticules (130 nm)

Paclitaxel dans solution d'albumine **Abiraxane®** (CELEGENE)
Sein: AMM en janvier 2005 (USA), janvier 2008 (Europe),
Poumon non à petites cellules (NSCLC) : octobre 2012 (USA)
Pancreas : septembre 2013 (USA)

Liposomes

Paclitaxel encapsulé dans des liposomes **EndoTAG®-1** (MEDIGENE)
Sein, pancréas, foie, tête et cou : Phase III

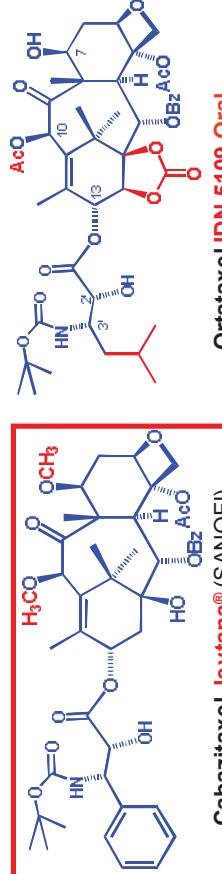
Microsphères

Paclitaxel encapsulé dans des microsphères **Paclimer®**
Injection intra-tumorale Ovaire : Phase I

Micelles (25 nm)

Paclitaxel micellaire polymérique
Cynviloq® (NantWorks) Sein Phase III, attente AMM aux USA
Genexol® (Samyang) AMM 2013 Corée du Sud : sein, ovaire et poumon

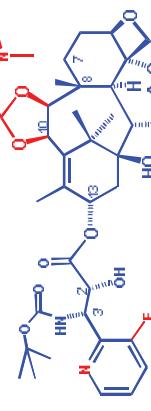
Taxoïdes non MDR + administration voie orale



Cabazitaxel Jevtana® (SANOFIG)
IV + prednisolone
AMM (prostate) : juin 2010 (USA)
janvier 2011 (Eur)
Ovaire, poumon, gastrique... Phase II,



Orataxel IDN 5109 Oral
(SPECTRUM PHARMACEUTICALS)
Phase II sur tumeurs solides

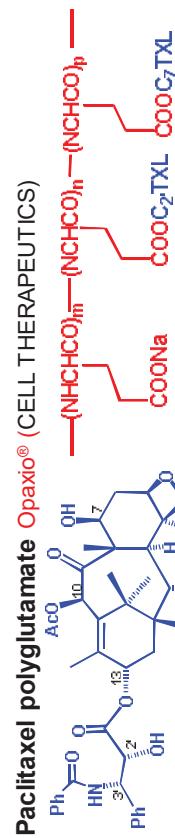


Tesetaxel DJ-927 Oral
(DAIICHI SANKYO, ODONATE THER.)

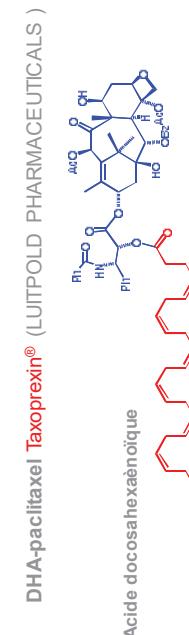
Phase II sur poumon, sein, cancers gastriques...
Très grande hydrosolubilité et longue 1/2 vie 40/40

Les pro-drogues

Objectif : contourner le problème des résistances MDR



Opaxio™
paclitaxel polyglutamate
Macromolécule non substrat des pompes à efflux MDR
Ovaire et Poumon : Pursuite Phase III
Orphan Drug 2012 : glioblastome multiforme



S'accumulait préférentiellement dans les tissus tumoraux
Arrêt et abandon de toutes les Phases III (Poumon, sein, foie...) en mai 2017