



RONÉOS DFGSP2 2020 - 2021

UE PL2.18 : BMOL 11-12

Date : 03/11/2020

Plage horaire : 10h30 - 12h30

Enseignant : DUFOURCQ Pascale

N°ISBN :978-2-37366-088-3

Ronéistes

JAURETCHE Maia - maia.jauretcche@gmail.com

REMER Charline - enaxeny@gmail.com

Production de protéines recombinantes à usage pharmaceutique : Les biomédicaments

Plan du cours :

I. Production de protéines recombinantes à usage pharmaceutique : les biomédicaments

II – Génie génétique et culture de cellules ou micro-organismes

A- La boîte à outils

B- Production de protéines recombinantes « biomédicaments »

1. Système procaryote: ex Insuline, hormone de croissance

2. Système eucaryote

III. Animaux transgéniques

A. Méthodes de transgénèse animale

1. Micro-injection de gène dans le pronucléus

2. Transfert de cellules embryonnaires souches (E.S)

3. Transfert nucléaire : clonage de Dolly

4. Lois de bioéthiques

B. Application biomédicales

1. Production de ces protéines recombinantes “biomédicaments”

2. Utilisation des animaux transgéniques en recherche biomédicale

IV. Conclusion

2- Système eucaryote

Nous avons vu qu'il y a 2 types de cellules eucaryotes :

- eucaryotes inférieurs : levure, *saccharomyces* la plus utilisée ou *pichia pastoris*.
- eucaryotes supérieurs : cellules de mammifères.

Les anticorps monoclonaux peuvent être produits et utilisés pour ces techniques. Ce sont des protéines énormes qui sont constituées de 4 chaînes, 2 lourdes et 2 légères. Un des exemples est notamment l'utilisation de ces anticorps monoclonaux pour bloquer la progression de certaines tumeurs (anticorps-VEGF).

Un autre exemple : EPO et glycosylation

Il s'agit de la production d'hormones grâce à des cellules de mammifères et même grâce à des cellules humaines.

L'érythropoïétine (34 000 Da) est une hormone **glycoprotéique** qui va stimuler l'érythropoïèse (= production et différenciation de globules rouges). Cette hormone est synthétisée par le **rein**, elle aura une action au niveau de la moelle osseuse où elle active la production de globules rouges.

Elle est administrée à des patients présentant des anémies (manque de GR) notamment chez les personnes ayant une insuffisance rénale.

→ *Pourquoi cette hormone doit être absolument produite dans un système eucaryote ?*

Ce qu'il faut noter est que cette hormone présente **3 glycosylations** qui sont très importantes pour son activité. Voilà pourquoi il faut utiliser des cellules eucaryotes supérieures et même des cellules humaines.

A l'époque, on réalisait des transfusions aux patients en manque d'érythropoïétine, pour maintenir leur taux. Cependant la demi vie des globules rouges étant faible (environ 21 jours) les personnes devaient être transfusées régulièrement (à peu près tous les mois).

Désormais, nous sommes capables de synthétiser cette hormone par génie génétique dans des CHO. On injecte alors l'EPO aux patients, elle va venir stimuler la moelle osseuse et donc la production de GR. Sur le marché on peut voir différents types d'érythropoïétine. Leur demi-vie varie, cela est dû au fait que nous sommes capables de modifier certains acides aminés au niveau de leur séquence. Le fait d'augmenter la demi-vie du médicament va permettre aux patients d'avoir recours à moins d'injections, puisqu'elles seront plus espacées dans le temps.


Il est possible lors des contrôles anti-dopage de mettre en évidence si de l'érythropoïétine a été injectée aux sportifs, par des techniques de migration. La forme endogène de l'EPO présente 3 glycosylations, l'EPO synthétisée et administrée quant à elle présente au moins une glycosylation en plus.

Conclusion :

Il faut savoir quels sont les avantages et les inconvénients des différents systèmes d'expression, ainsi que les différents vecteurs utilisés.

Comparaison des différents systèmes d'expression des protéines recombinantes

Système d'expression	Vecteurs	Avantages	Inconvénients
Procaryote	Plasmide/ Virus	Bien connu, rendement important, petit génome, culture à grande échelle	Absence de modif post traductionnelle
Levure	Plasmide	modif post traductionnelle possible, petit génome, bon rendement	Glycosylation frustrée et différente des cellules mammifères
Mammifères			
CHO	Plasmide/ Virus	Maturation proche de la protéine naturelle	Culture difficile, croissance lente, faible rendement
Cellules Humaines	Plasmide/ Virus	Bonne maturation et profil de glycosylation identique à la protéine naturelle	Culture difficile, peu de recul en sécurité virale



Coût

Fonctionnalité

III. Animaux transgéniques

→ Deuxième méthode pour produire des protéines recombinantes, des médicaments.

Le but est de transmettre à une espèce donnée un caractère nouveau ou modifié, par transfert d'un gène ou groupe de gènes n'appartenant pas forcément au génome de l'hôte. L'**organisme transgénique** ou génétiquement modifié (appelé OGM) va alors utiliser ces informations génétiques transmises pour produire une protéine.

On peut lui faire fabriquer une protéine qu'il ne synthétise pas naturellement. On peut aussi augmenter l'expression d'une protéine endogène. Et enfin on peut aussi diminuer ou inhiber l'expression d'une protéine endogène (pas utilisé lors de la production de biomédicament, mais utile en recherche).

Application de la transgénèse (OGM) :

- On peut utiliser ces animaux ou ces plantes comme des bioréacteurs : il s'agit du **molecular pharming**.
- On peut aussi utiliser cette technique pour toutes les applications en recherche, notamment biomédicale, pour définir de nouvelles cibles thérapeutiques, ou encore créer des modèles pathologiques humains.
- Enfin on peut améliorer ou modifier les espèces (plante ou animal), cela n'a évidemment pas de rapport avec la santé humaine.

La transgénèse se déroule en 3 étapes :

- 1- Isoler le gène d'intérêt (même principe que pour le clonage).
- 2- Construire le vecteur (même principe que celui vu pour les cellules eucaryotes).
3. Transférer le transgène dans l'organisme hôte, le but étant que le transgène soit transmis à la descendance et donc qu'il soit présent dans les cellules germinales.

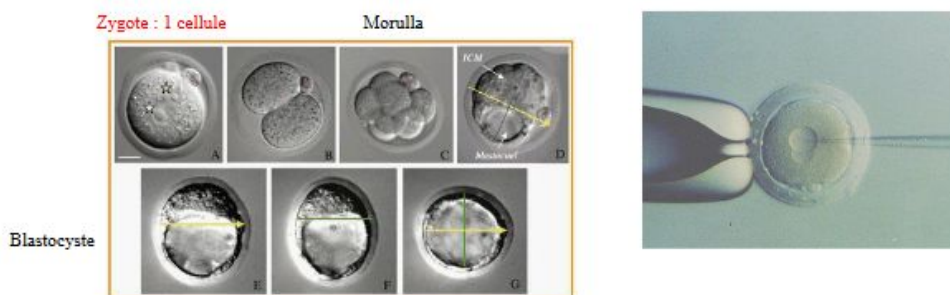
La transgénèse peut avoir lieu chez les plantes ou chez les animaux mais dans ce cours seule la partie sur les animaux nous intéresse.

A. Méthodes de transgénèse animale

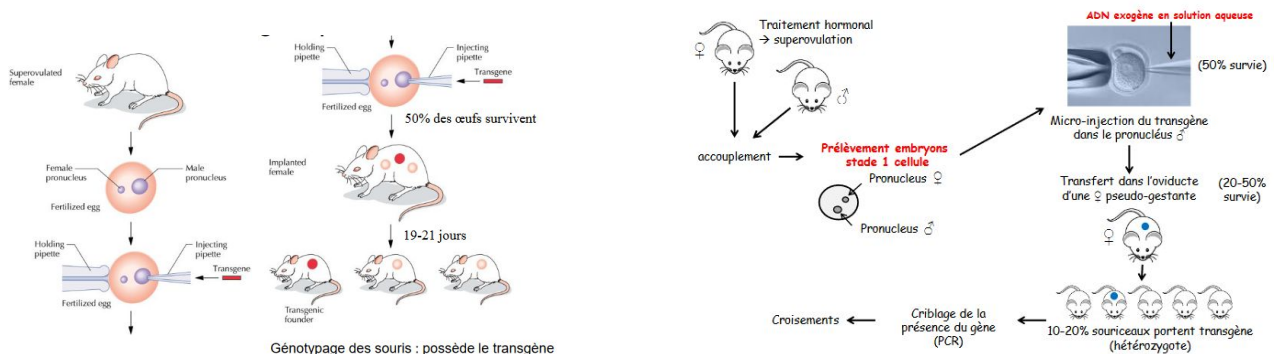
→ Il existe 3 méthodes pour insérer un transgène et donc modifier un génome animal.

1. Micro-injection de gène dans le pronucléus

On travaille à partir d'une cellule souche embryonnaire. Un zygote contient 1 cellule qui va se diviser et donner 2 cellules. Puis on a la morula et enfin le blastocyste qui se développe pour enfin donner un embryon. On micro-injecte le transgène dans le pronucléus mâle de la cellule (car plus gros que celui femelle) grâce à une micro-pipette contenant l'ADN à insérer. Tout se fait sous microscope.



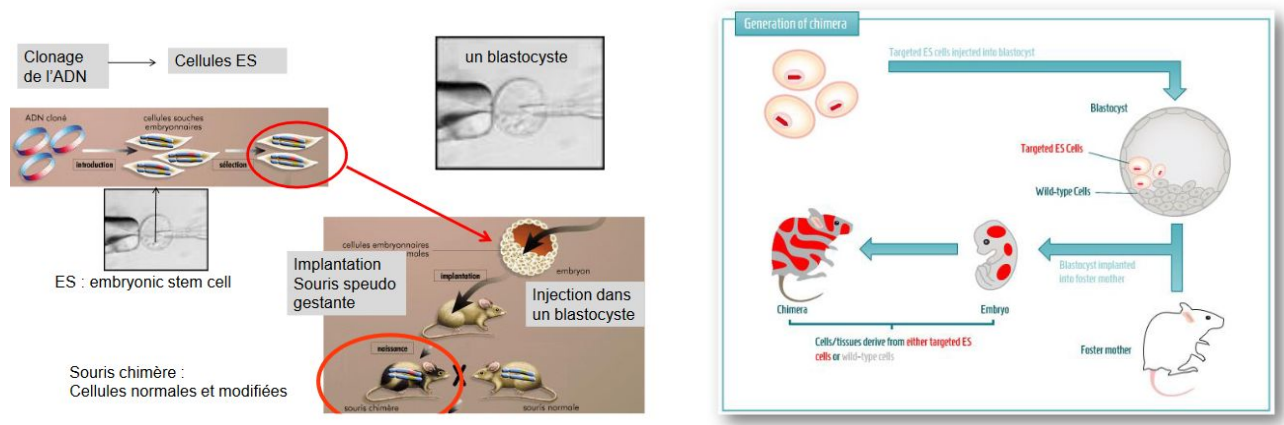
Ces micro-injections ont été tout d'abord utilisées pour faire des souris transgéniques. Un zygote va être utilisé pour faire de la transgénèse (in vitro). Une fois modifié le zygote va être implanté dans une deuxième souris (appelée souris pseudo-gestante). Au bout de 21 jours, cette femelle va donner naissance à des souriceaux qui auront soit un génotype normal, soit un génotype modifié. Seulement un faible pourcentage de souriceaux vont avoir leur génome modifié. Pour vérifier qu'on a un animal transgénique, on va cribler la présence du gène par des PCR notamment. Pour avoir ensuite une lignée de souris transgéniques on va réaliser des croisements.



2. Transfert de cellules embryonnaires souches (cellules E.S)

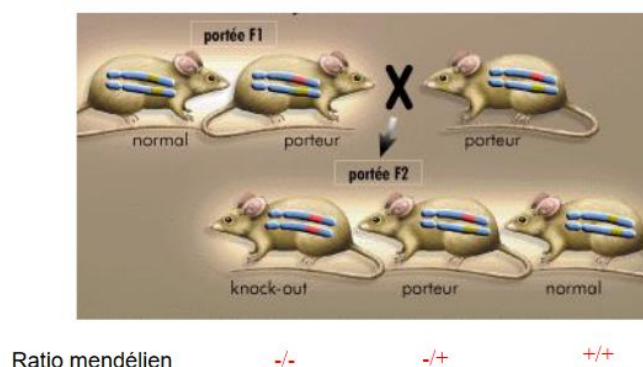
Ces cellules embryonnaires souches proviennent de la masse interne du blastocyste, ce sont des cellules **pluripotentes** (capables de donner tous les types cellulaires d'un organisme). Elles sont donc isolées et mises en culture.

Ce sont ces cellules que nous allons modifier génétiquement. On clone le gène qui nous intéresse dans un vecteur et on l'applique dans ces cellules E.S. On sélectionne alors spécifiquement les cellules présentant le transgène et on les implante dans un blastocyste. Ce dernier modifié sera ensuite injecté dans une souris pseudo-gestante. On obtient ainsi une **souris chimérique**, c'est à dire qui a à la fois des tissus qui ont le transgène et d'autres non. En effet le blastocyste contient un mélange de cellules souches normales et de cellules modifiées.



On accouple la souris chimérique avec une souris normale pour donner soit une souris transgénique, soit une souris normale. On va alors obtenir 3 types de souris, une normale, une hétérozygote et une homozygote pour le gène transformé. Celle qui nous intéresse est donc cette dernière.

→ Ainsi avec ces cellules ES on est capable d'obtenir des souris transgéniques qui possèdent le transgène qui nous intéresse.

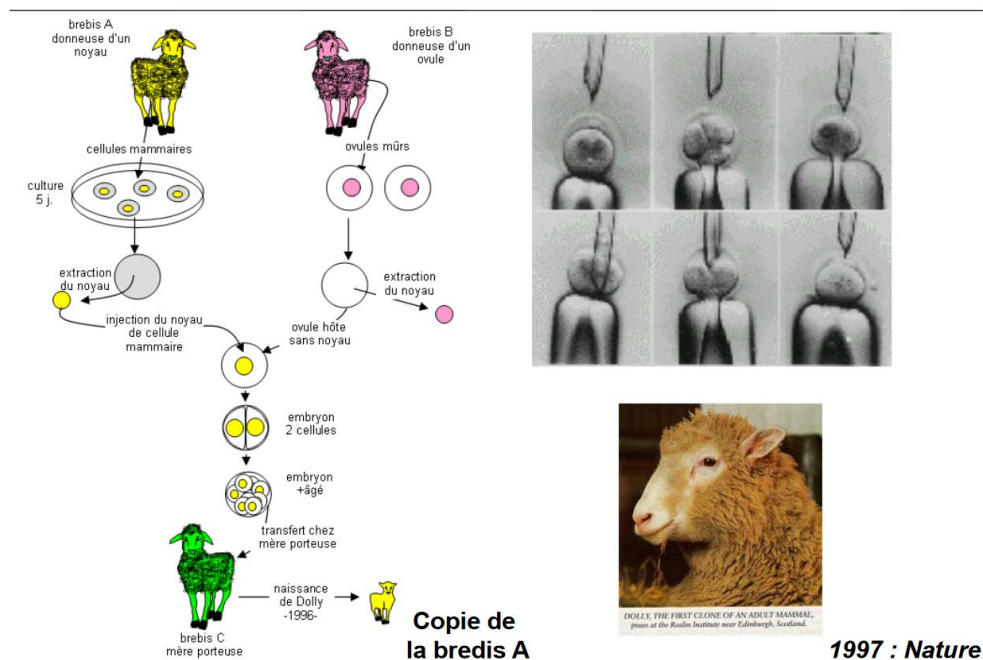


3. Transfert nucléaire (clonage de Dolly)

Il s'agit d'un transfert de noyau d'une cellule somatique adulte dans un ovocyte énucléé. Pour cela il nous faut : un donneur de noyau, un donneur d'ovule et une mère porteuse. Le premier animal cloné a été une **brebis (Dolly) en 1997**.

/! Le clonage sur l'Homme est interdit par les lois de bioéthique et techniquement impossible pour l'instant.

On prélève des cellules mammaires de la brebis A (jaune) dont on extrait le noyau. Ensuite on prend l'ovule de la brebis B (rose) et on enlève son noyau. Par transfert nucléaire, on injecte le noyau de la brebis A dans l'ovule de la brebis B.



L'embryon se développe in vitro. Une fois arrivé au stade de blastocyste, il est introduit dans une brebis C (vert), il s'agit d'une mère porteuse. Cette brebis C va accoucher d'une brebis qui aura 100% du génome de la brebis A, clone de la brebis A.

→ Une fois de plus cette technique se fait à l'aide de **micro-injections**.

4. Lois de Bioéthiques

Toutes ces techniques sont régies par des lois de bioéthiques.

Chez l'Homme la seule technique autorisée est la fécondation in vitro, toutes les autres sont interdites. En France chez l'Homme, il est interdit d'utiliser ces cellules souches embryonnaires à des fins de production, on a juste le droit de les utiliser pour la thérapie dans le cadre de certaines recherches.

Cependant chez la souris par exemple presque toutes les manipulations peuvent avoir lieu.

Il faut faire attention, on ne peut pas faire ces modifications de façon non contrôlée. Les lois de bioéthiques sont internationales et doivent être respectées. Ces lois évoluent évidemment et sont sujettes à énormément de discussions.

B. Animaux transgéniques : applications biomédicales

Il est possible via des animaux transgéniques de faire de la production de protéines recombinantes "biomédicaments", c'est ce qu'on appelle **molecular pharming**.

Avantages :

Système de cellules mammifères, donc nous avons la possibilité d'avoir des modifications post-traductionnelles qui sont proches de ce que l'on peut avoir chez l'Homme. On peut aussi utiliser le système de protéines recombinantes qui vont être solubles et donc vont se retrouver dans les fluides biologiques (ex: lait, urine, sérum). A partir de ces fluides la protéine va être facile à récupérer et à purifier.

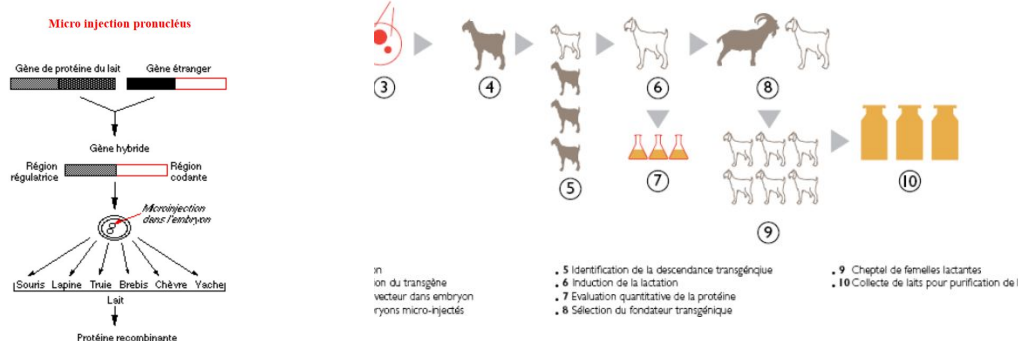
Inconvénients :

Le coût de la production est très élevé. On retrouve aussi des problèmes, contestations bioéthiques. Il peut y avoir des problèmes de sécurité virale avec des risques de contamination. De plus, le développement est long et difficile.

1. Production de ces protéines recombinantes "biomédicaments"

Exemple : Produire une protéine animale dans le lait animal (brebis, chèvre, souris, vache). Actuellement dans ce qui est commercialisé on a des médicaments qui présentent des protéines recombinantes utilisant ce type d'animaux transgéniques tels que des facteurs de coagulation, des alpha1-protéase-inhibiteur, des tPA (utilisés en urgence lors des infarctus).

Les animaux transgéniques vont être réalisés par des micro-injections dans le pronucléus. Pour faire exprimer une protéine qui ne l'est pas normalement dans le lait il faut un **promoteur de gène**. On peut faire un transgène avec un promoteur spécifique qui sera, par exemple, actif dans les glandes mammaires. La B-caséine ou la B-lactoglobuline sont des protéines, elles sont synthétisées par la glande mammaire. On prend le promoteur de la B-caséine, on le met devant le transgène que l'on veut faire exprimer. On micro-injecte tout ça dans le pronucléus de l'animal et la production de la protéine se retrouve exclusivement dans le lait. La protéine est facile à récupérer et à extraire à partir du lait, car composition simple.



Le gène étranger intégré se transmet à toutes les cellules de l'organisme et à ses descendants (animal transgénique).

Actuellement, différents types d'animaux sont utilisés pour cette technique. Le fluide dans lequel les protéines sont récupérées le plus souvent est le lait (très facile). Par exemple dans le lait de brebis on retrouve une trypsine qui va être utilisée contre des emphysèmes. Dans le lait de chèvre on retrouve des t-PA qui vont être utilisés contre les thromboses.
→ Il existe ainsi plusieurs types de protéines retrouvées dans les laits de différentes espèces pour traiter certaines maladies.

Exemple : ATryn est une protéine anticoagulante recombinante humaine (antithrombine III). Ce médicament, commercialisé en Europe en 2006, provient de 200 chèvres transgéniques.

Avantages	Inconvénients
Alternative de production	Sécurité virale
Modifications post-traductionnelles	Barrière d'espèce??
Capacité de production importante	Risque de contamination
-Récolte facile -Rendement intéressant	Développement difficile
	Opinion publique

Avantages : Alternative de production car modifications post-traductionnelles très proches de celles rencontrées chez l'Homme. Capacité de production importante, récolte facile et rendement intéressant (dans le lait notamment). Quantité produite : 1 à 14 g/L, 8000 L/an vache, 1000 chèvre, 300 brebis, 8 lapin. Purification facile.

Inconvénients : Sécurité virale, barrière de l'espèce, problème éthique (opinion publique), risque de contamination, et développement qui peut être difficile, long et coûteux.

2. Utilisation des animaux transgéniques en recherche biomédicale

Ces animaux transgéniques sont largement utilisés pour la recherche. Il existe différents types de modèles transgéniques, passant de la drosophile à la souris jusqu'au lapin. C'est intéressant car il y a 2 applications possibles de ces animaux transgéniques. On peut recréer des modèles pathologiques humains :

- Mutation de gène → reproduction d'une maladie génétique humaine.
- Surexpression ou inhibition d'expression pour étudier la physiopathologie ou reproduire un modèle de la pathologie → identification, validation de cibles thérapeutiques.

Exemple : Modèle de diabète

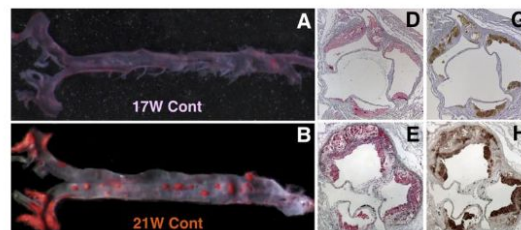
Modèle spontané de diabète de type II : si on modifie par exemple le gène de la leptine (produite dans le tissu adipeux) chez une souris, on remarque qu'elle développe un diabète de type II avec une obésité. On peut alors travailler sur cet animal transgénique en recherche, en testant des molécules ou alors en réalisant des tests pour identifier des nouvelles cibles thérapeutiques.

→ Nous avons la possibilité d'avoir différents types de souches de souris transgéniques qui vont développer les maladies que l'on souhaite.

Exemple : Modèle d'athérosclérose

Nous pouvons avoir des souris qui présentent des modèles d'athérosclérose. Si l'on enlève le gène de l'ApoE on remarque que la souris développe des plaques d'athéromes (lipidique) sur la paroi des artères qui normalement ne présentent pas ces plaques. Une fois de plus on peut réaliser des recherches sur ces animaux transgéniques.

ApoE-/-



Créer en 1992 (Piedrahita JA et al, Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89:4471-4475; Plump AS et al, Cell 1992;71:343-353)

L'aorte A correspond à une aorte contrôle et la B à une aorte délétée donc transgénique. Tous les points rouges sont des plaques de gras qui se sont développées dans l'aorte.

→ Ces différents animaux transgéniques vont donc pouvoir être utilisés en **physiopathologie** mais aussi pour essayer de mieux comprendre le rôle de certains gènes et de certaines protéines dans le développement de certaines pathologies ainsi que de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

Autres applications : Amélioration des animaux d'élevage ou plantes.

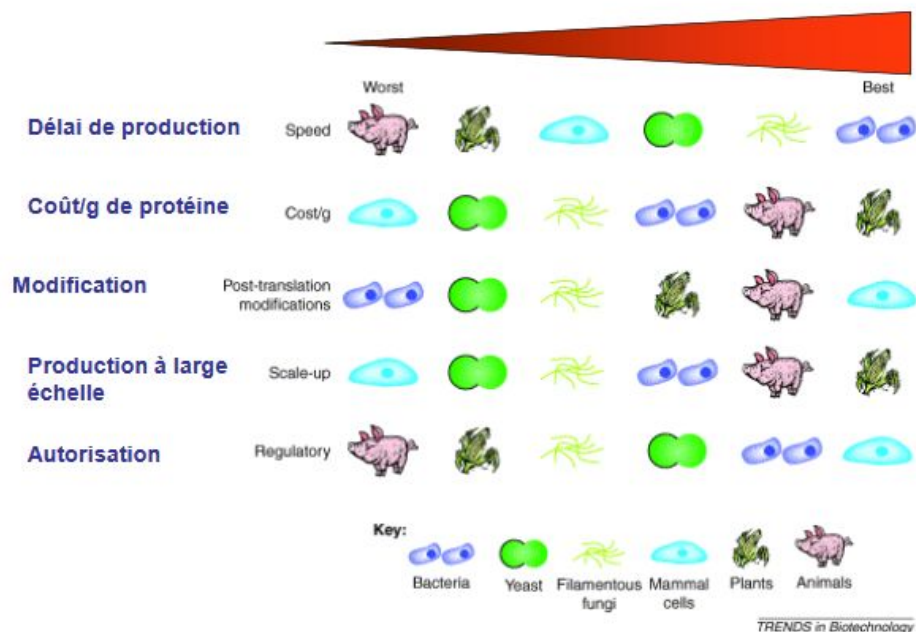
Il est aussi possible de créer des animaux transgéniques qui pourront être résistants à certains virus ou parasites. Cela peut aussi avoir un but économique en augmentant la taille ou le rendement par exemple.

Exemple: au Canada ils ont fait exprimer des hormones de croissance à des saumons, ils ont alors triplés de tailles. /!\ Ce genre de pratique est interdit en France.

IV. CONCLUSION

- Comprendre comment produire une protéine recombinante, qui peut être utilisée à des fins pour la santé.
 - Comprendre les différents types de systèmes de production, et les différences entre les systèmes de production eucaryote/procaryote et les animaux transgéniques.
 - Faire très attention au choix du couple vecteur/hôte dans le clonage (qui dépend du type de protéine qu'on veut produire mais aussi sa complexité, son poids moléculaire).
 - Les temps de production sont différents d'un système à l'autre ainsi que les coûts.
- Les aspects de sécurité, les autorisations seront différentes selon le système choisi. La législation n'est évidemment pas la même sur les animaux transgéniques que sur de la culture de bactéries

Avantages comparés des différentes sources pour la production de protéines



Futur :

Ces protéines recombinantes représentent 80% des nouveaux médicaments et donc sont synthétisées par génie génétique. Dans le futur il va falloir essayer de diminuer les coûts de production pour que le prix de revient de ces médicaments soit beaucoup plus bas.