



Production de protéines recombinantes

22 avril 2006

par Laurent Marché

Ingénieur diplômé du CNAM
INRA Centre de Recherche de Nantes
UR BIA/APR

Biopolymères-Interactions-Assemblages/Assemblages des protéines de réserves



CNAM / Agrocampus
DEST Sciences et techniques du vivant

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

INRA

Introduction



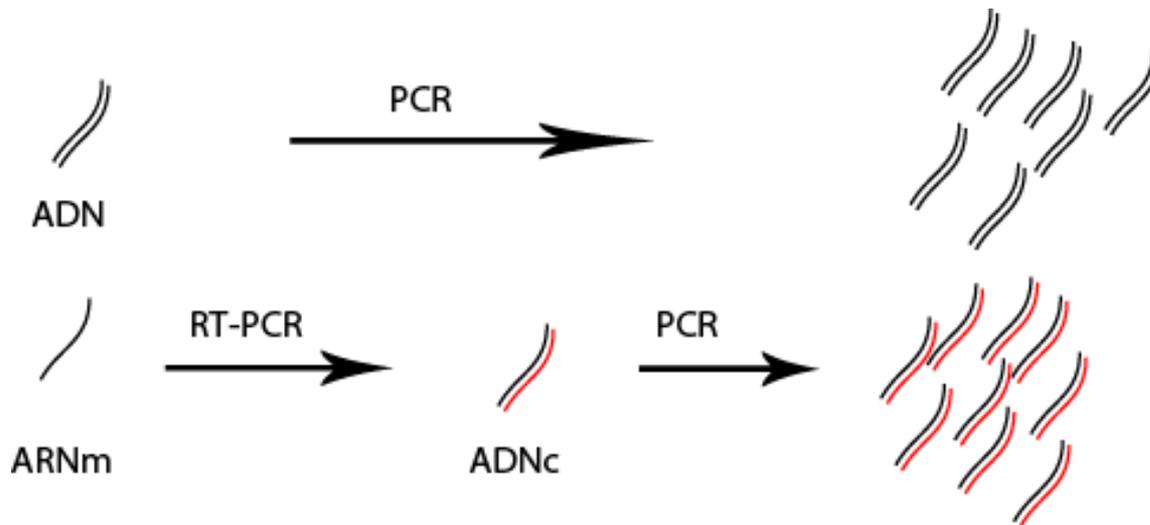
Démarche de la production d'une protéine recombinante



Transformer génétiquement des cellules ou des organismes avec un gène provenant d'un autre organisme afin de leur faire exprimer la protéine d'intérêt correspondante (expression hétérologue).

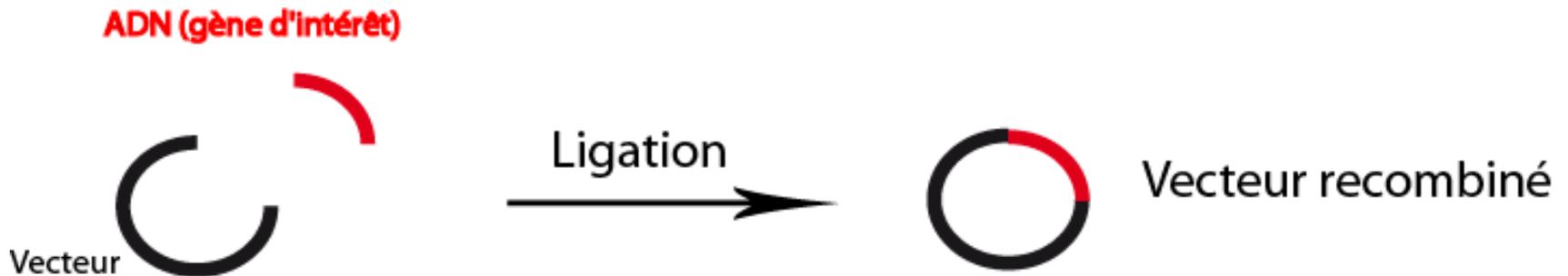
Les étapes de la production

- Amplification du gène d'intérêt



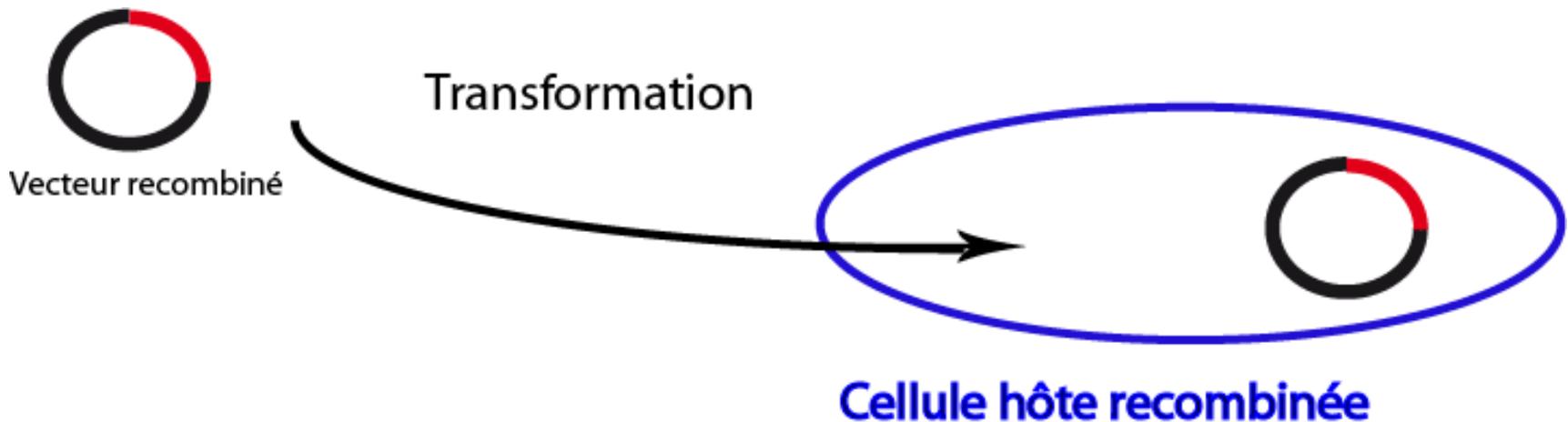
Les étapes de la production

• Insertion dans un vecteur



Les étapes de la production

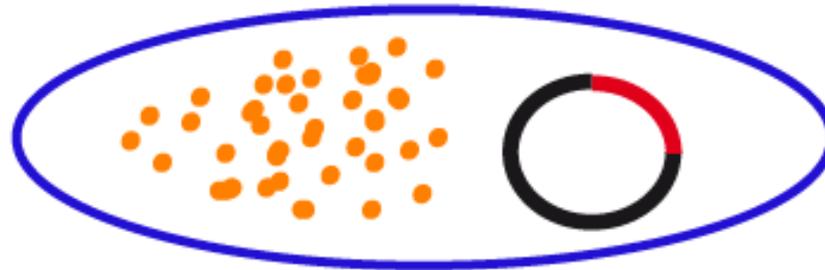
- **Transfert dans l'organisme receveur**



Les étapes de la production

• Production

Protéine recombinante



Cellule hôte recombinée

Pourquoi produire dans un autre organisme ?

- Obtenir une protéine isolée de son environnement
- Maîtriser ce qui est produit et comment
- Purifier facilement le produit
- Produire en quantité et quand on veut
- Transformer "à volonté"

Objectifs de la production

En recherche

- **Acquérir des connaissances sur la protéine:**
 - Sa structure
 - Son activité
 - Ses interactions

Objectifs de la production

Dans les autres domaines

- **Eviter les contaminations sanitaires**
- **Travailler avec une molécule pure sans mélange**
- **Pouvoir la reconnaître : traçabilité (TAG)**
- **Connaître parfaitement l'innocuité de la molécule (allergie)**

Historique et économie



Historique & Economie

Premières protéines recombinantes

- **1982 : Insuline**

- **vers 1985 : Erythropoïétine**

Evolution de la part des médicaments obtenue par des biotechnologies

1988 : 1 % du marché pour 10 Milliards d'€

2003 : 15 % du marché pour 29 Milliards d'€



2006 : 50 % des médicaments obtenus par biotechnologie sont des protéines thérapeutiques et des anticorps

En 2006

100 produits pharmaceutiques

- Vaccins
- Anticorps thérapeutiques
- Interférons
- Facteurs sanguins
- Facteurs de croissance hématopoïétique
- Hormones de croissance
- Interleukine
- ...

En 2006

- **70 % des médicaments biotech ont moins de six ans**
- **370 médicaments et vaccins en tests cliniques**
- **200 maladies ciblées**
 - Cancers, Alzheimer, cardiopathies, diabète, sclérose en plaque, SIDA, ...



Une production qui se diversifie

- **Bio-plastiques**
- **Enzymes (industrie, santé, diagnostic, cosmétique, environnement)**
- **Nutraceutique**

Les différentes stratégies de production



Les organismes de production

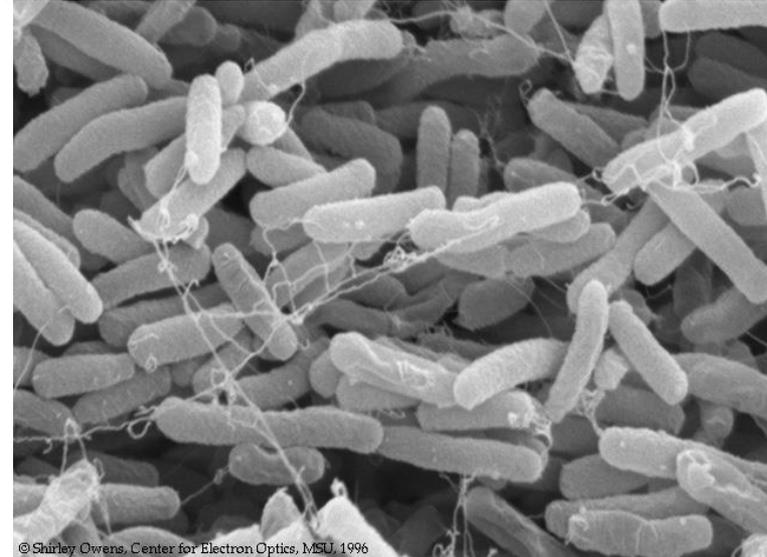
Procaryotes

- ***Bactéries***

Eucaryotes

- **Levures**
- **Cellules d'insectes / baculovirus**
- **Cellules de mammifères**
- **Champignon**
- **Plantes et animaux transgéniques**

Bactéries

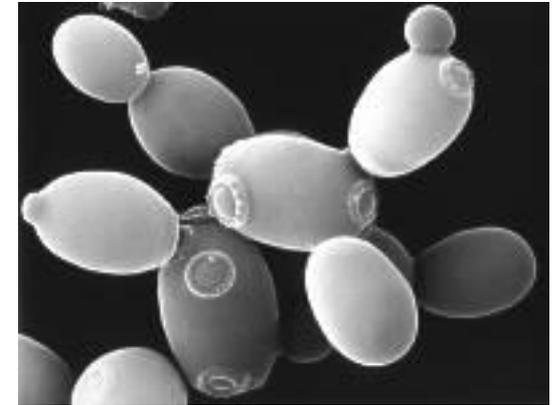


© Shirley Owens, Center for Electron Optics, MSU, 1996

E. coli

- Le moins cher
- Limité aux protéines simples
- Peu ou pas de modifications post-traductionnelles
- Utilisée en recherche et en production
- Autres type : *Bacillus subtilis*...

Levures



Saccharomyces cerevisiae

- Mêmes avantages que les bactéries
 - Risques immunogènes élevés pour l'homme
 - Modifications post-traductionnelles
-
- Autre type : *Pichia pasteuris*...

Champignon

Ex Aspergillus nidulans

- Peu utilisé
- Produit protéines sécrétées
- Les modifications post-traductionnelles changent les propriétés pharmacologiques

Cellules d'insectes infectées par Baculovirus

Lignée de cellules de lépidoptère...

- Production de protéines variées
- Utilisées surtout en recherche
- Bonnes modifications post-traductionnelles
- Protéine excrétée

Culture de cellules de mammifères

Cellule d'ovaire de Hamster chinois (CHO), cellules humaines...

- **Système standard de production des protéines complexes de bonne qualité (anticorps)**
- **Rendement faible**
- **Coûts élevés**
- **Risques de contamination**

Plantes transgéniques

Tabac, maïs, orge...

- Production en très grande quantité
- Coût très faible
- Pas de risques de contaminations
- Nécessité d'humaniser les protéines

Animaux transgéniques

Chèvre, poulet, semence de porc...

- Permet de produire en grande quantité (lait)
- Protéines complexes et correctement glycosylées et repliées
- Coût élevé mais moins que les cultures cellulaires
- Risques élevés de contamination virale...

Choix du système d'expression

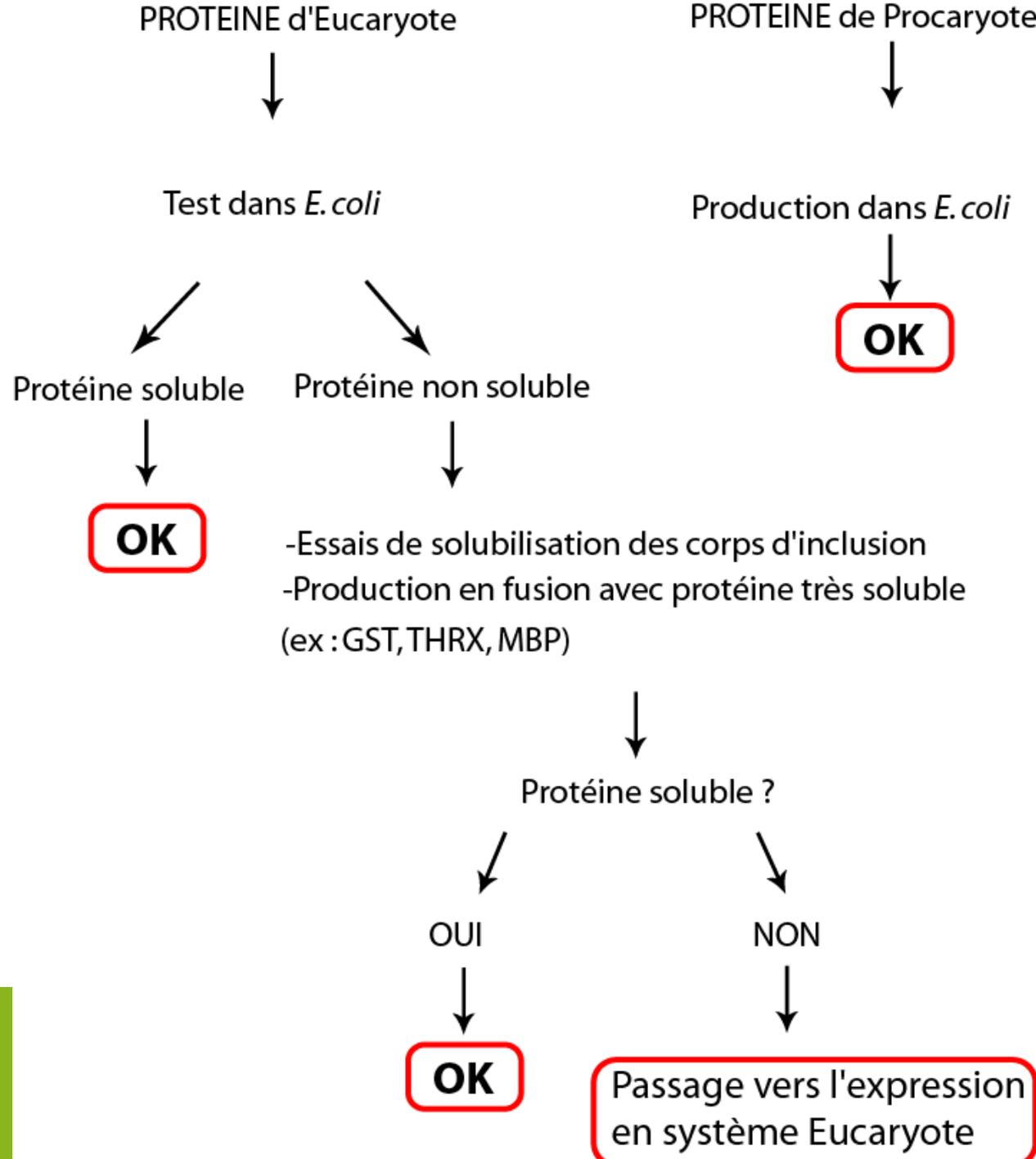


Choix du système d'expression

Questions à se poser ?

- Quel type de protéine veut-on exprimer ?
- Est-ce que la protéine est soluble quand on exprime dans *E. coli* ?
- La protéine a-t-elle besoin de modification post-traductionnelles ?
- Quel est le codon "usage" de la protéine à produire ?

- Quel type de protéine veut-on exprimer ?
- Est-ce que la protéine est soluble quand on exprime dans *E. coli* ?



Choix du système d'expression

Questions à se poser ?

La protéine souhaitée a-t-elle besoin de modifications post-traductionnelles complexes?

•NON → système Prok peut suffire

Choix du système d'expression

Questions à se poser ?

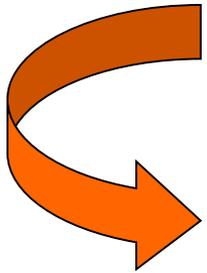
La protéine souhaitée a-t-elle besoin de modifications post-traductionnelles complexes ?

• **OUI → choisir en général un système EUK**

Attention : les cellules eucaryotes ne pratiquent pas toutes les mêmes modifications.

Choix du système d'expression

Production en procaryote possible



- ingénierie des protéines
- modifications post-traductionnelles ex-vivo

Choix du système d'expression

Questions à se poser ?

- La protéine souhaitée a-t-elle besoin de modifications post-traductionnelles complexes ?

Attention : les cellules eucaryotes ne pratiquent pas toutes les mêmes modifications.

Choix du système d'expression

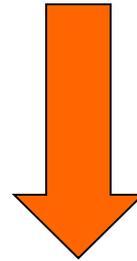
Des questions à se poser ?

• **Quel est l'utilisation des codons (codon usage) pour ma protéine ?**

➤ **La quantité d'ARNt pour un même codon est variable d'une espèce à une autre.** <http://www.kazusa.org.jp/codon/>

Choix du système d'expression

Codons majeurs



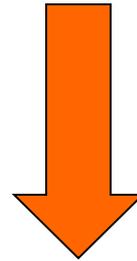
Gènes hautement exprimés



ARNt présents en grande quantité

Choix du système d'expression

Codons mineurs (ou rares)



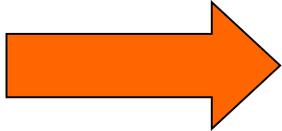
Gènes à niveau d'expression bas



ARNt présents en faible quantité

Choix du système d'expression

Quelles conséquences ?

- Production de protéines tronquées
 - Décalage du cadre de lecture
 - Mauvaise incorporation d'acides-aminés
 - Inhibition de la synthèse de la protéine
-  - Rendement faible
- Protéine de mauvaise qualité

Choix du système d'expression

Quelles solutions ?

- **Mutagenèse "site dirigée"**
- **Co-expression de la protéine et des gènes codant pour les ARNt rares**
- **Utilisation de souche qui codent certains ARNt rares (ex : BL21, Rosetta ...)**

**Résultats
non concluants**



**Changer de système
d'expression**



Production de protéines recombinantes : exemple dans *E. coli*

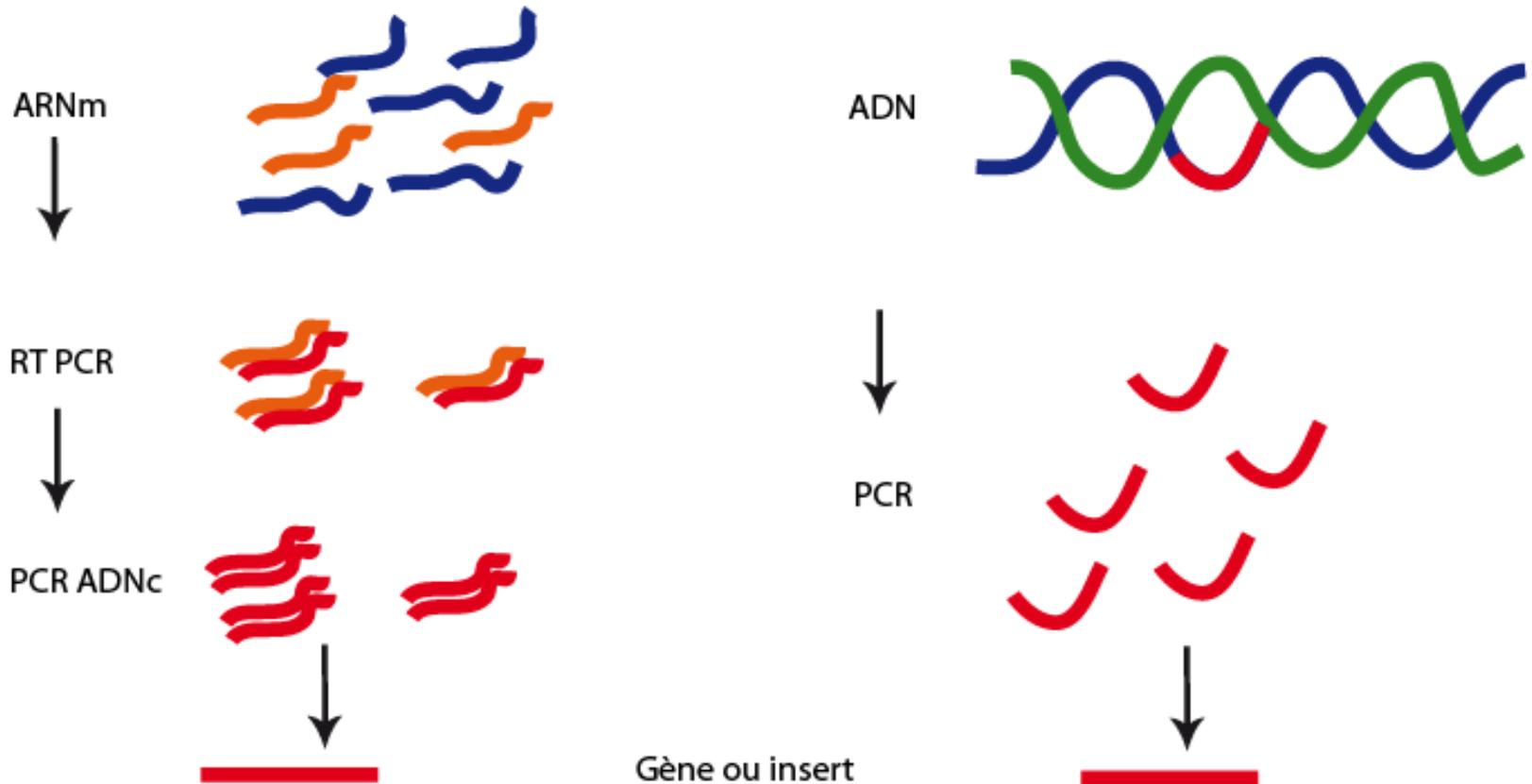


Du gène à la protéine

- **Amplification du gène d'intérêt**
- **Insertion dans un vecteur**
- **Transfert dans l'organisme receveur**
- **Extraction et récupération de la protéine**
- **Purification**

Production dans *E. coli*

RECUPERATION DU GENE D'INTERET



Les vecteurs

Définition : Un vecteur désigne un système permettant le transfert, la réplication et l'expression d'un gène dans une cellule hôte pour un clonage ou une transgénèse.

(par extension tout ce qui permet un transfert)

Les vecteurs

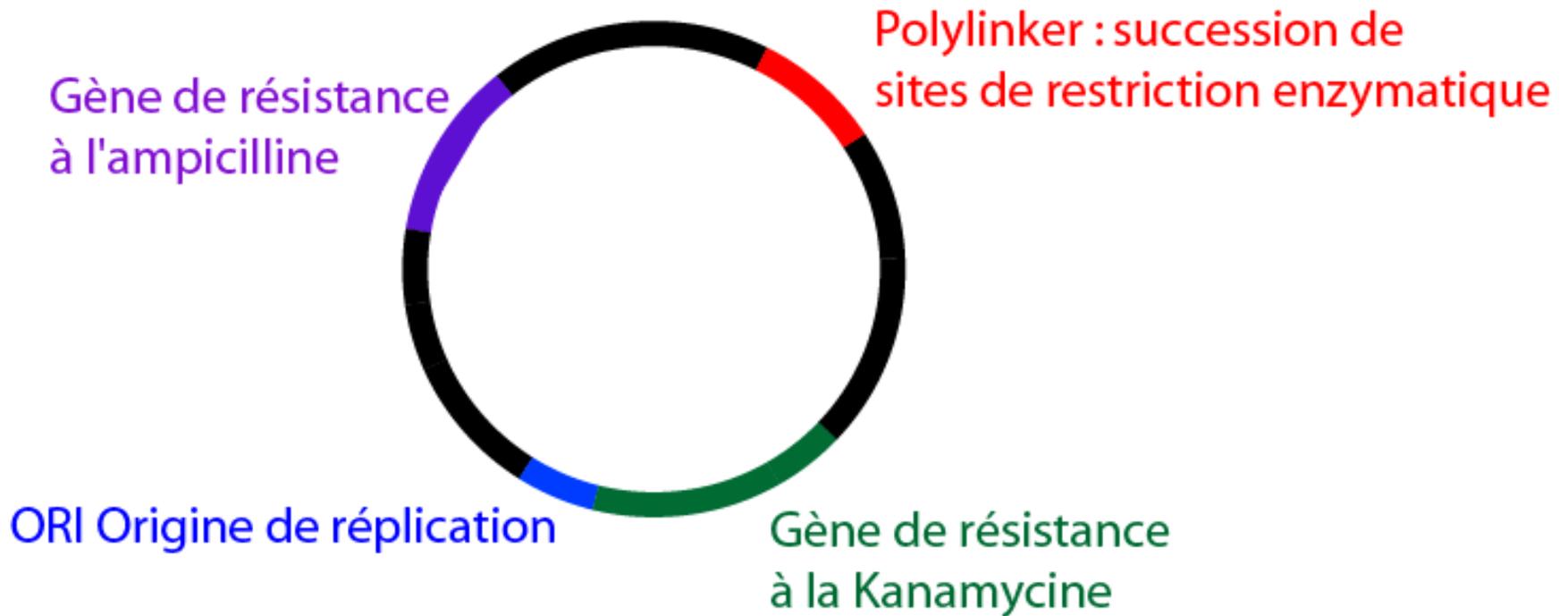
- **ADN**
 - **Plasmide bactérien**
 - **YAC (chromosome artificiel de levure)**
 - **Cosmide (chromosome artificiel de bactérie)**
- **Virus**
- **Liposome (transfert uniquement)**

Le plasmide bactérien

- ADN circulaire
- Petite taille
(3000 à 100 000 pb)
- Réplication indépendante
(ORI indépendante)



Le plasmide bactérien



Le plasmide bactérien

Ses outils :

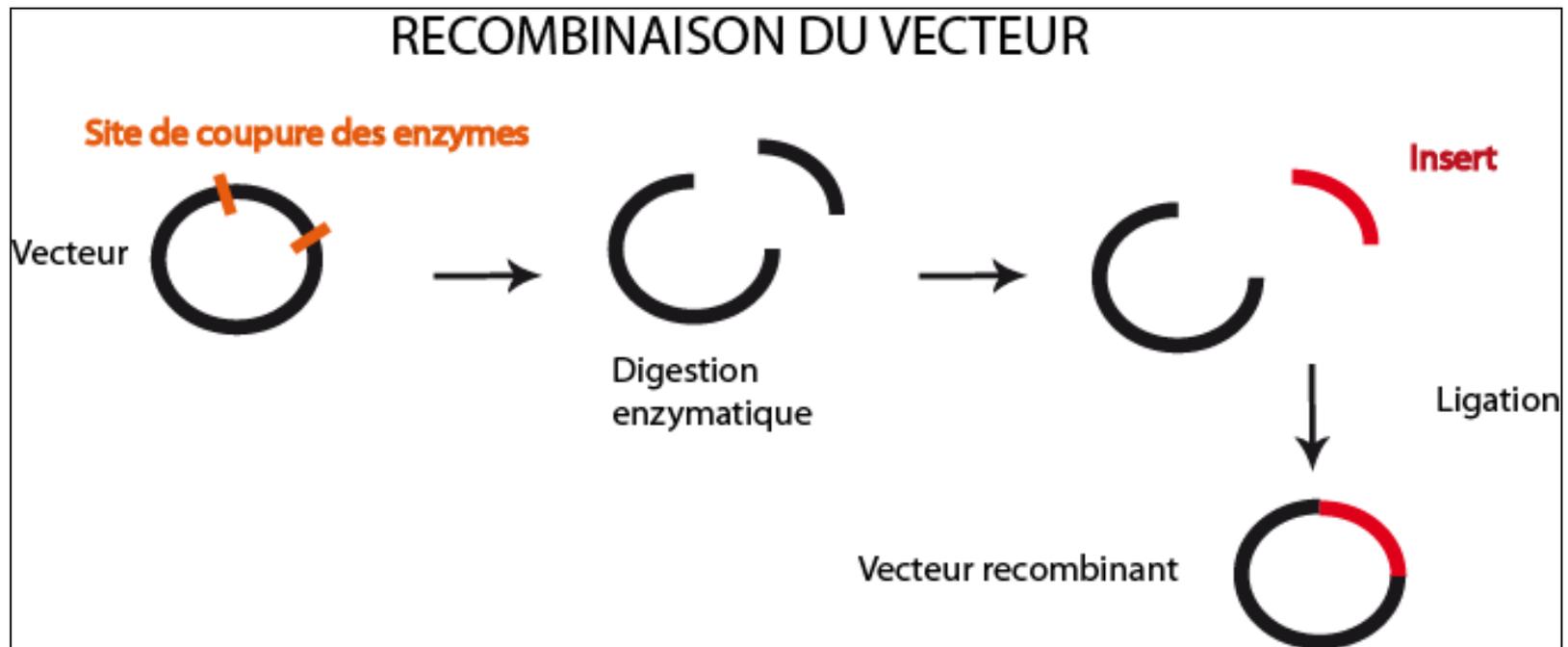
- Sites de restriction
- Gènes de résistance
- Promoteur de la T7 RNA polymérase
- Marqueurs et protéines fusion (His-Tag, MBP...)
- Opéron Lac

Le clonage



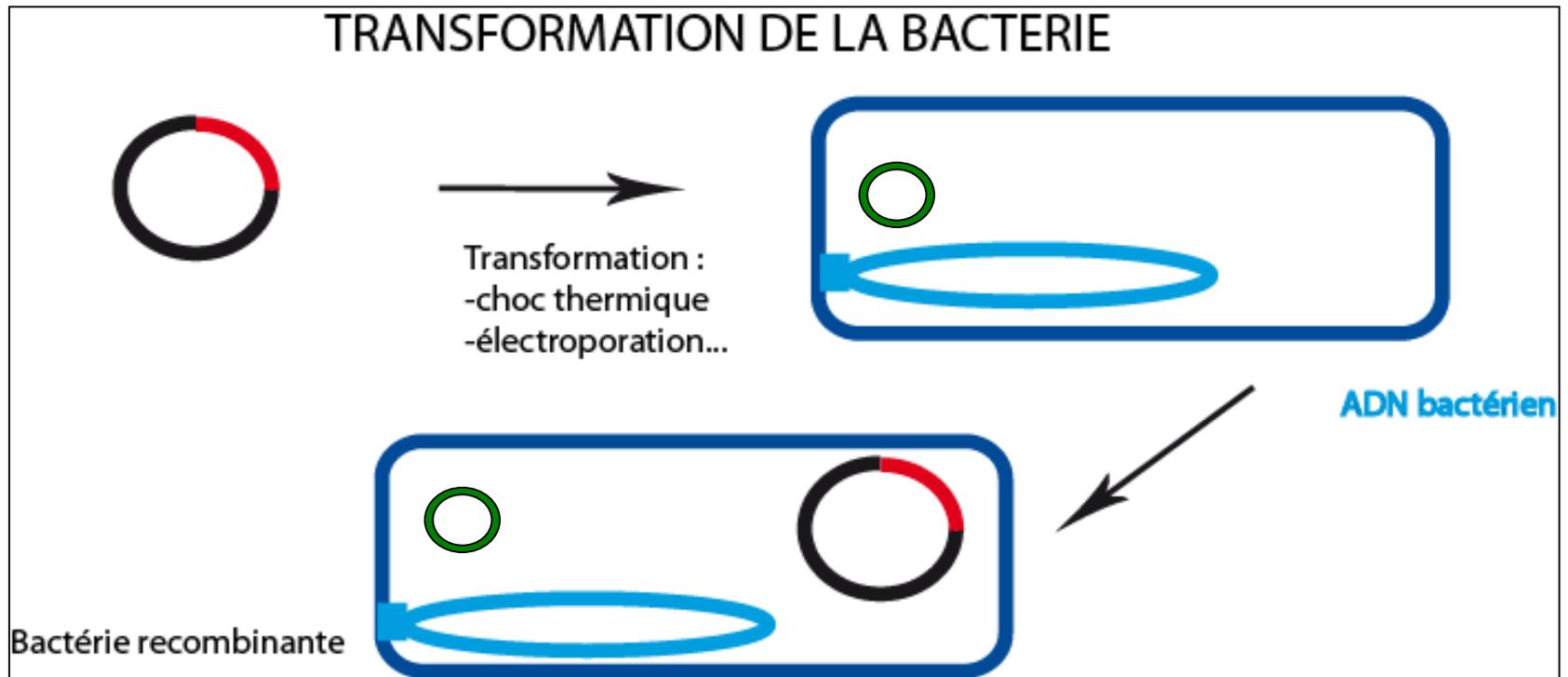
Production dans *E. coli*

Outils : sites de restriction



Production dans *E. coli*

Outils : Gènes de résistance aux antibiotiques

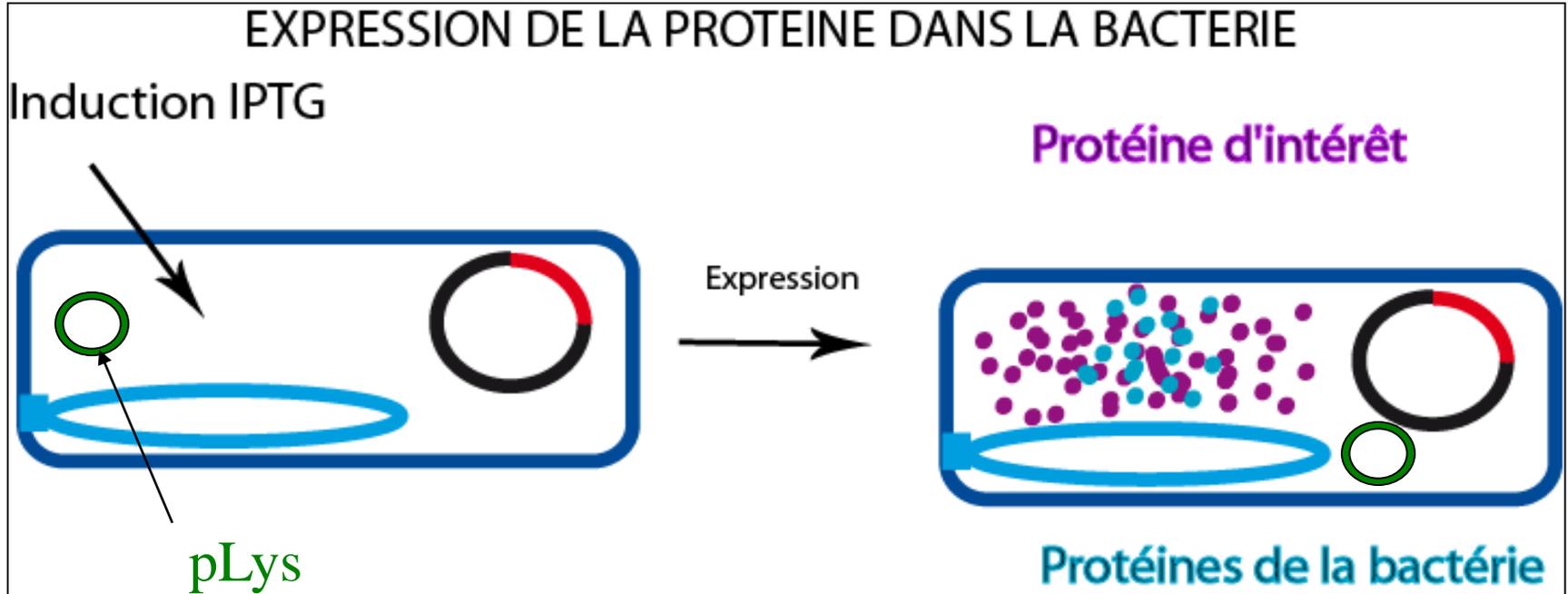


La production



Production dans *E. coli*

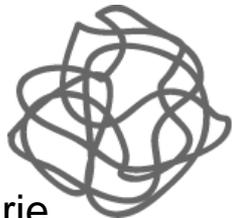
Outils : Opéron Lac, IPTG, pLys



Production dans *E. coli*

Outils : Opéron Lac, IPTG, pLys

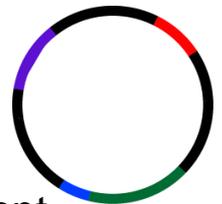
Protéine répresseur du gène Lac



ADN bactérie



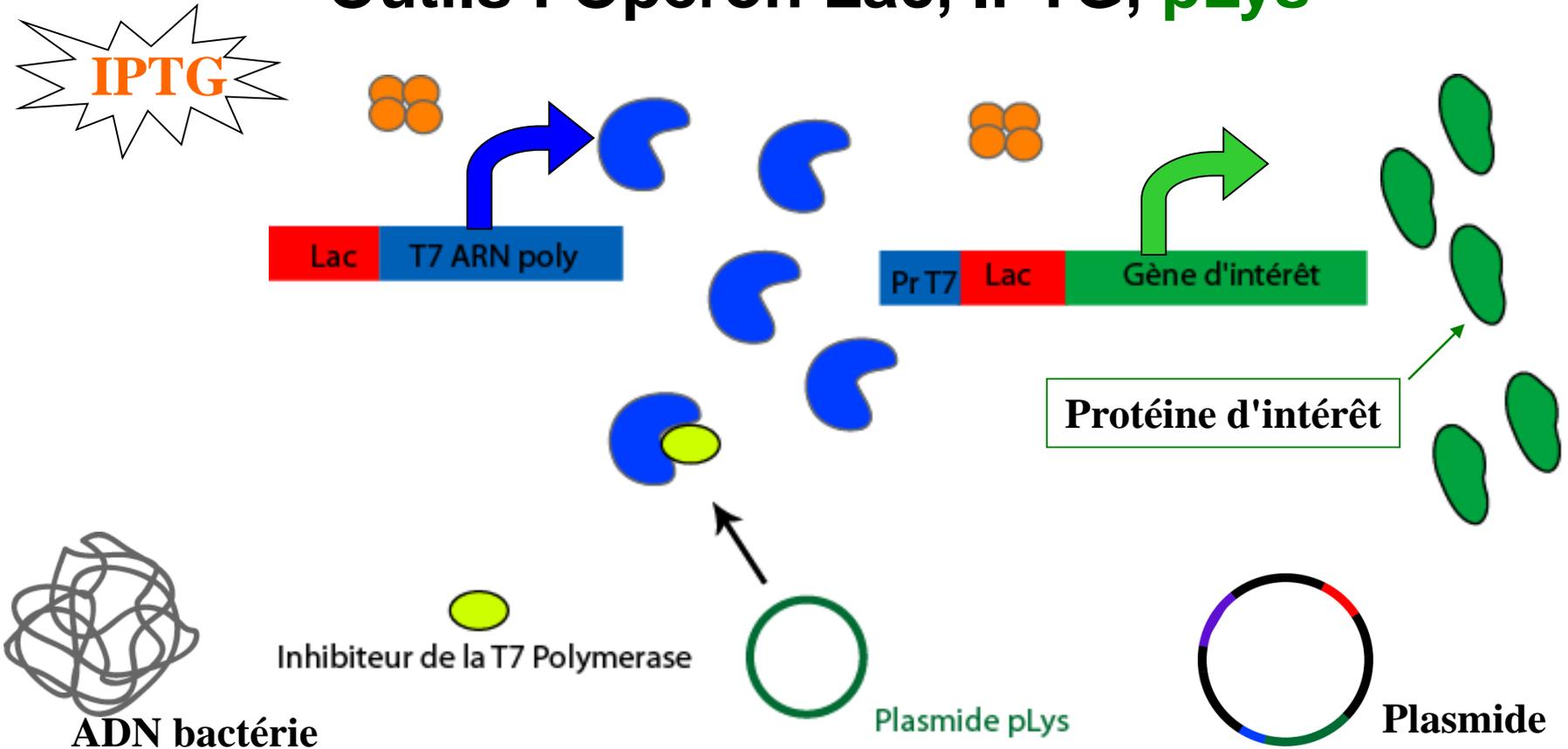
Plasmide pLys



Vecteur recombinant

Production dans *E. coli*

Outils : Opéron Lac, IPTG, pLys



Production dans *E. coli*

- En Erlen : tests et production de 1 à 2 litres

Conditions contrôlées minimales (température, agitation).

- En Fermenteur : Conditions contrôlées plus importantes

Température, pH, O₂, agitation.

Fermenteur de 4 litres

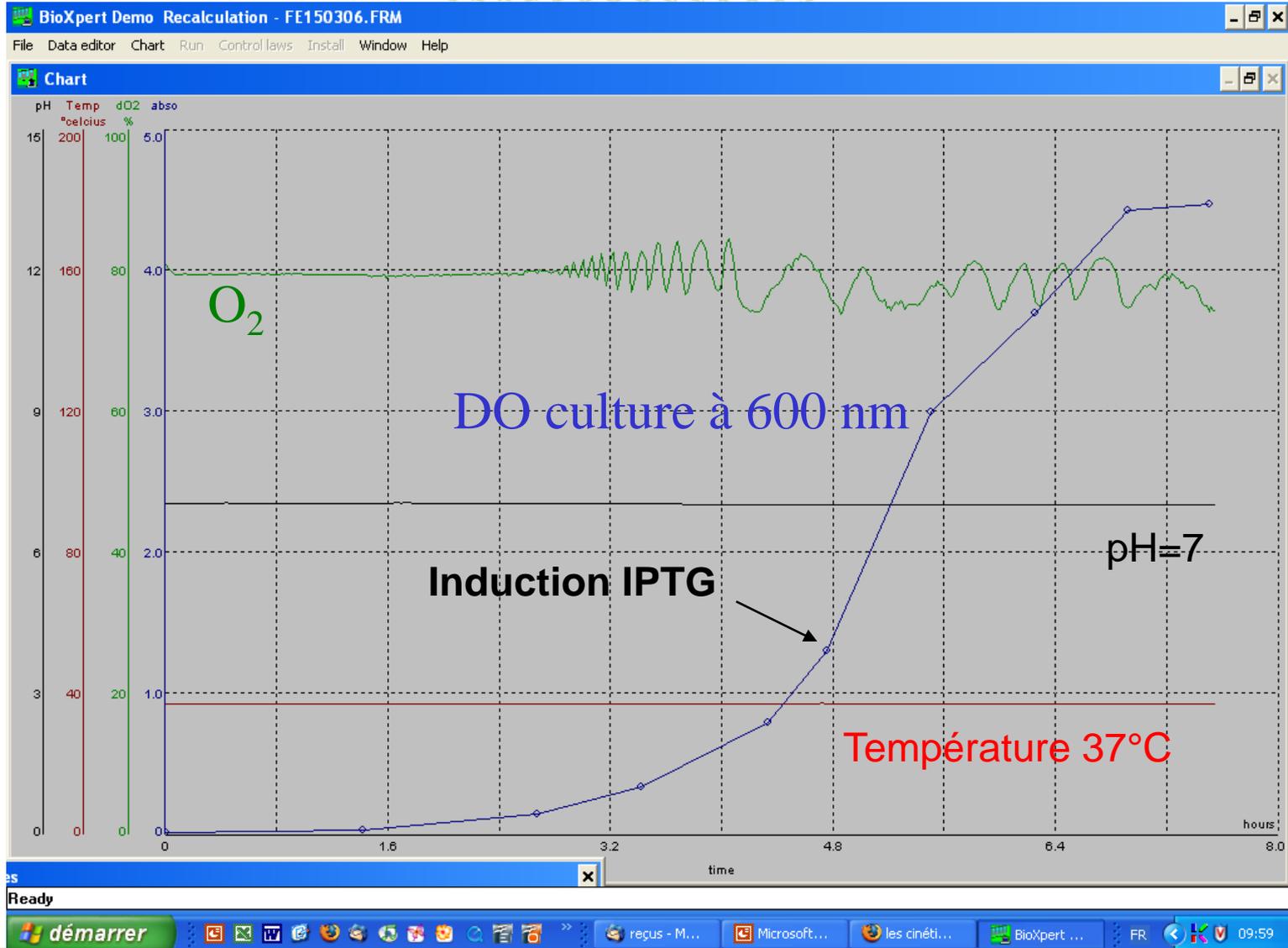


Production dans *E. coli*

- Fermenteurs de 35 l et 300 l
- Rendements de l'ordre de 1,5 à 2 g/l en production



Production de protéines recombinantes 22 avril 2006

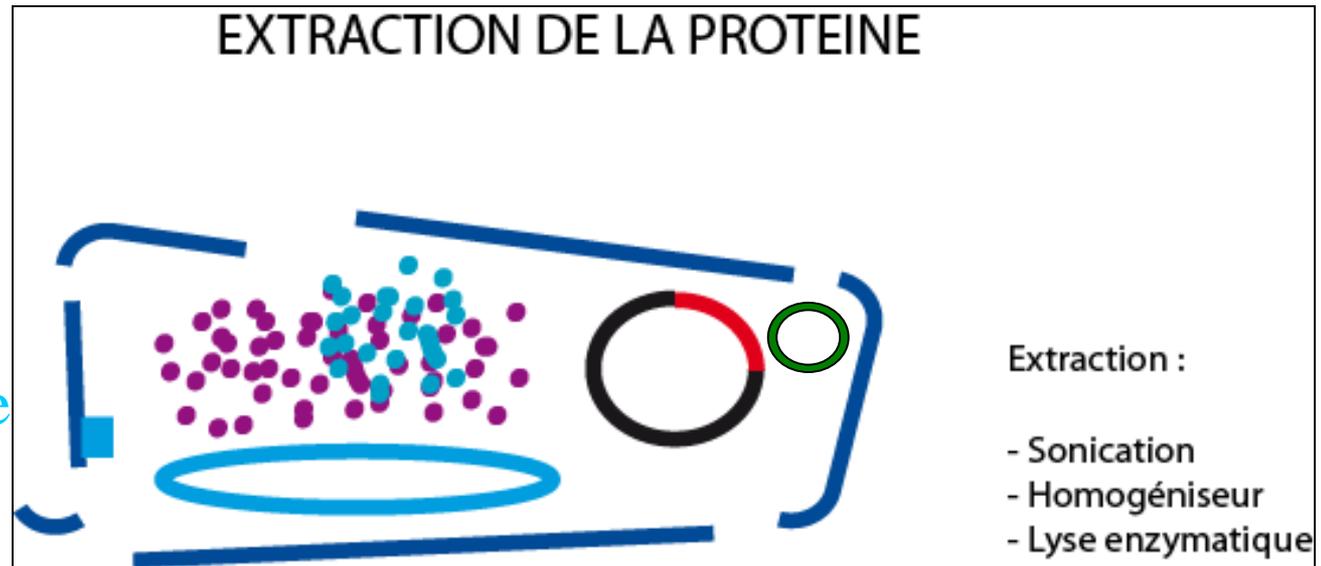


Extraction et purification



Production dans *E. coli*

Outils : protéine fusion (solubilisation)



Protéine d'intérêt
Protéine de la bactérie

Production dans *E. coli*

Extraction des protéines

Objectif : rompre les parois des cellules pour récupérer les protéines.

Production dans *E. coli*



Sonication

- **Méthode répandue**
- **Rupture des cellules par effet de cisaillement et cavitation**

Limites : contrôle de la température difficile au delà de 50g d'échantillon

Production dans *E. coli*



Homogénéiseur

- Effet de Cisaillement par différence de pression
- Pression de 6000 à 40 000 psi
- Système de contrôle de la température
- Production à grande échelle
- Débit 2,6 à 66 l/h

Production dans *E. coli*

Lysosyme

- Digestion des peptidoglycanes des parois bactériennes
- Perméabilisation pour les gram - donc *E. coli* (Tris)
- Libération de beaucoup d'ADN (DNase 1 µg/ml)

Production dans *E. coli*

Principe de la protéine fusion



Protéine fusion :

- Glutathione S transferase
- Thioredoxine
- Maltose binding...

Site de clivage

- acide PQ (Proline-Glutamine)
- Enzymatique (TEV protéase)

Production dans *E. coli*

Intérêts de la protéine fusion

- Permettre un bon repliement de la protéine
- Permettre une meilleure solubilité

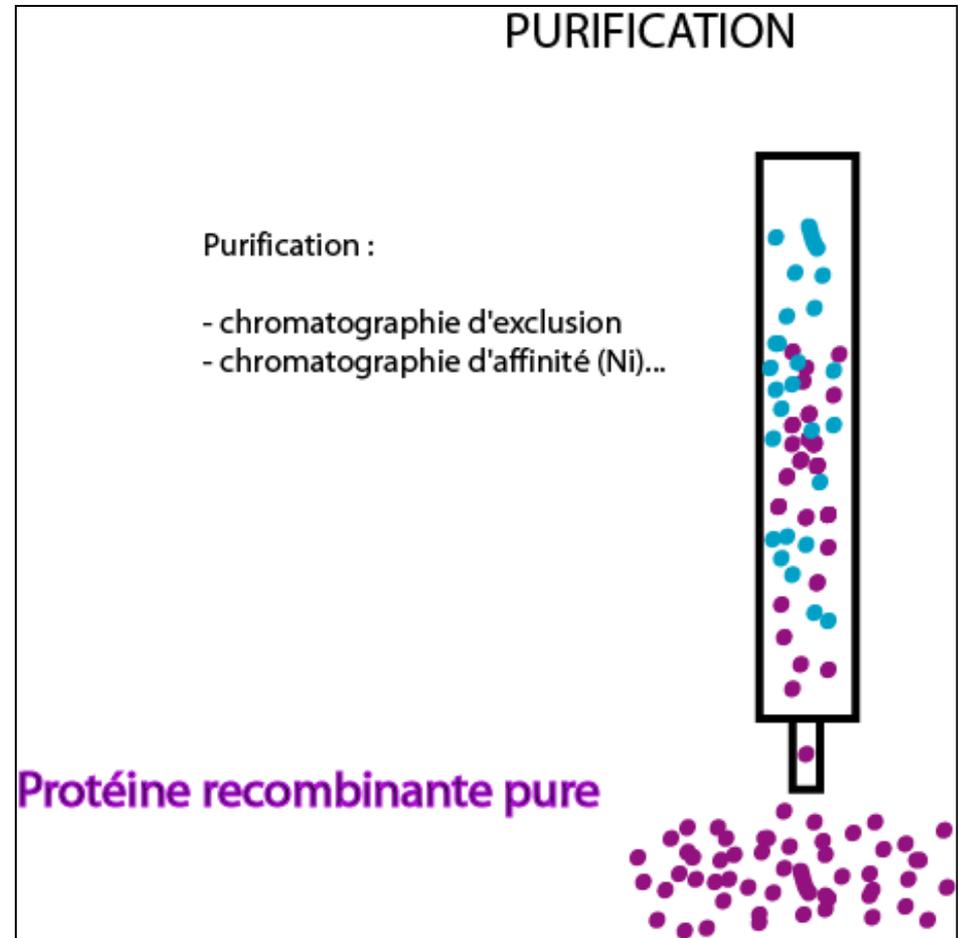
Production dans *E. coli*

Intérêts du Tag

- **Séparation de la protéine d'intérêt des autres constituants**
- **En C-ter permet de s'assurer de l'intégrité de la protéine**

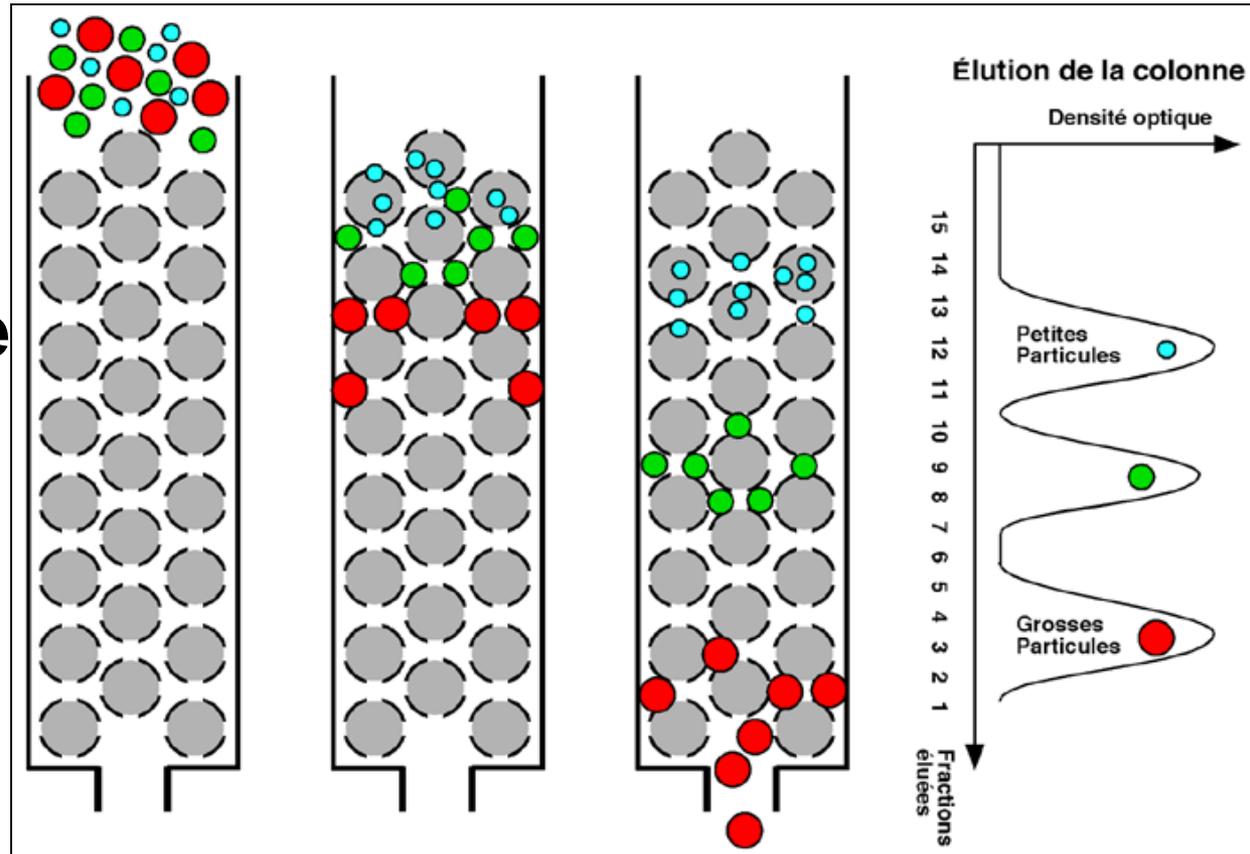
Production dans *E. coli*

**Outils : Marquage
de la protéine
(ex His-Tag...)**



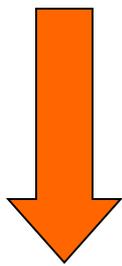
Production dans *E. coli*

Chromatographie d'exclusion

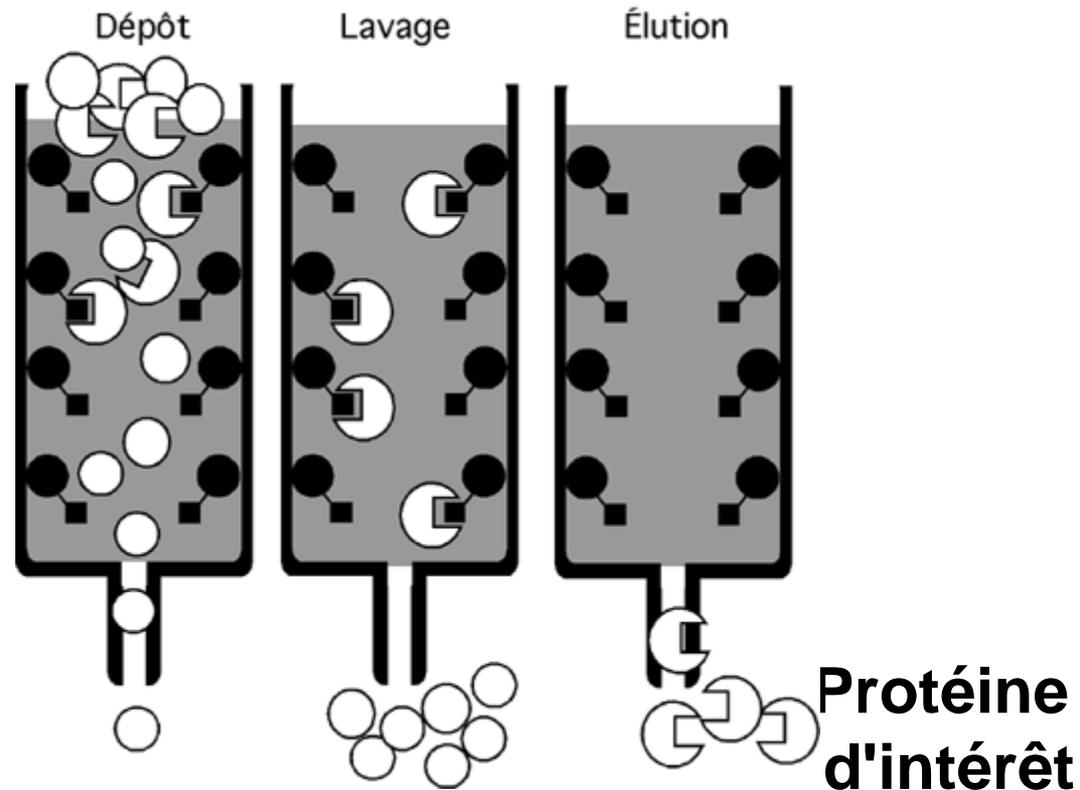


Production dans *E. coli*

Chromatographie d'affinité électrostatique



Ni^{2+} se lie aux poly-Histidines



Conclusion



Production de protéines recombinantes

- **1953 : découverte de l'ADN**
- **1982 : première protéine recombinante**
- **2006 : 100 produits pharmaceutiques disponibles**

Production dans *E. coli*

- **Bon exemple de l'application d'une découverte**
- **Un fort potentiel thérapeutique et économique**
- **Des débouchés qui se diversifient (fin du pétrole, environnement...)**

Production dans *E. coli*

- Des techniques désormais éprouvées
- Adaptations nécessaires selon la protéine et selon l'objectif
- Systèmes à disposition très divers : "de l'éprouvette aux champs".



Production de protéines recombinantes

22 avril 2006

par Laurent Marché

Ingénieur diplômé du CNAM
INRA Centre de Recherche de Nantes
UR BIA/APR

Biopolymères-Interactions-Assemblages/Assemblages des protéines de réserves



CNAM / Agrocampus
DEST Sciences et techniques du vivant

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

INRA