



# 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



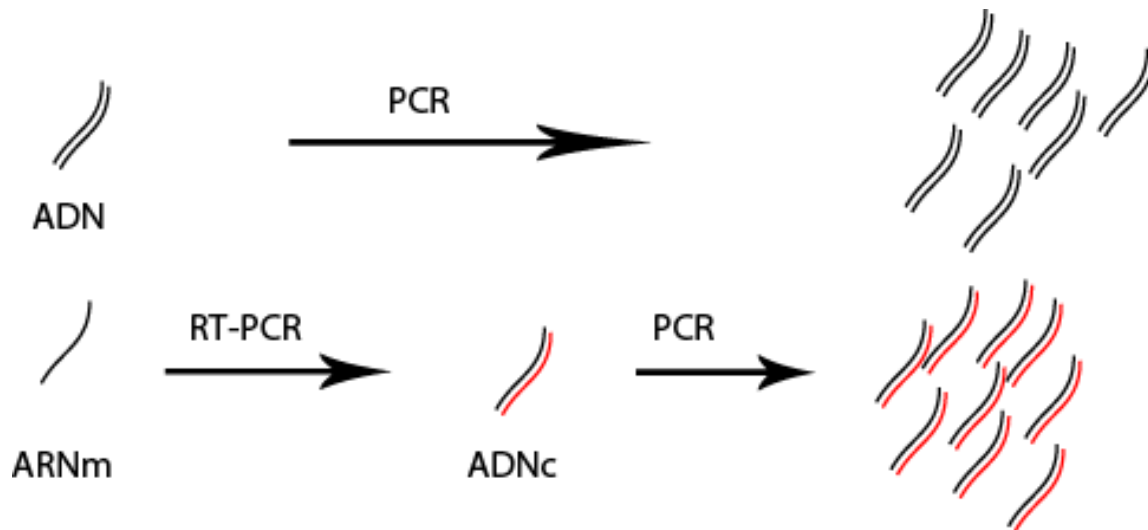
# Démarche de la production d'une protéine recombinante



**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).**

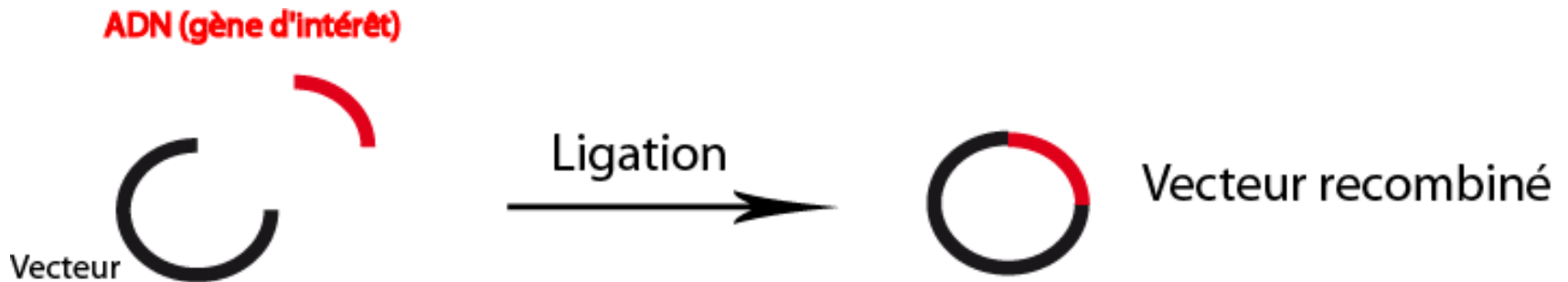
# Les étapes de la production

## • Amplification du gène d'intérêt



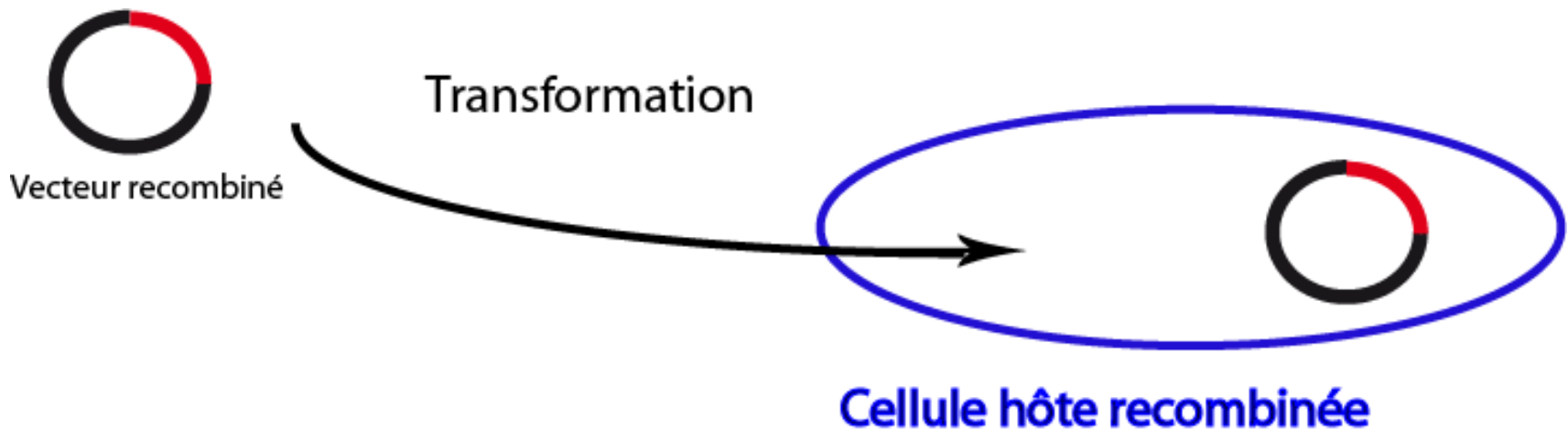
# Les étapes de la production

## • Insertion dans un vecteur



# Les étapes de la production

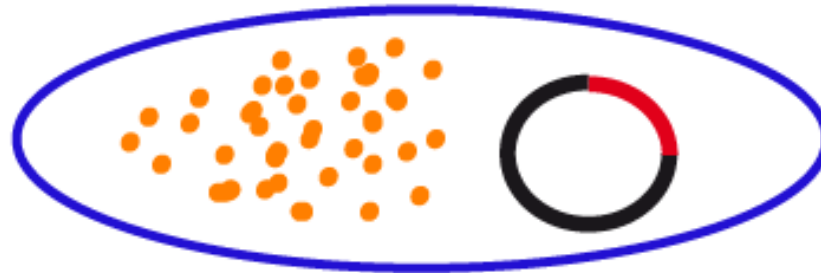
- **Transfert dans l'organisme receveur**



# 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

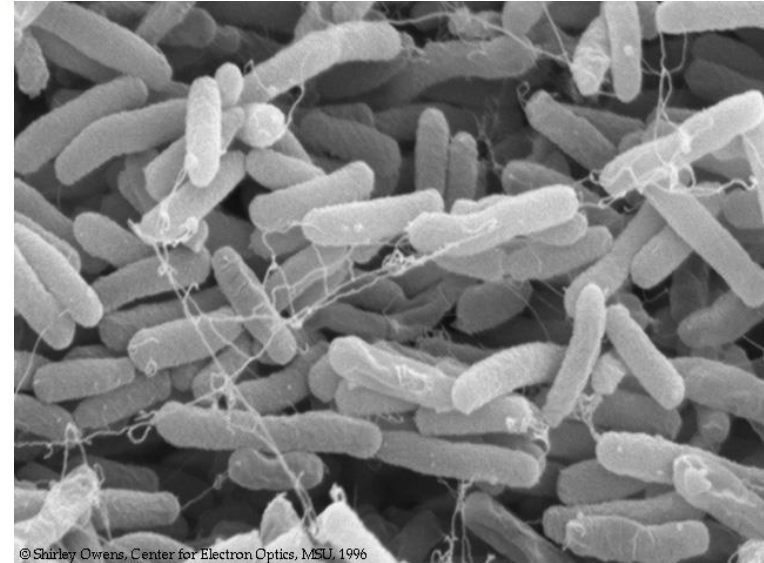
## Procaryotes

- ***Bactéries***

## Eucaryotes

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

# Bactéries

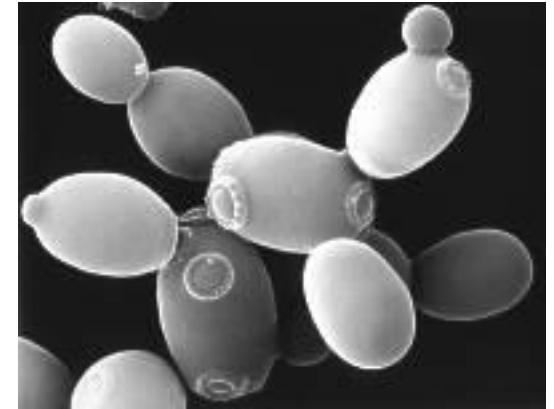


© Shirley Owens, Center for Electron Optics, MSU, 1996

## *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

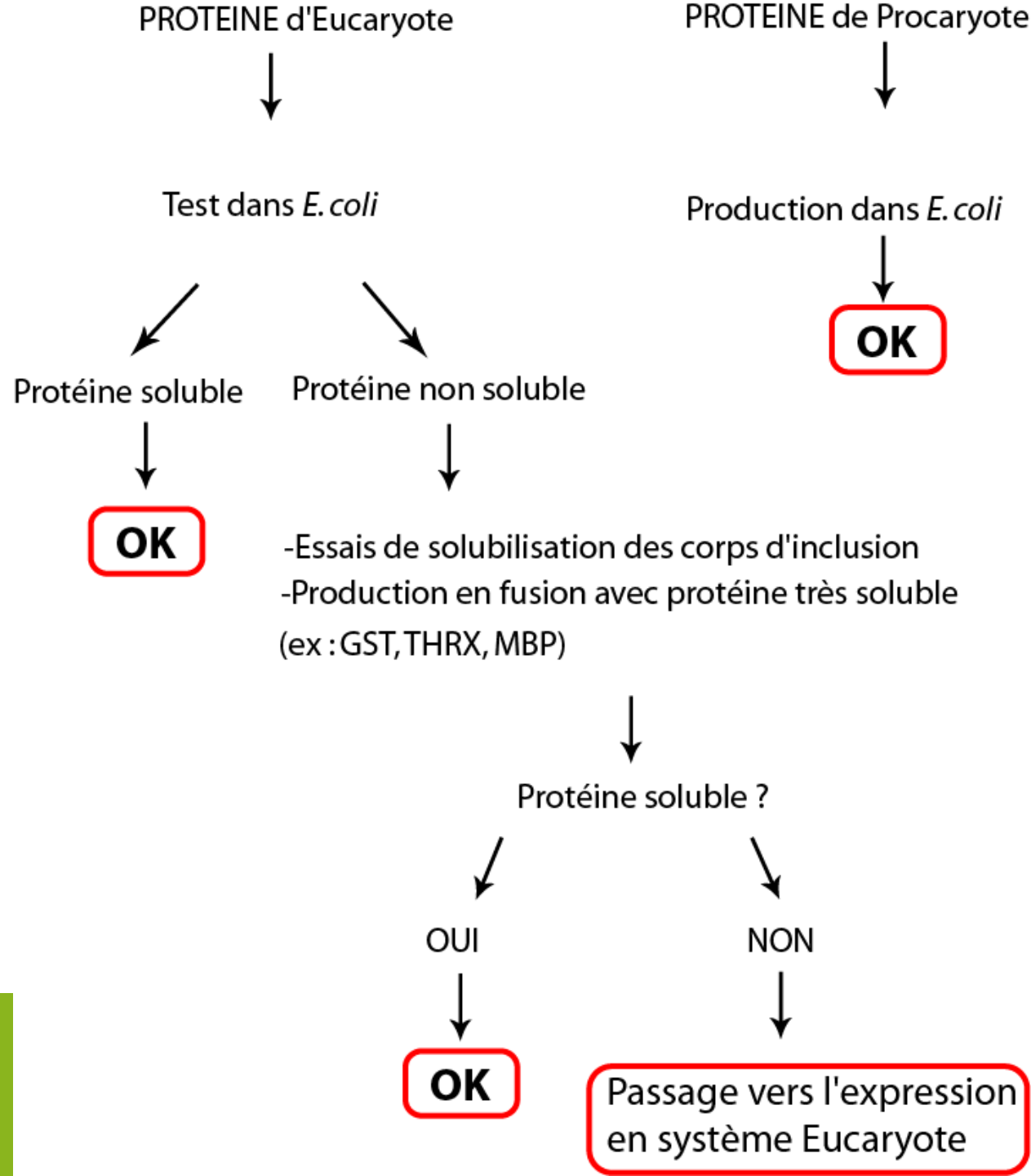


# Choix du système d'expression

## *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 ?*

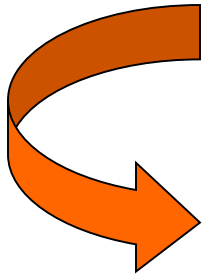
**La protéine souhaitée a-t-elle besoin de modifications post-traductionnelles complexes ?**

• **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

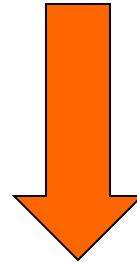
## *Des questions à se poser ?*

• **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**



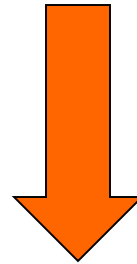
**Gènes hautement exprimés**



**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*

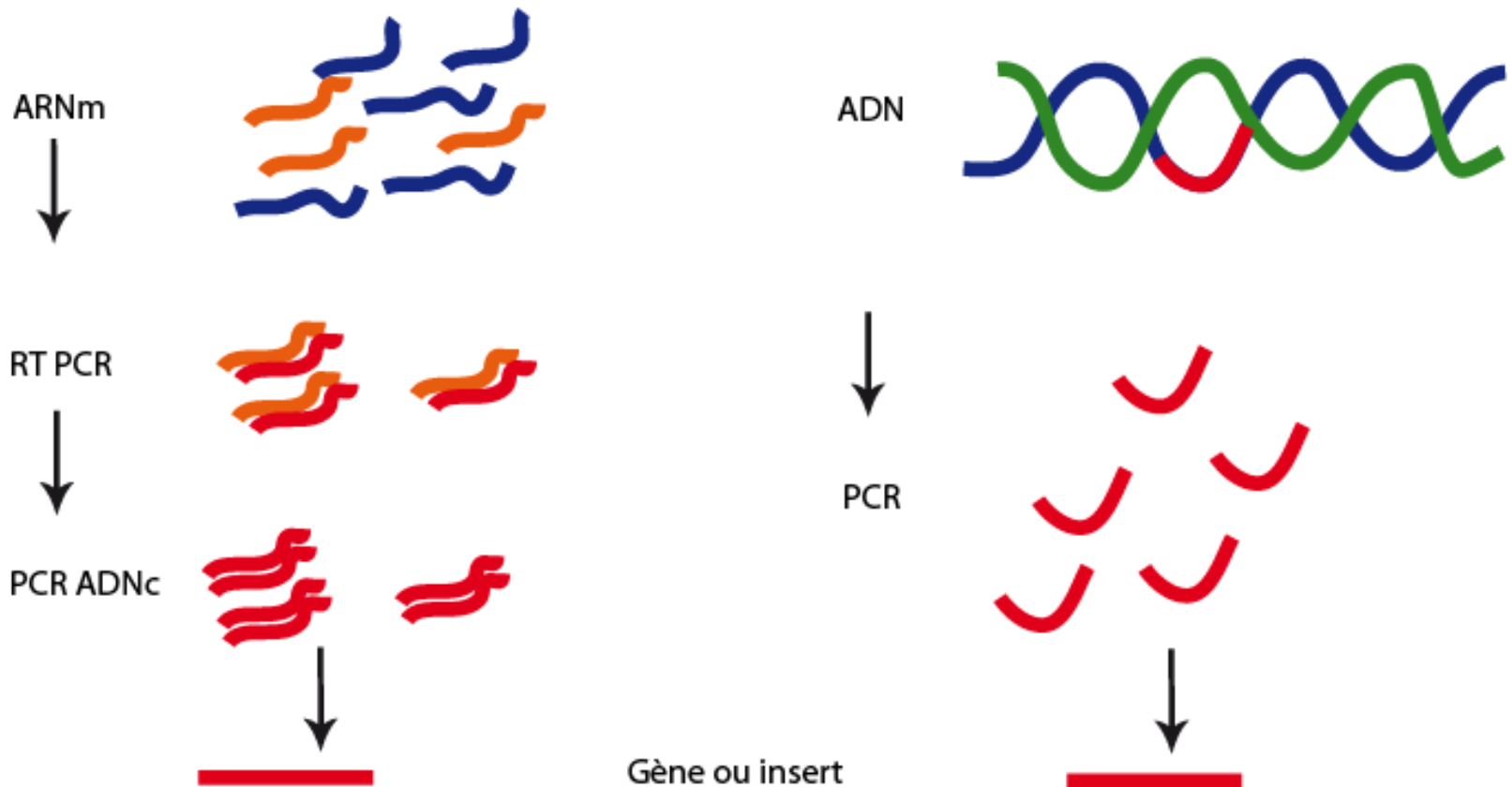


# Du gène à la protéine

- **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

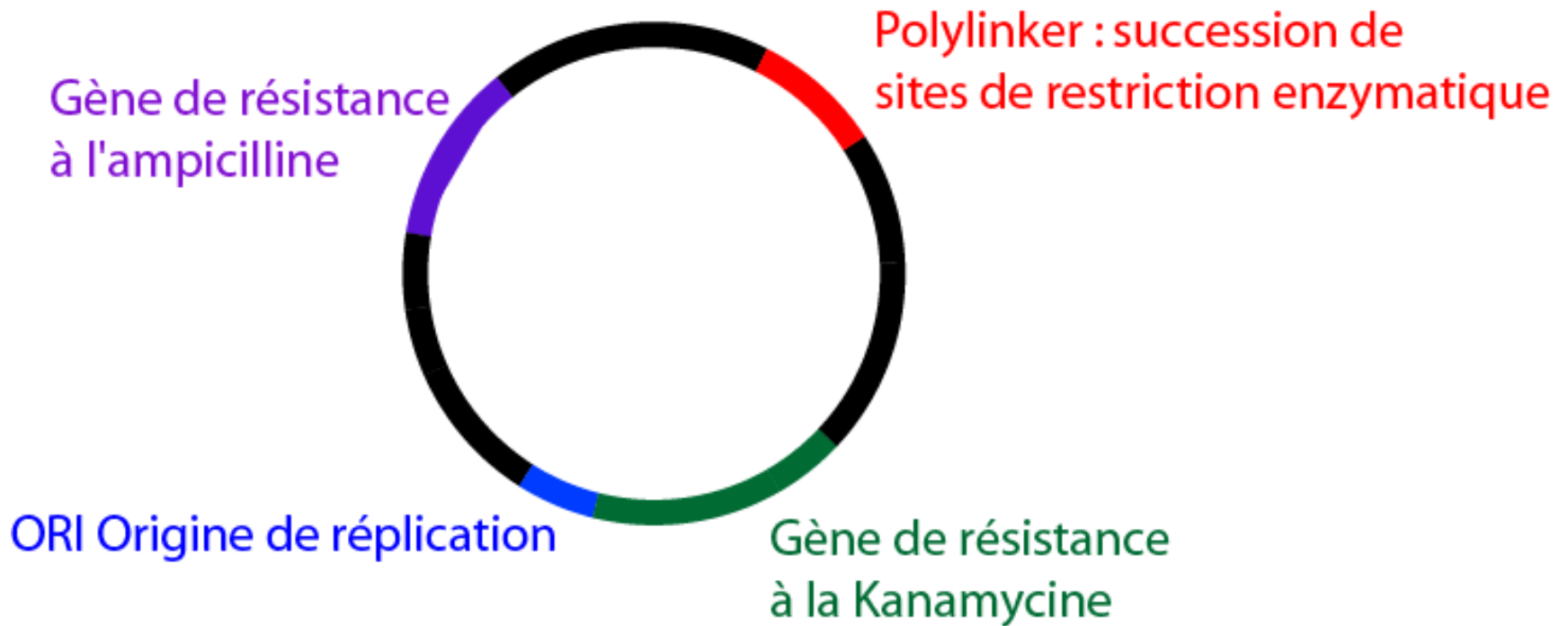
- **ADN**
  - **Plasmide bactérien**
  - **YAC (chromosome artificiel de levure)**
  - **Cosmide (chromosome artificiel de bactérie)**
- **Virus**
- **Liposome (transfert uniquement)**

# Le plasmide bactérien

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



# Le plasmide bactérien



# Le plasmide bactérien

## Ses outils :

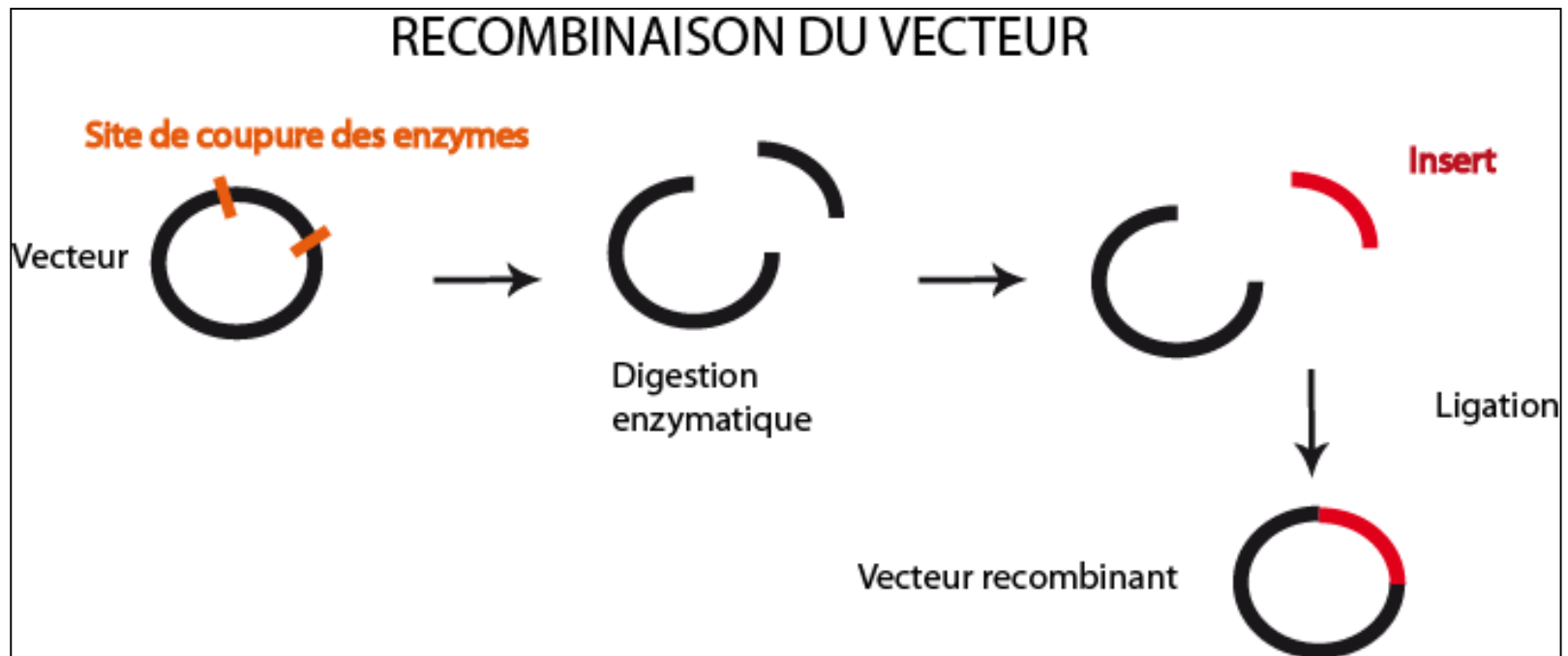
- Sites de restriction
- Gènes de résistance
- Promoteur de la T7 RNA polymérase
- Marqueurs et protéines fusion (His-Tag, MBP...)
- Opéron Lac

# Le clonage



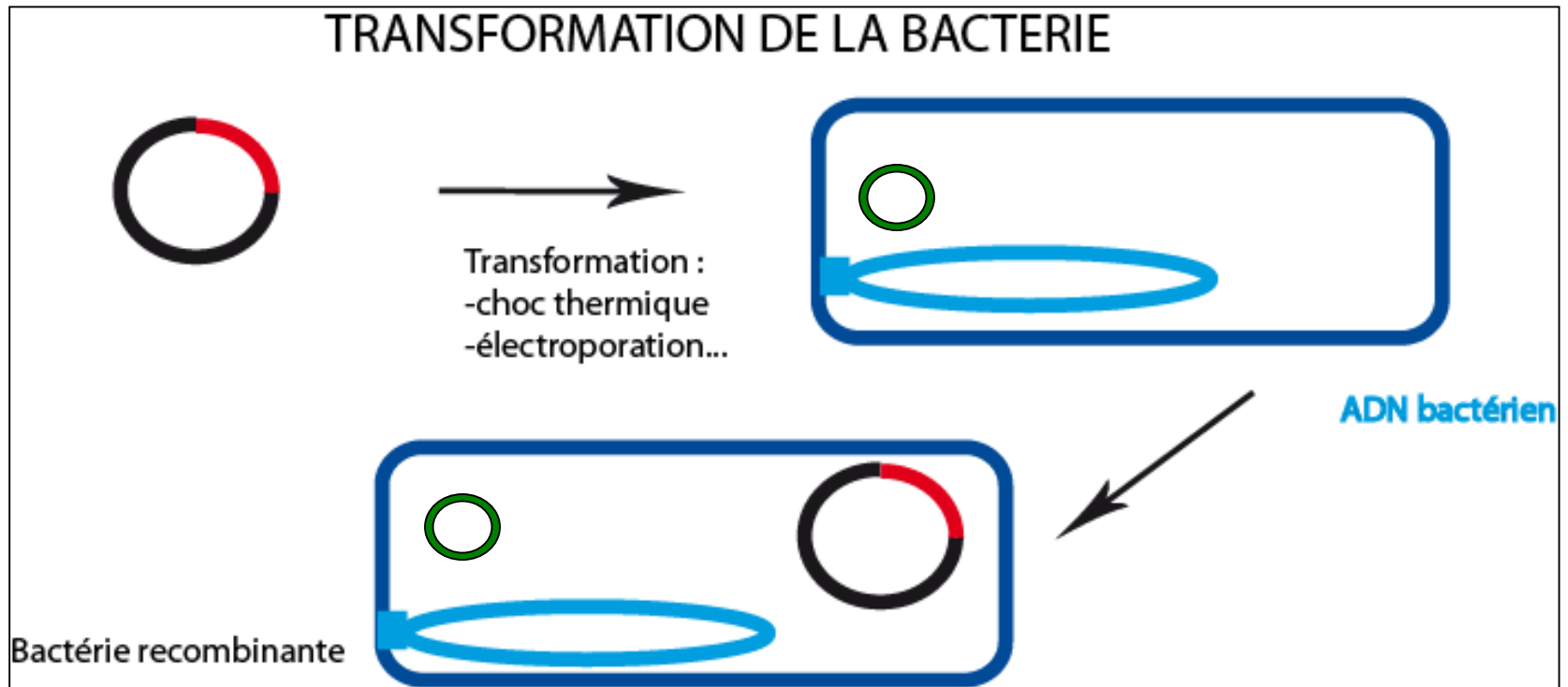
# Production dans *E. coli*

## Outils : sites de restriction



# Production dans *E. coli*

## Outils : Gènes de résistance aux antibiotiques



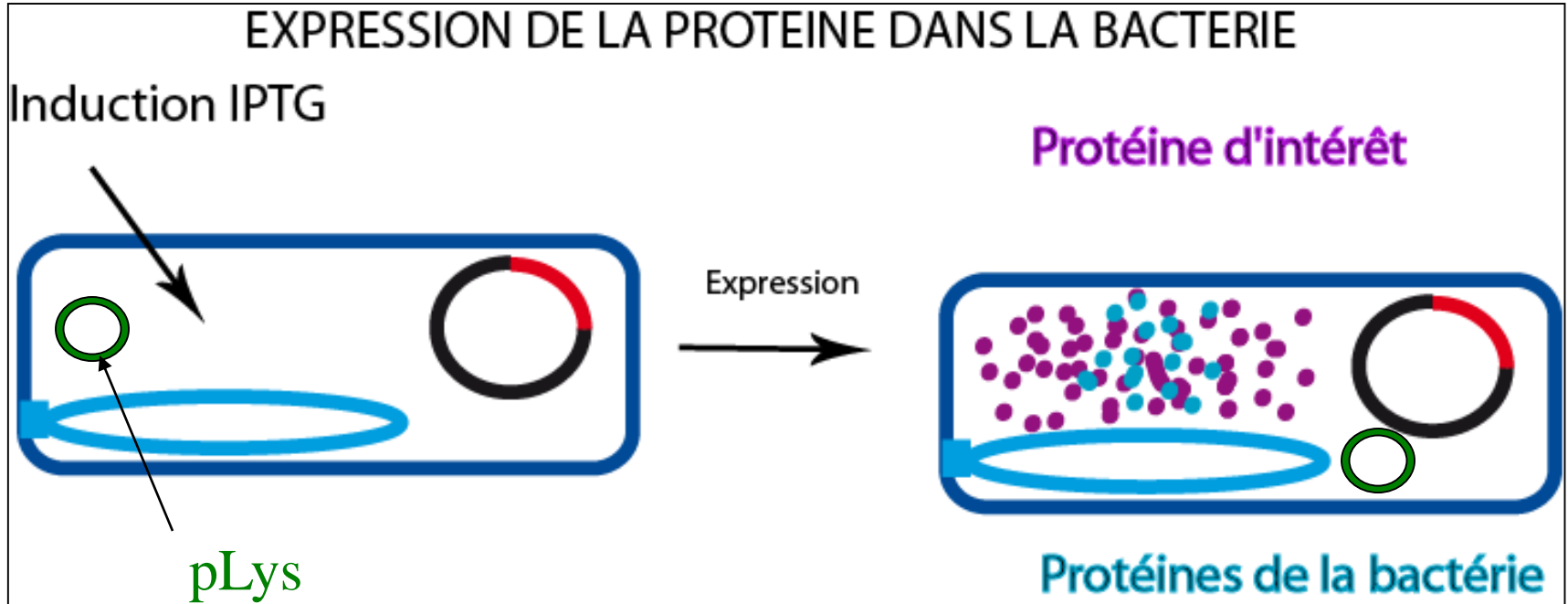


# La production



# Production dans *E. coli*

Outils : Opéron Lac, IPTG, pLys



# Production dans *E. coli*

## Outils : Opéron Lac, IPTG, pLys

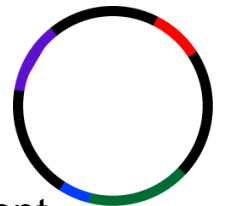
Protéine répresseur du gène Lac



ADN bactérie



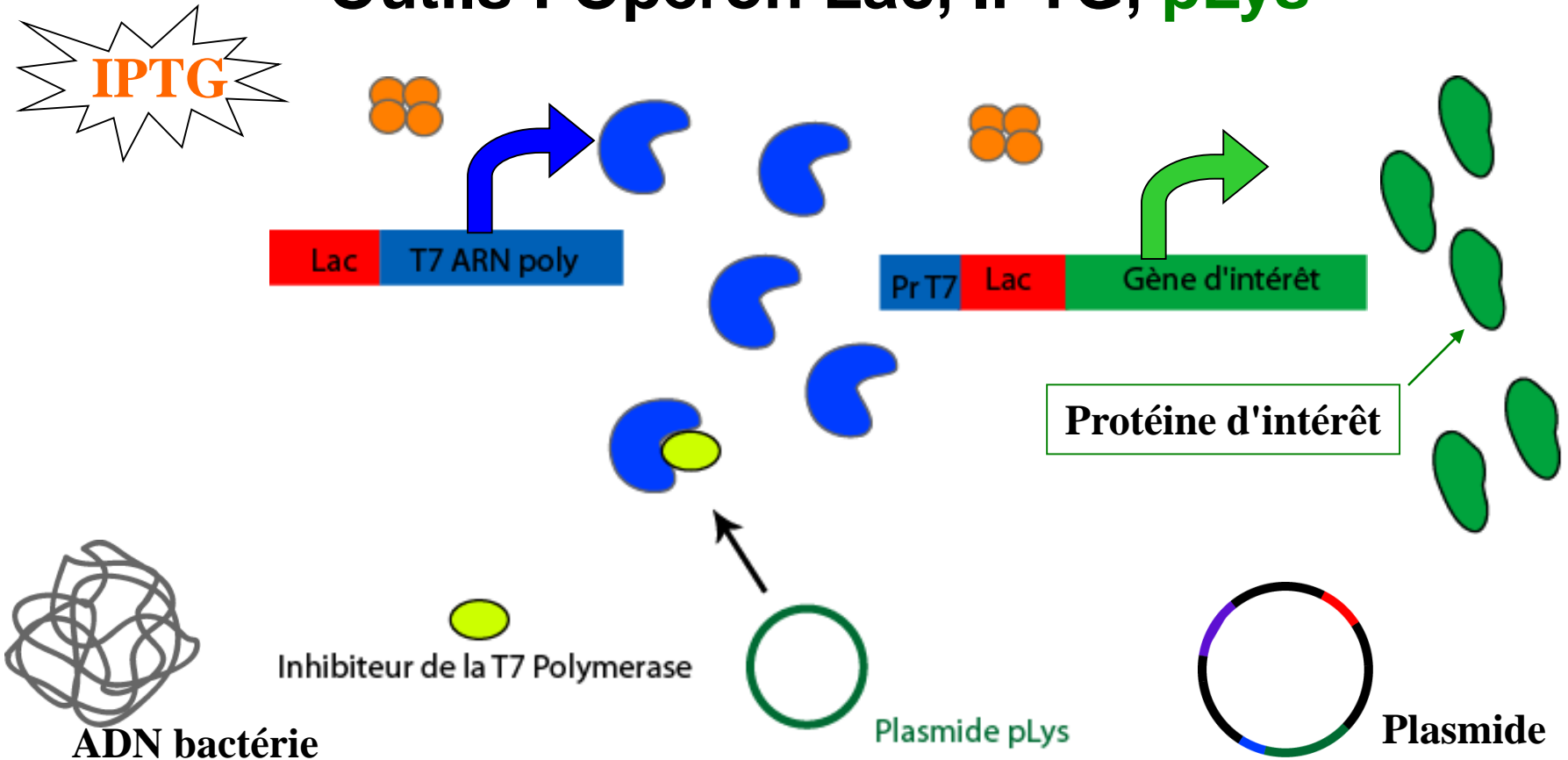
Plasmide pLys



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, O<sub>2</sub>, agitation.

Fermenteur de 4 litres

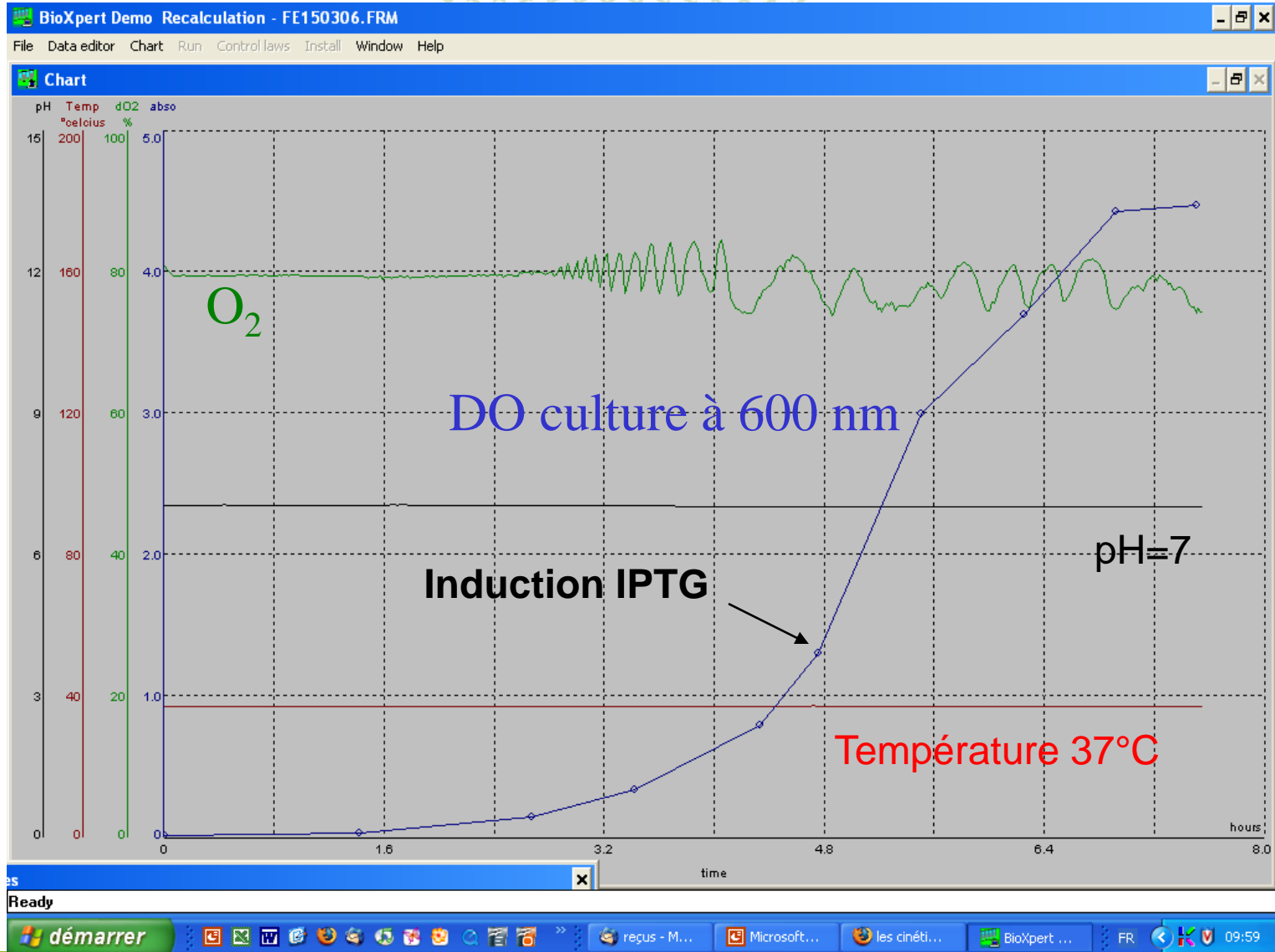


# Production dans *E. coli*

- 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



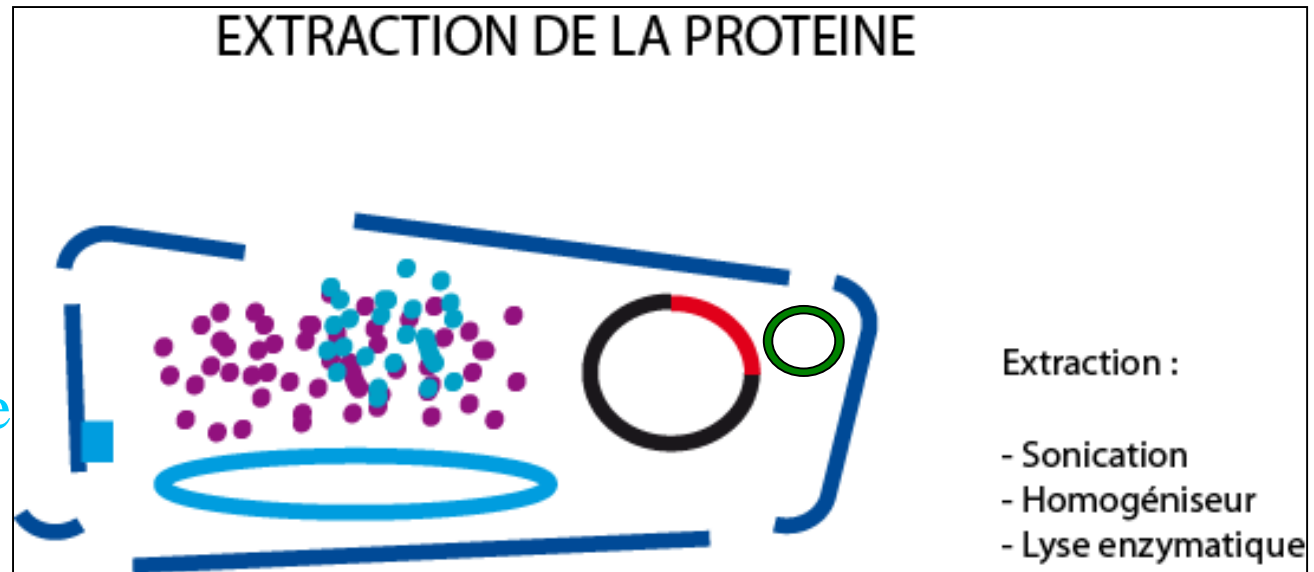
# Extraction et purification





# 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**
- **Systeme 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*

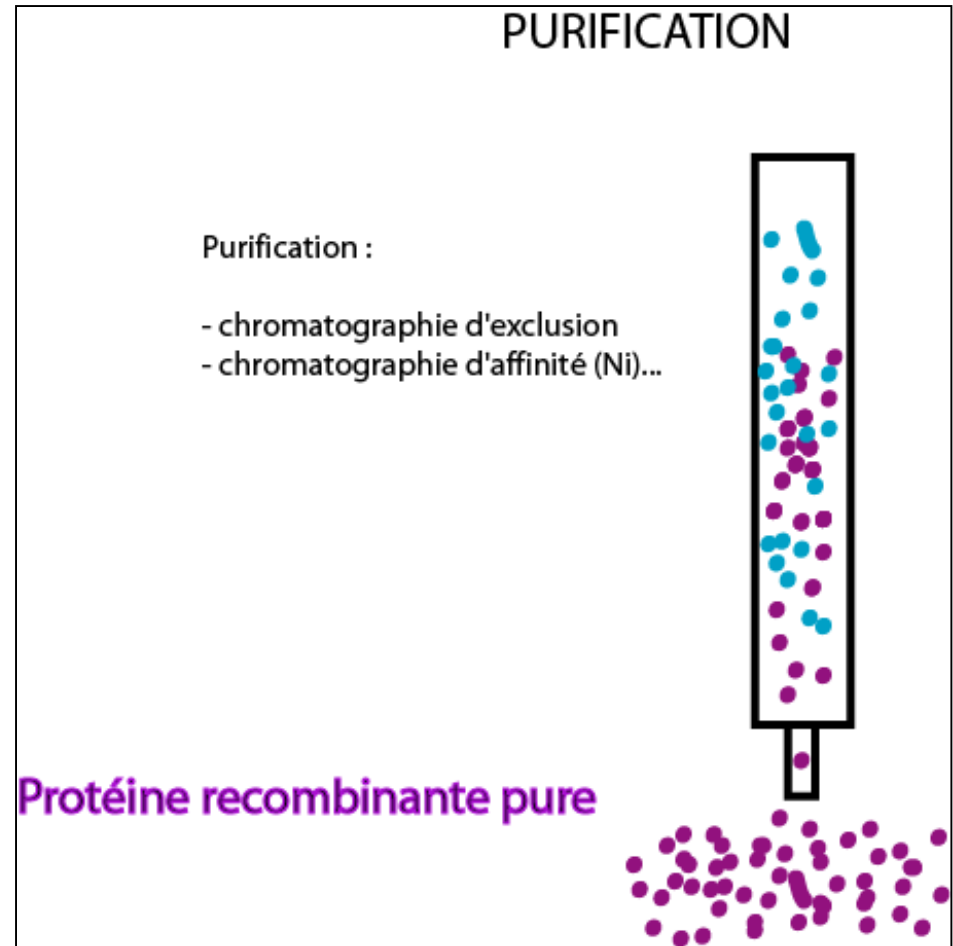
## Intérêts du Tag

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



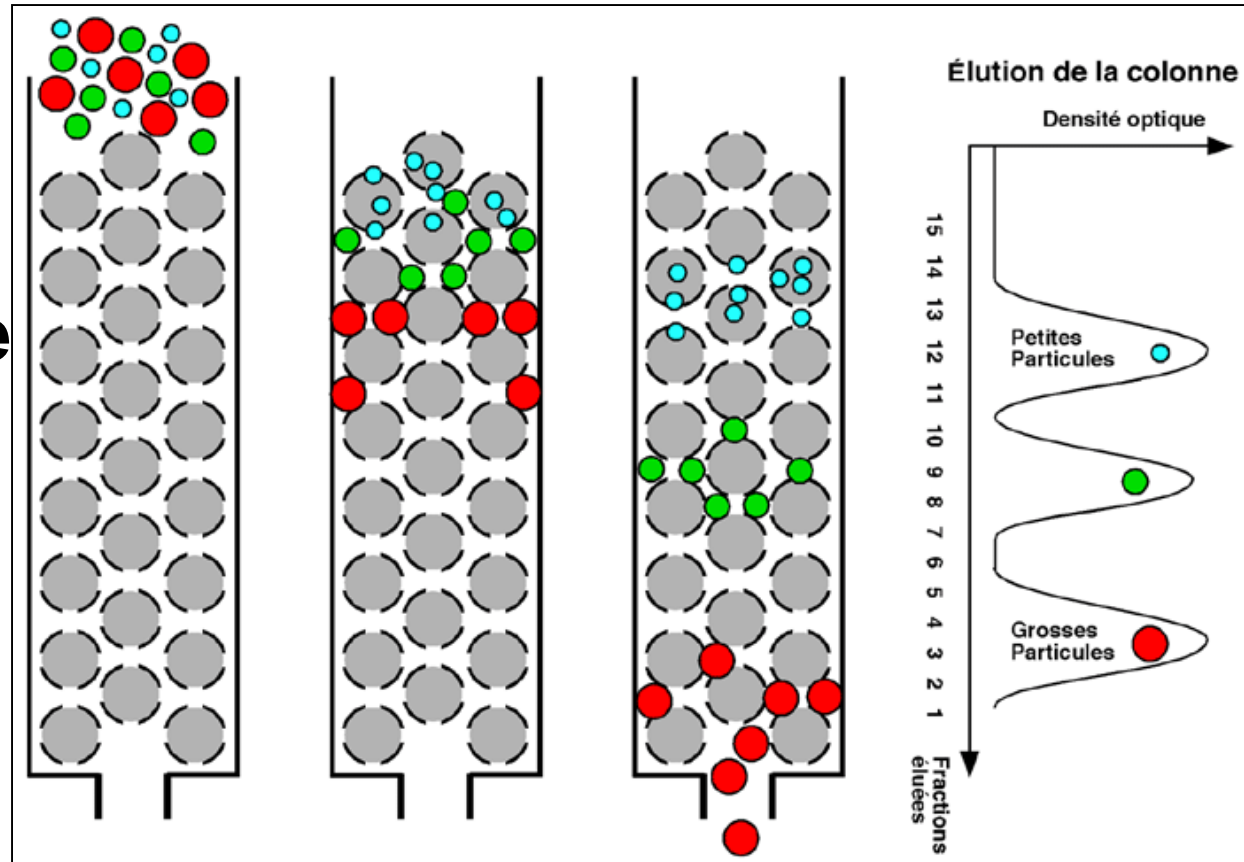
# Production dans *E. coli*

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



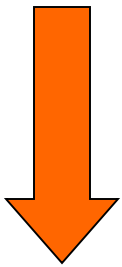
# Production dans *E. coli*

## Chromatographie d'exclusion

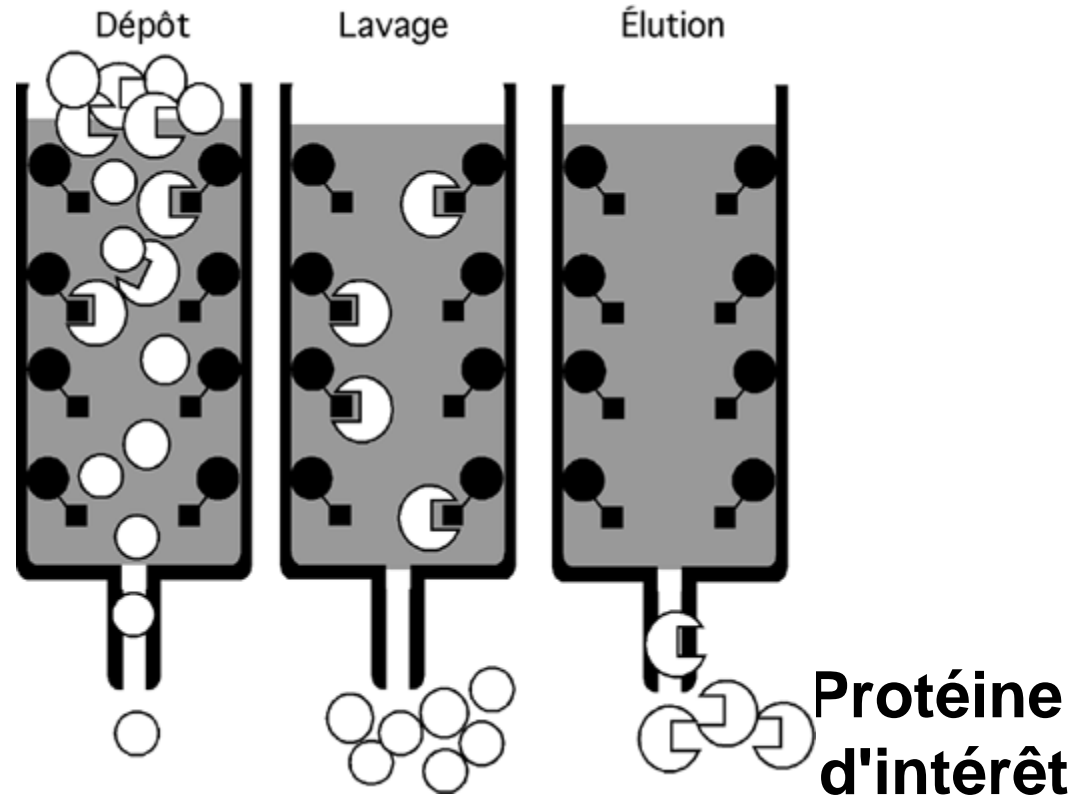


# Production dans *E. coli*

## Chromatographie d'affinité électrostatique



$\text{Ni}^{2+}$  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