HAL
open science

Production de protéines recombinantes

Laurent Marche

To cite this version:

Laurent Marche. Production de protéines recombinantes : Cours CNAM / Agrocampus DEST Sciences et techniques du vivant. MASTER Sciences etTechniques des productions Agricoles (Production de protéines recombinantes), 2006, 72 p. hal-02819106

HAL Id: hal-02819106

https://hal.inrae.fr/hal-02819106

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

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

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

CNAM / Agrocampus
DEST Sciences et techniques du vivant

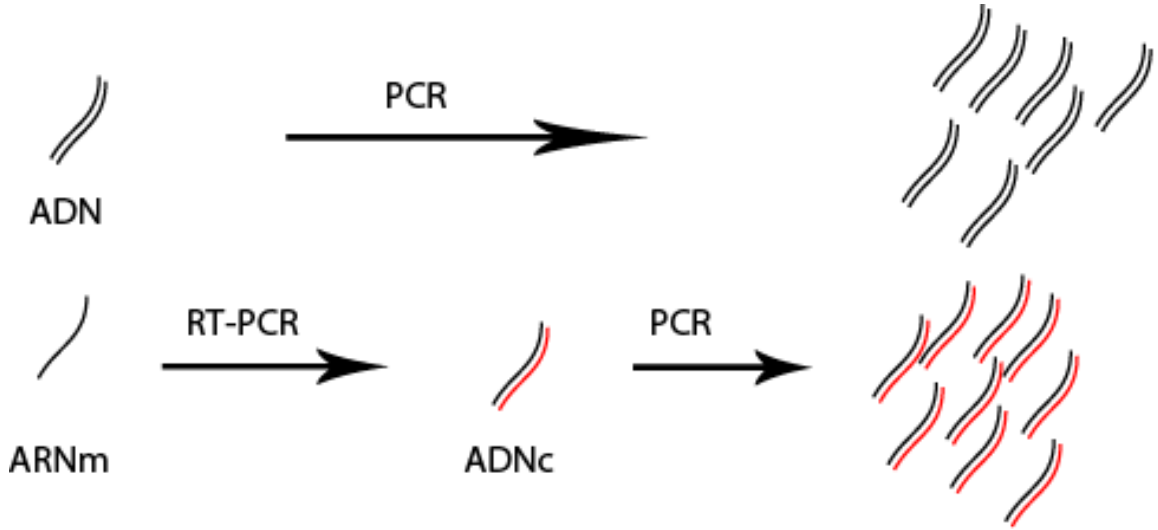
Introduction

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**

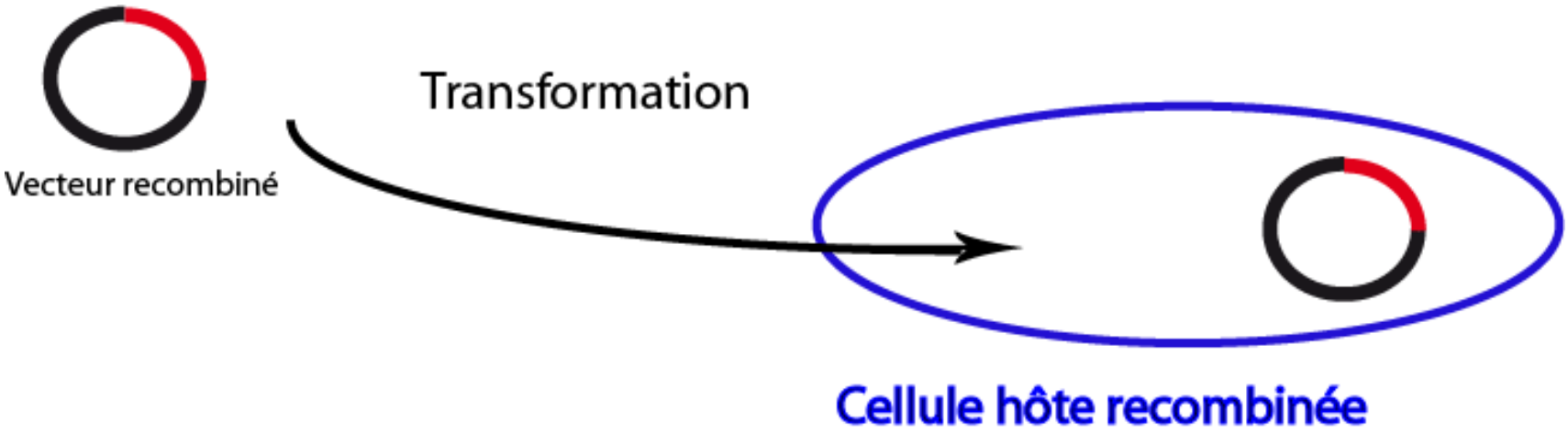


Les étapes de la production

- **Insertion dans un vecteur**

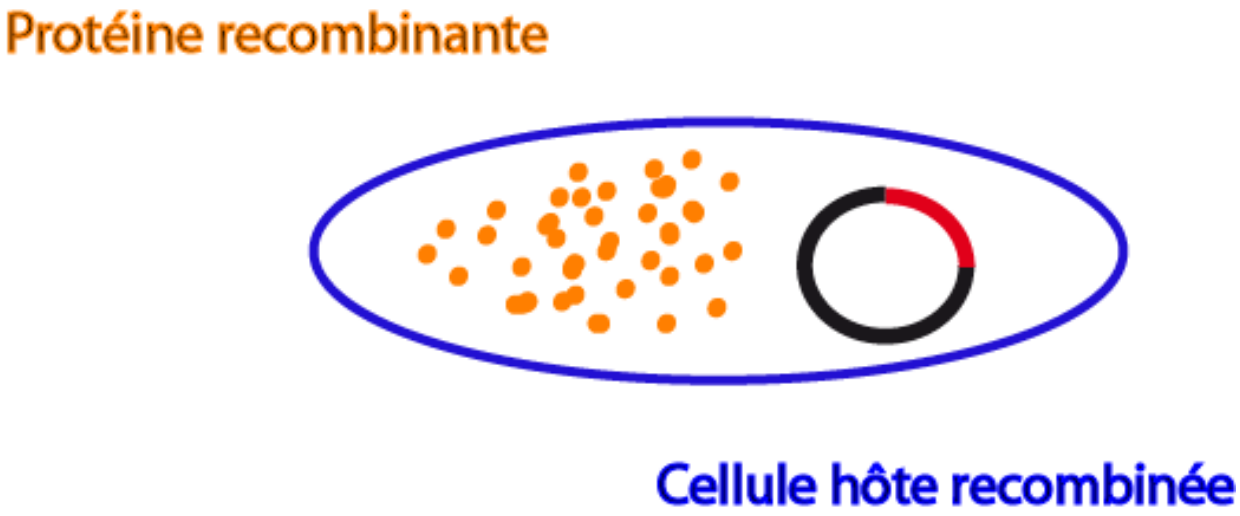
Les étapes de la production

- **Transfert dans l'organisme receveur**



Les étapes de la production

- **Production**



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

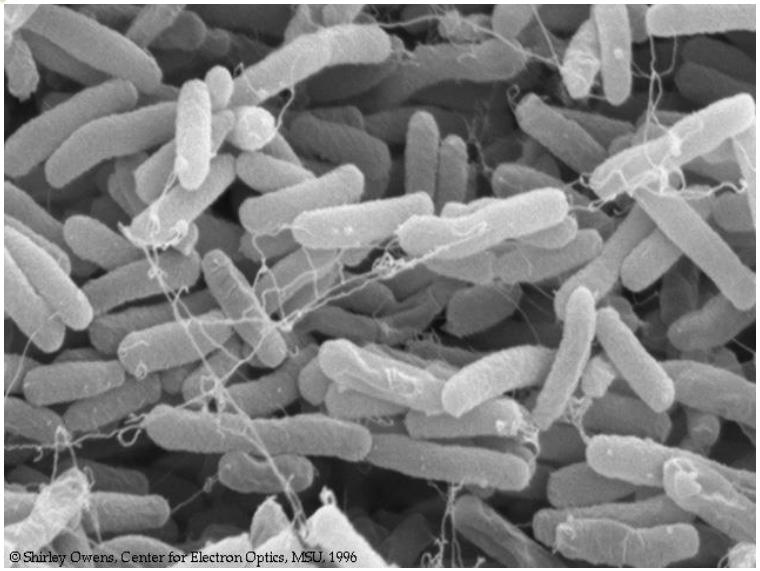
Procaryotes

- ***Bactéries***

Eucaryotes

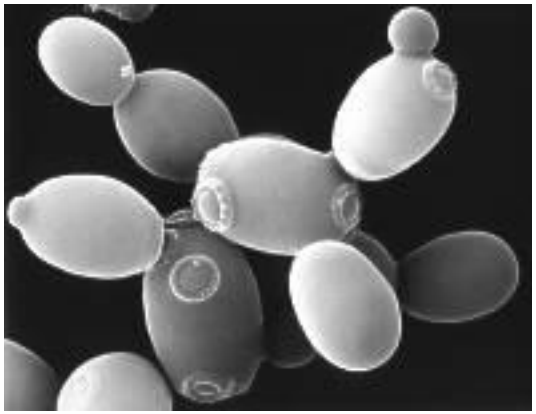
- **Levures**
- **Cellules d'insectes / baculovirus**
- **Cellules de mammifères**
- **Champignon**
- **Plantes et animaux transgéniques**

Bactéries



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…**

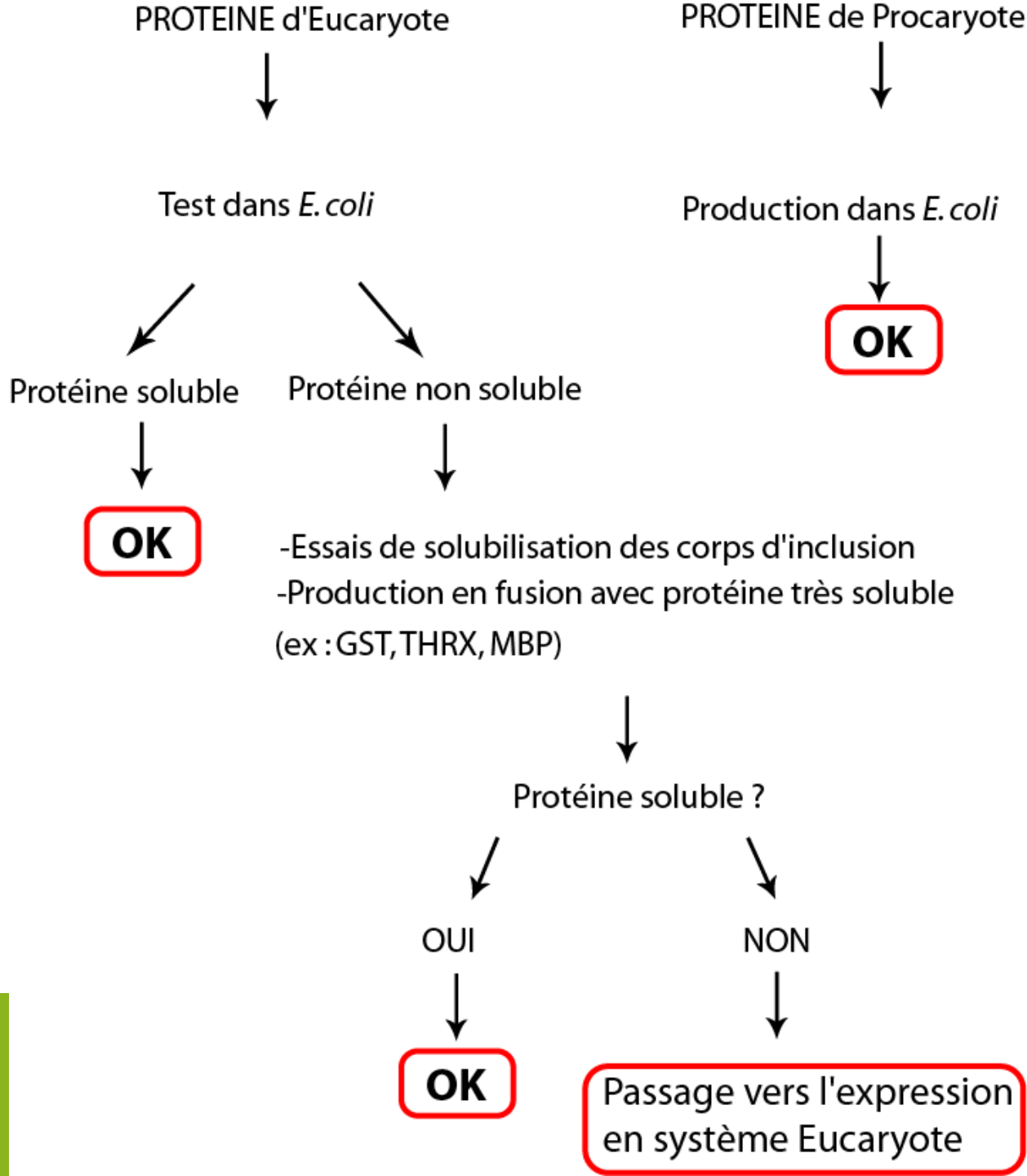
Choix du sytème d'expression

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*

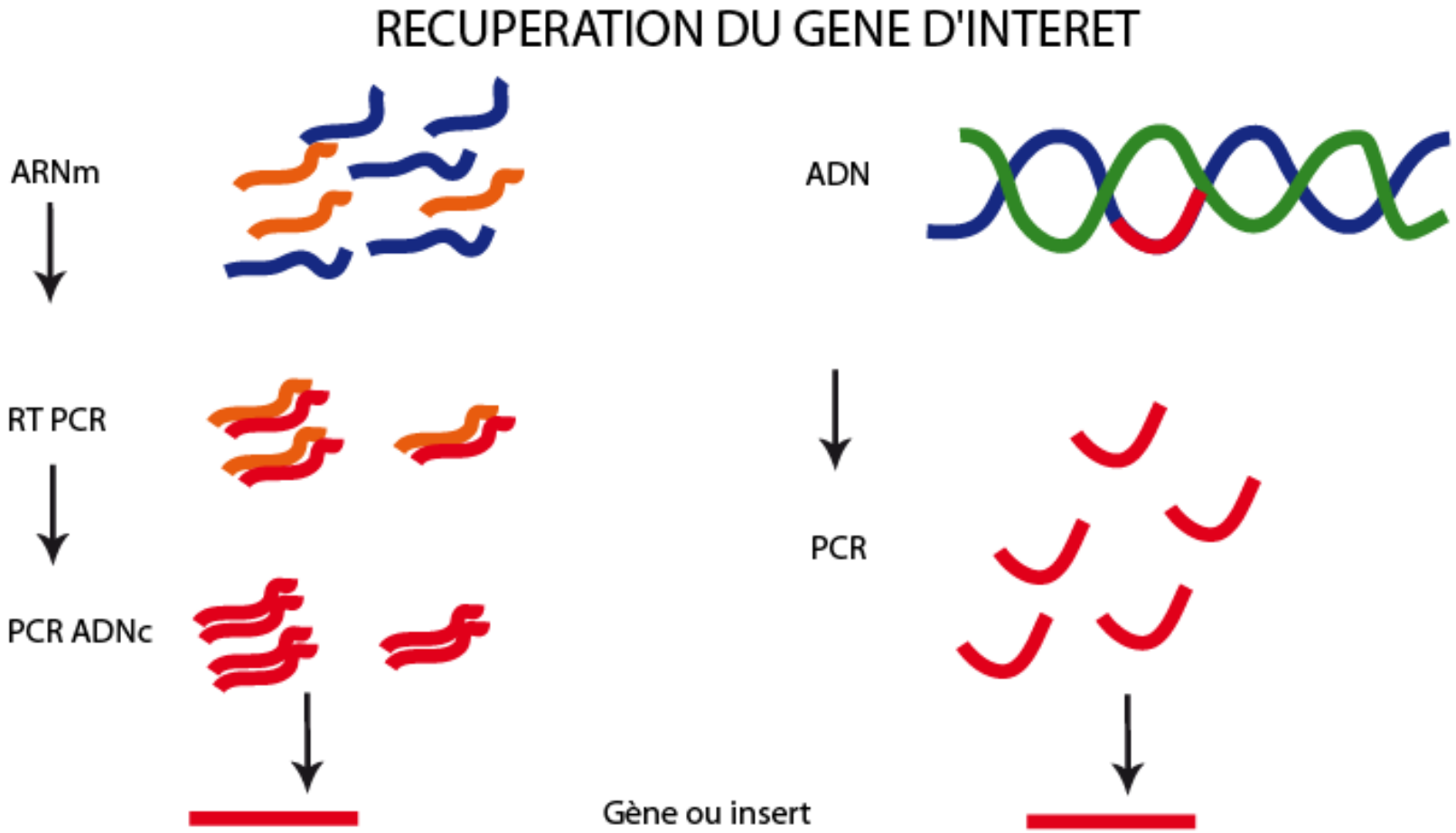
CNAM / Agrocampus
DEST Sciences et techniques du vivant

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

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*



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)

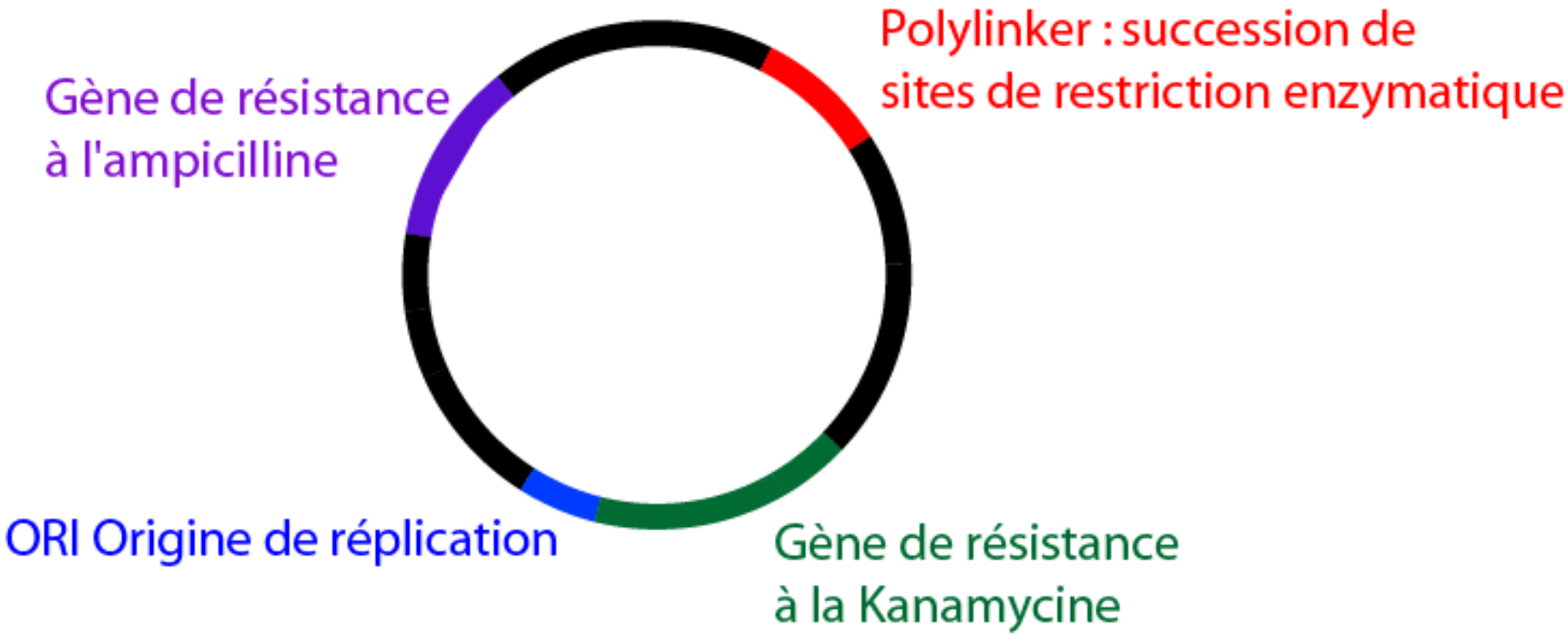
Les vecteurs

- 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

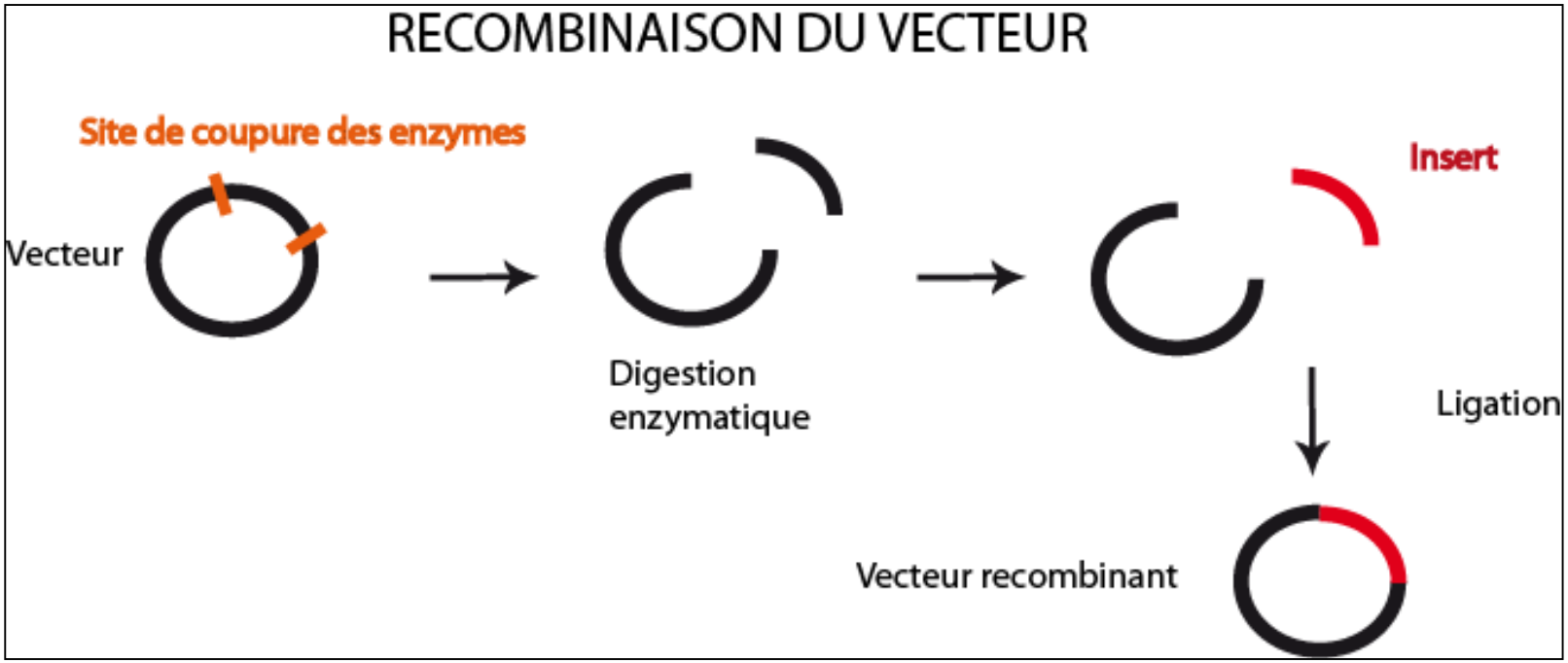
Le clonage

CNAM / Agrocampus
DEST Sciences et techniques du vivant

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

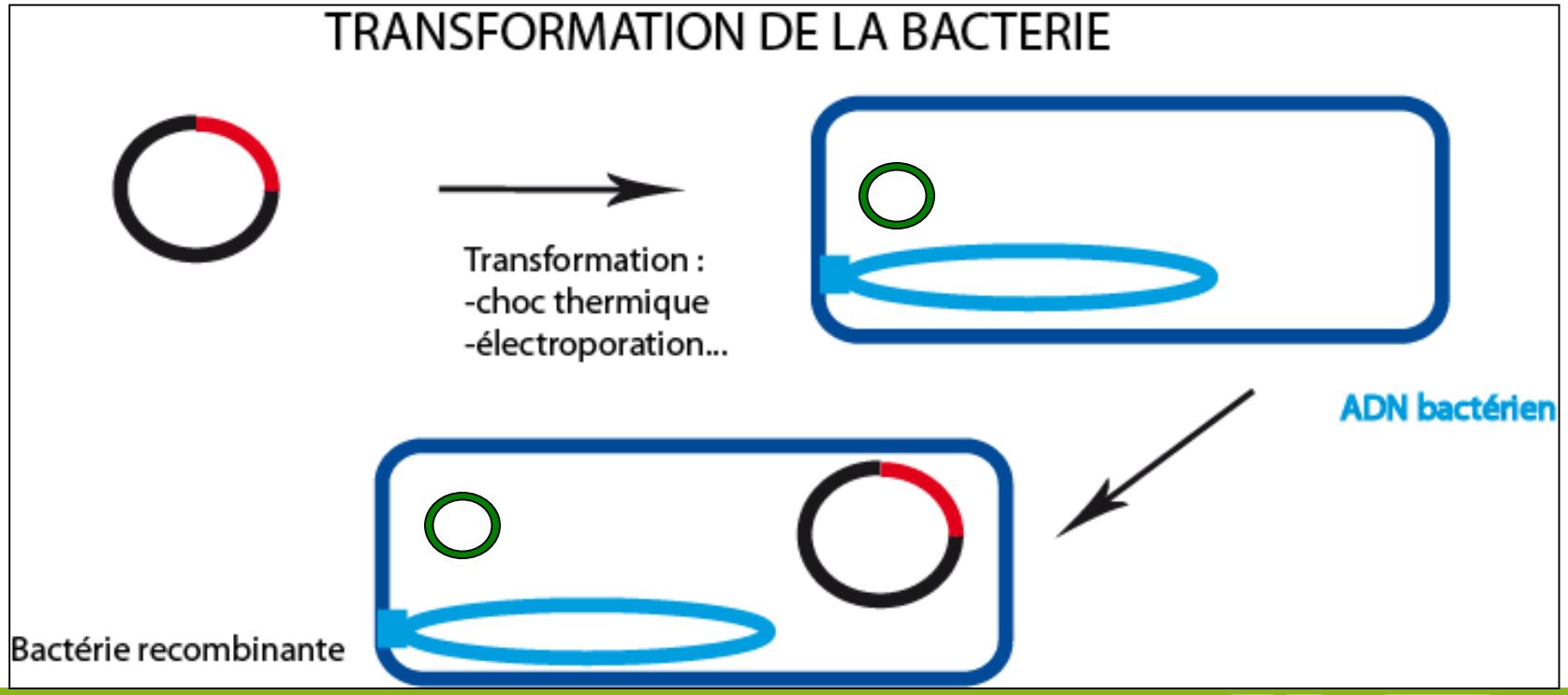
Production dans *E. coli*

Outils : sites de restriction



Production dans *E. coli*

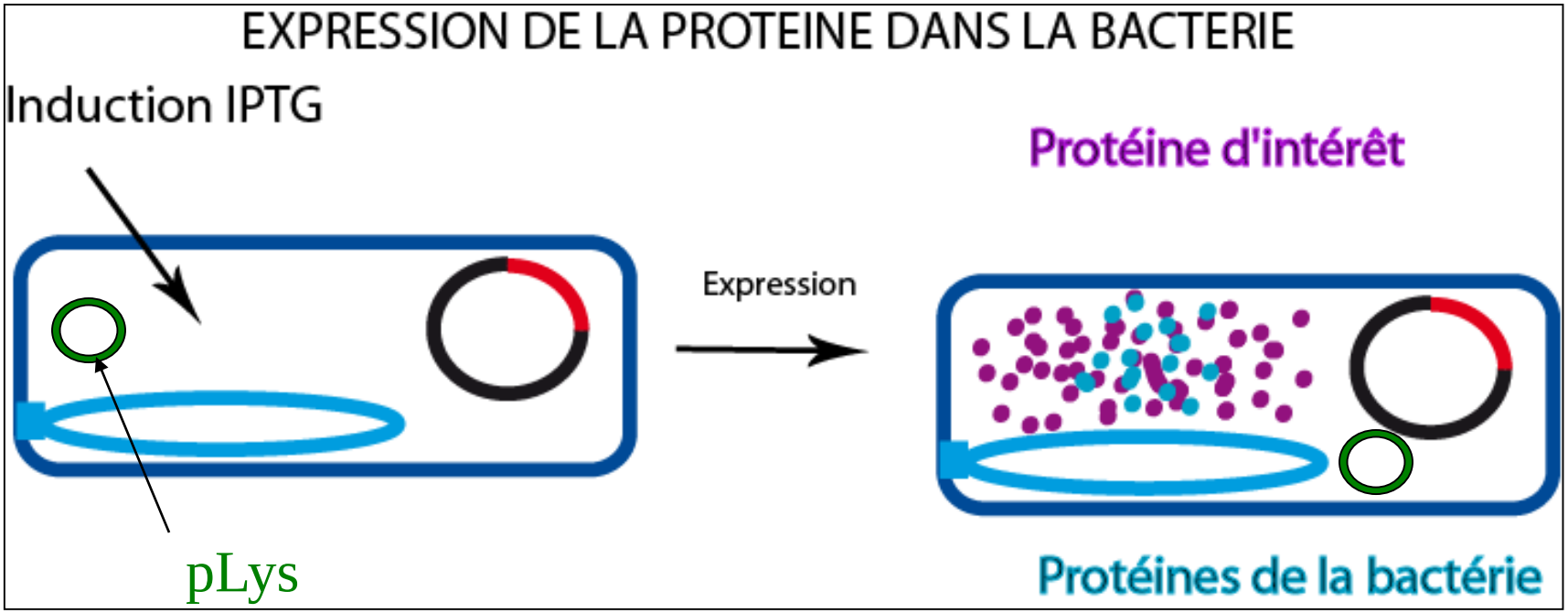
Outils : Gènes de résistance aux antibiotiques



La production

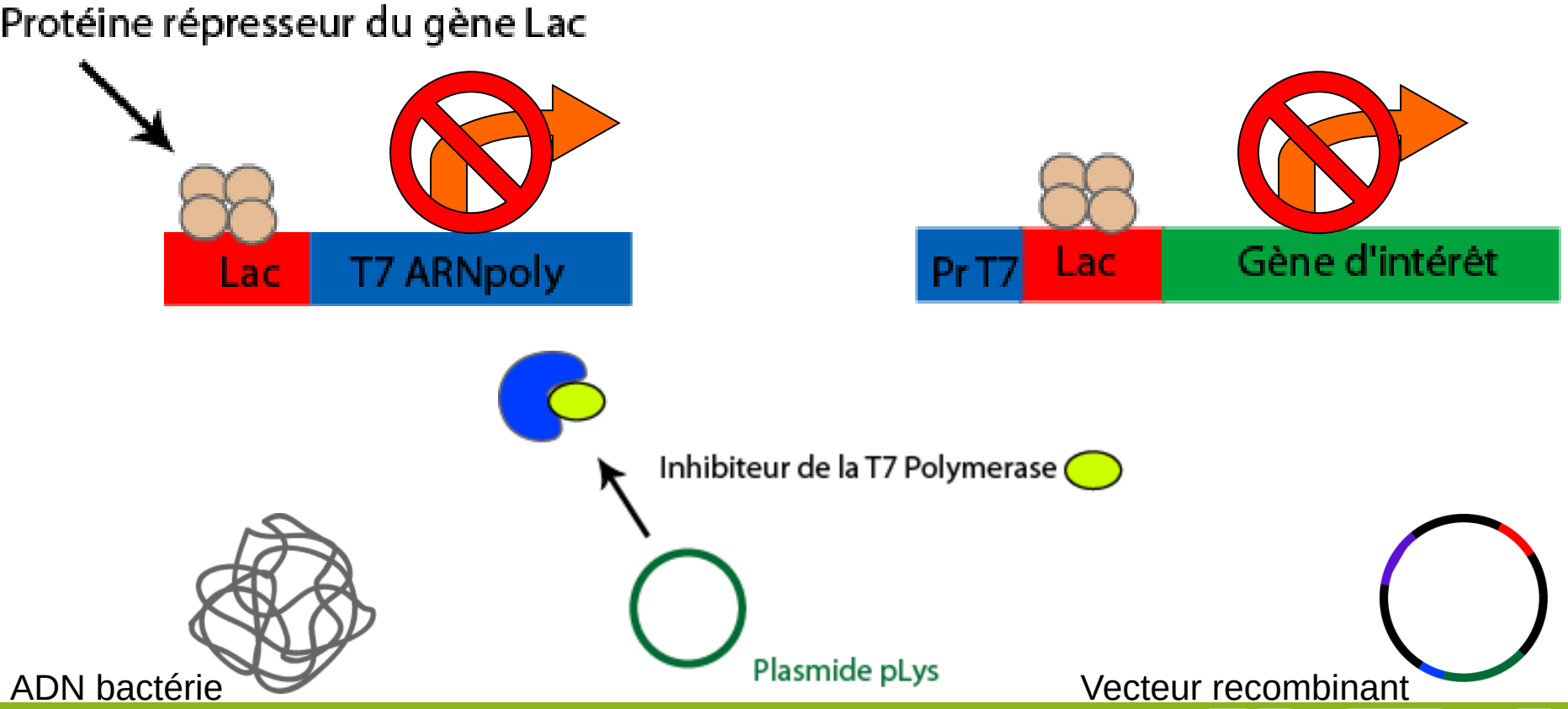
Production dans *E. coli*

Outils : Opéron Lac, IPTG, pLys



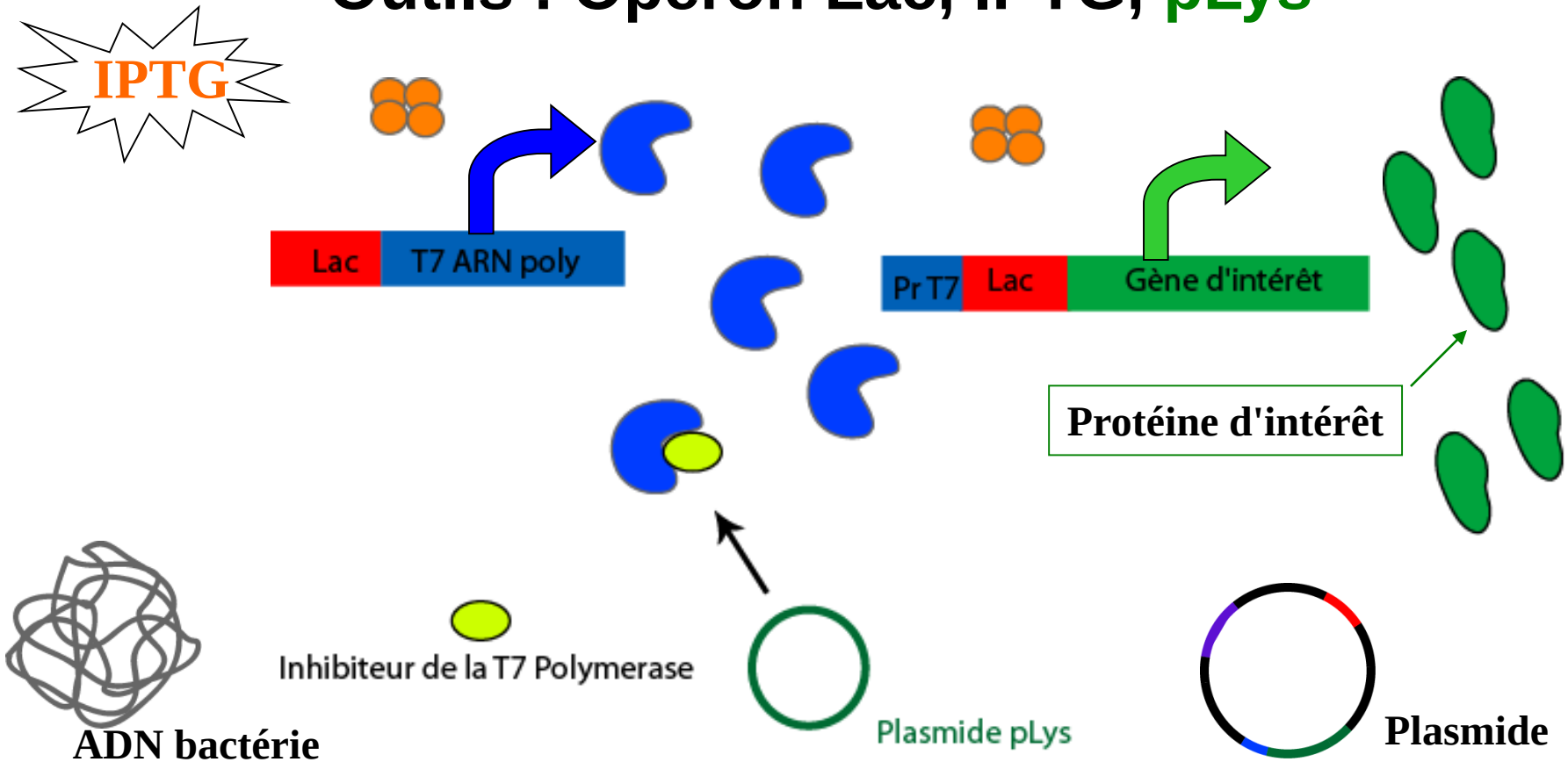
Production dans *E. coli*

Outils : Opéron Lac, IPTG, pLys



Production dans *E. coli*

Outils : Opéron Lac, IPTG, pLys



Production dans *E. coli*

•En Erlens : tests et production de 1 à 2 litres

Conditions contrôlées minimales (température, agitation).

•En Fermenteur : Conditions contrôlées plus importantes

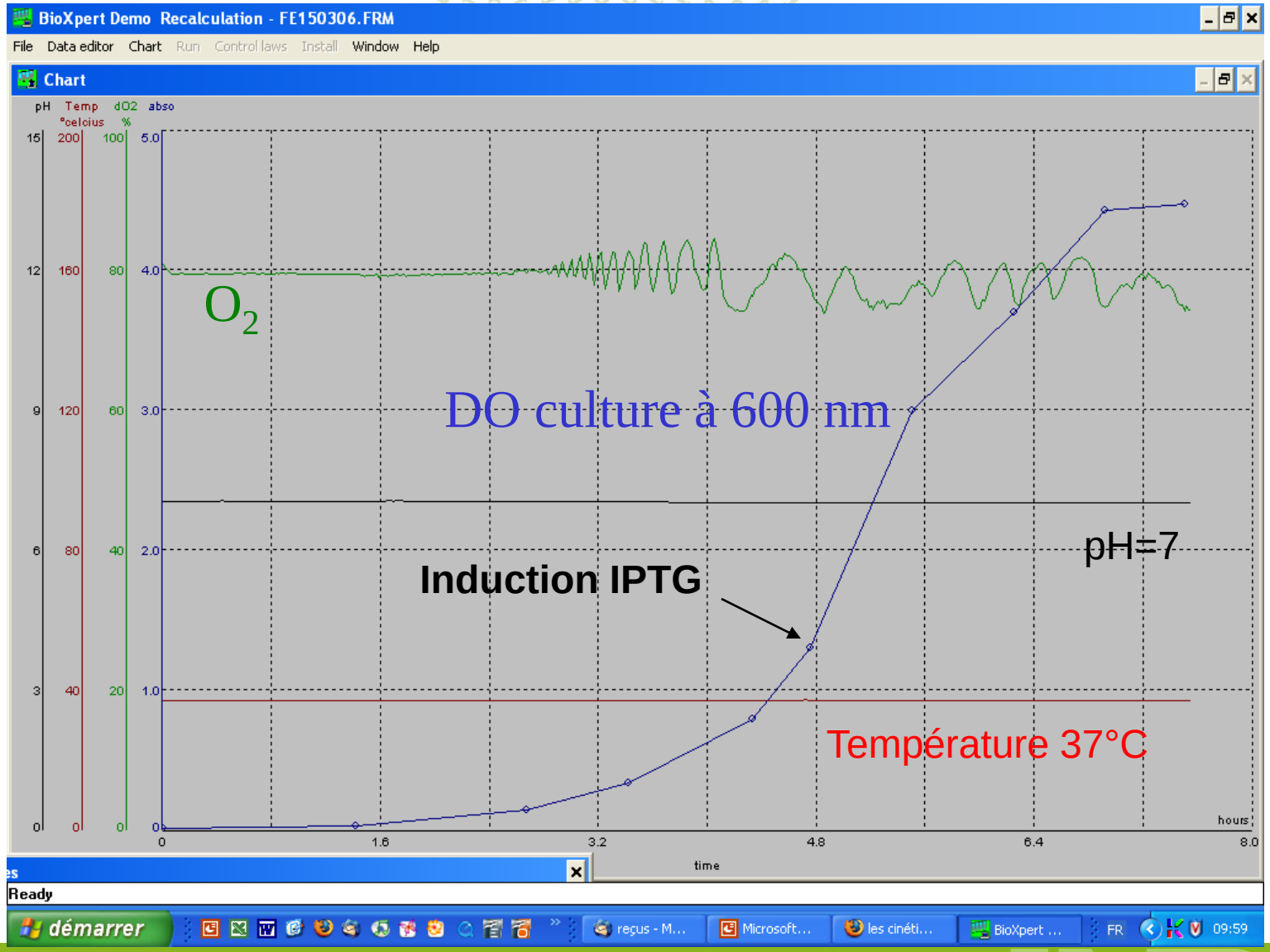
Température, pH, O_2, agitation.

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


BioXpert Demo Recalculation - FE150306.FRM
File Data editor Chart Run Control laws Install Window Help
Chart
pH Temp dO2 abso
°celcius %
O2
DO culture à 600 nm
pH=7
Induction IPTG
Température 37°C
hours
time
Ready
démarrer
reçus - M...
Microsoft...
les cinéti...
BioXpert ...
FR
09:59

Extraction et purification

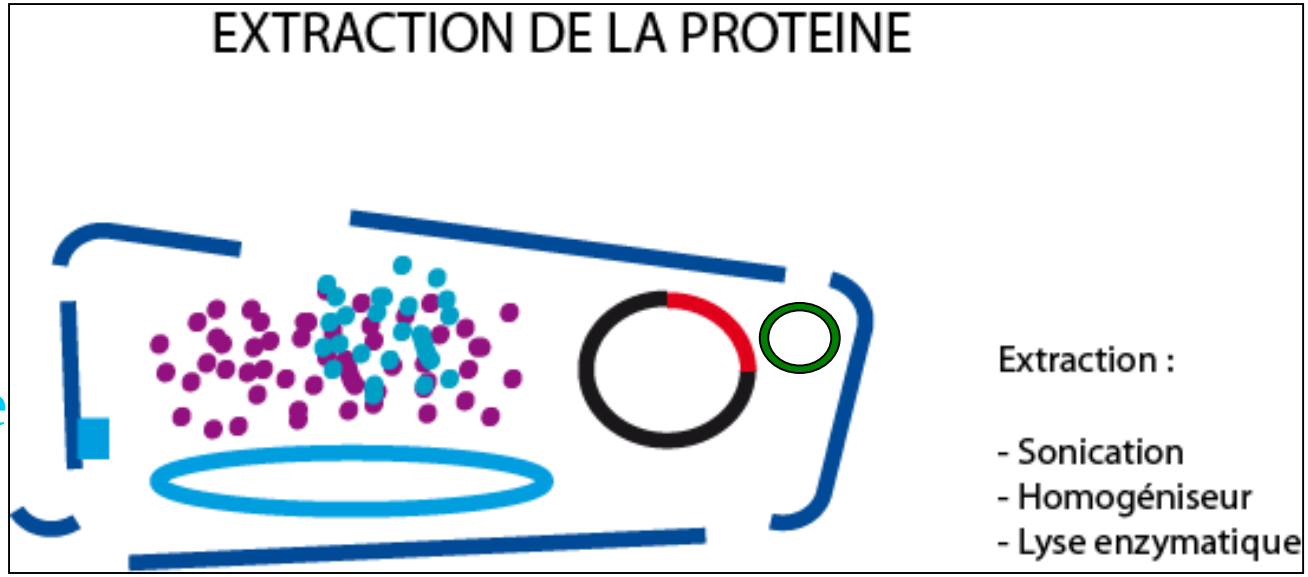
CNAM / Agrocampus
DEST Sciences et techniques du vivant

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

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.

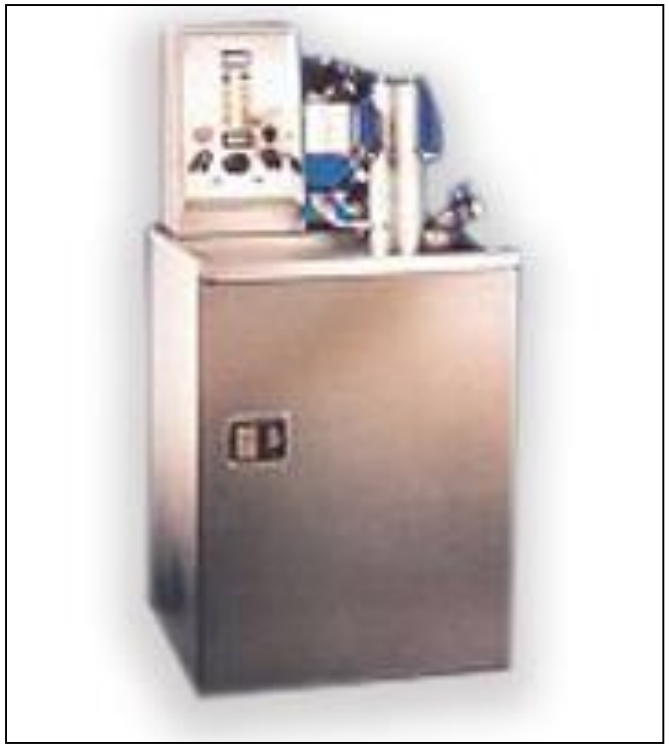
Production dans *E. coli*

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*



Homogéniseur

- **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*

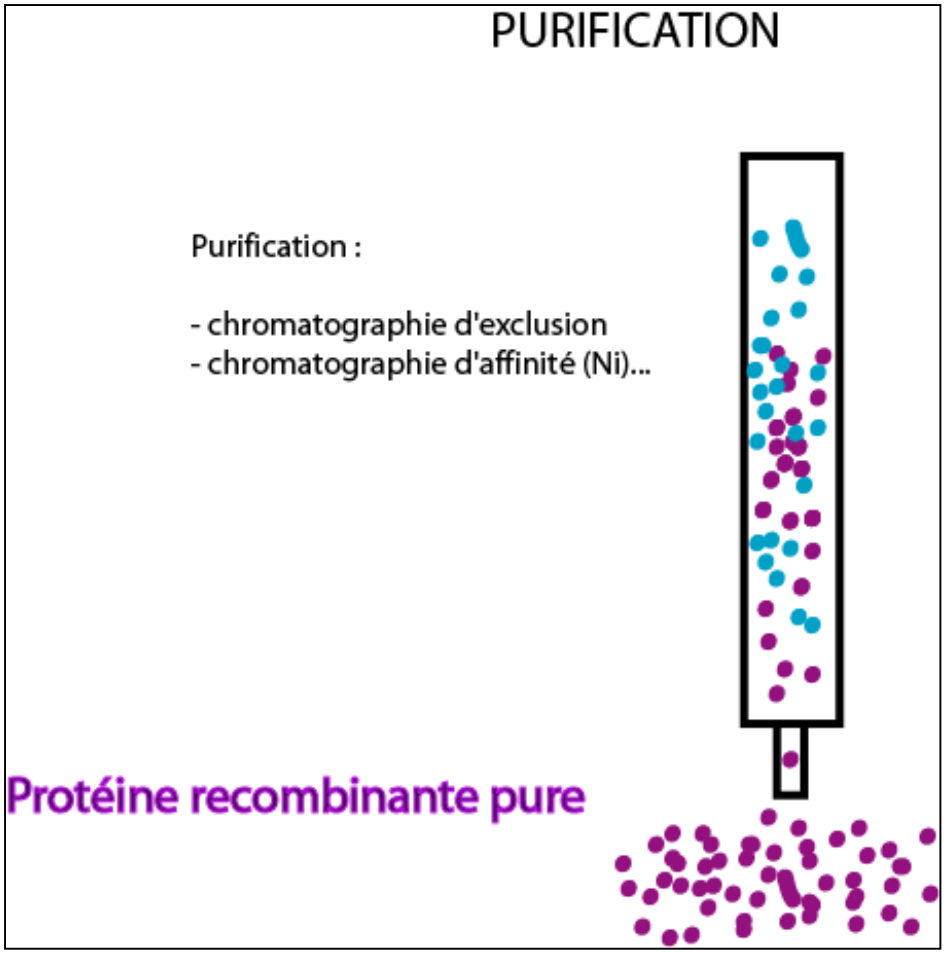
Intérêts du Tag

- Séparation de la protéine d'intérêt des autres constituants

- En C-ter permet de s'assurer de l'intégrité de la protéine

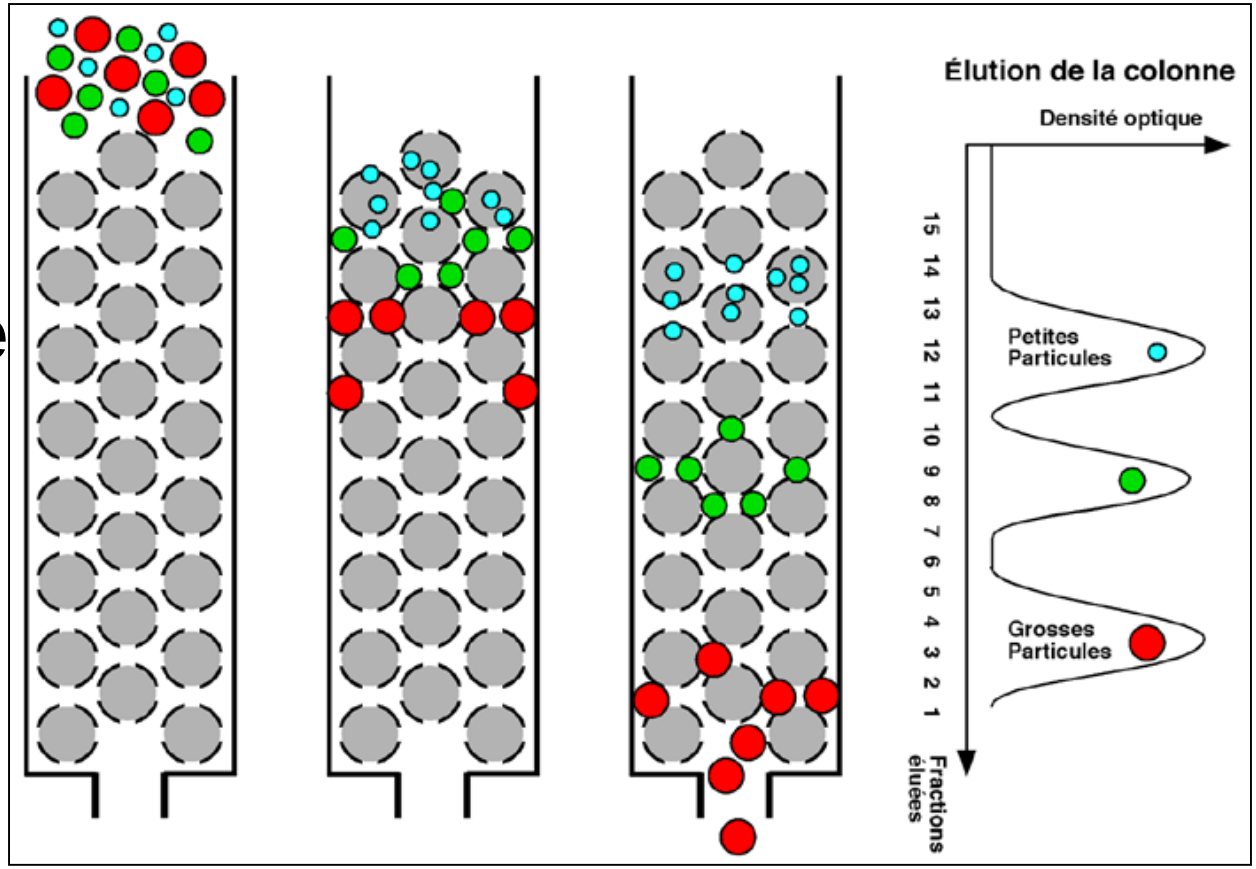
Production dans *E. coli*

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



Production dans *E. coli*

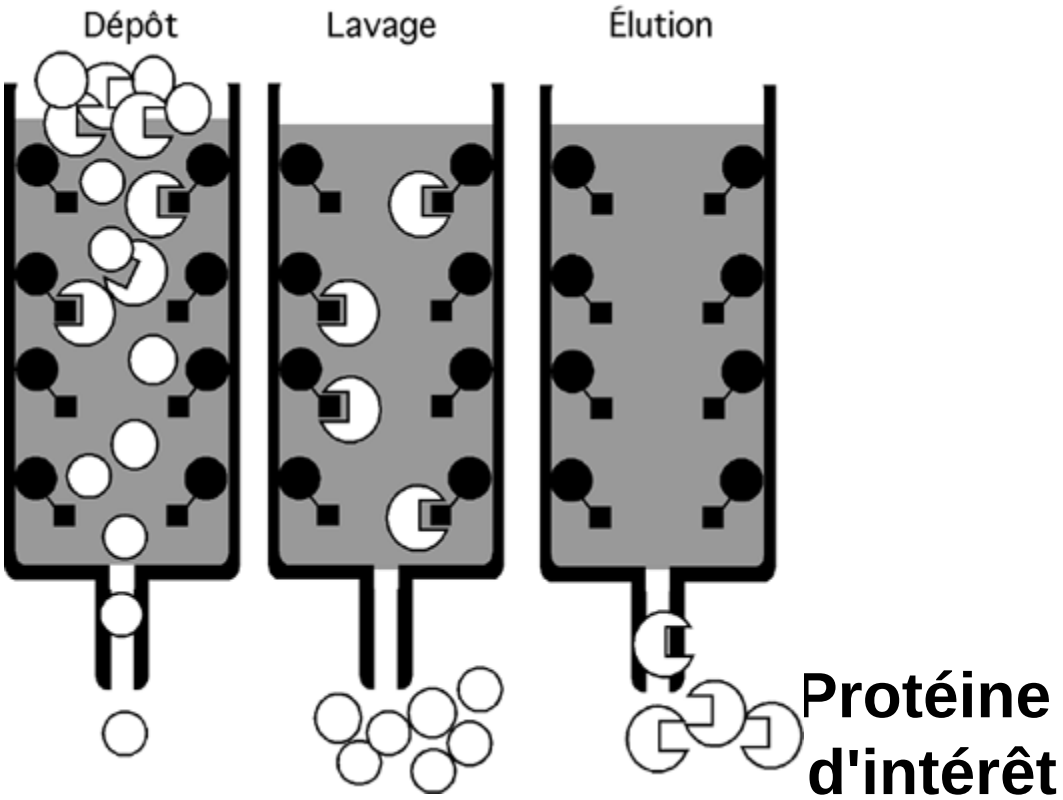
Chromatographie d'exclusion



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

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

CNAM / Agrocampus
DEST Sciences et techniques du vivant