

Biologie Moléculaire et Génie Génétique

Chapitre VII : LE GENIE GENETIQUE ET LES BIOTECHNOLOGIES

Dr. SELKA SARRA

Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen

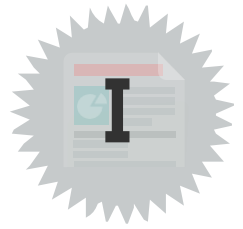
Faculté SNV-STU

Département de Biologie

Email: s.selka.sek@gmail.com

Chapitre VII :

LE GENIE GENETIQUE ET LES BIOTECHNOLOGIES



I. Introduction

Techniques de **l'ADN recombinant** « transfert de gènes d'un Organisme à un autre ». Deux applications importantes :

- **Production de protéines** biologiquement utiles (protéines utilisées comme médicaments, protéines utilisées en industrie ...)
- **Création** des (Vg^* , A^* , μO^*) ayant des caractéristiques **modifiées/ amélioré**.

II. Production de protéines recombinantes

1. Définition

Protéines produites par des cellules productrices qui sont modifiées génétiquement (**transgène**).

2. Objectif

Obtenir une grande quantité de protéine et pouvoir les purifier ; étude in vitro ; étude structurale ; usage médicale ; usage industriel.

- Transgène placé dans vecteur d'expression souvent sous le contrôle d'un promoteur inductible.
- Choix du système d'expression dépend de la quantité et de la qualité des protéines que l'on souhaite produire (Système d'expression hétérologue).

3. Expression des protéines recombinantes

- Nécessite l'utilisation de vecteurs spécialisés **vecteurs d'expression** (séquences d'ADN signaux qui gouvernent la transcription et la traduction de la séquence par la cellule hôte)
- La technologie de l'ADN recombinant permet de produire des formes variantes de protéines naturelles : **Génie de protéines**.

- Systèmes d'expression bactérien

- Les 1ers systèmes d'expression de protéines : **Bactérie** (*E. coli*) permet de produire des protéines rapidement et à faible coût.

- Cette bactérie a plusieurs propriétés intéressantes lui permettant d'être utilisée pour exprimer des protéines : elle est **facile à manipuler**, elle **pousse vite** dans des milieux relativement peu chers et les **souches** de laboratoires sont **inoffensives**.

Pour exprimer un gène dans *E. coli*, il doit être inséré dans un vecteur qui contient plusieurs éléments :

1) Une origine de réplication.

2) Un promoteur : si possible contrôlable, dont l'induction produira une grande quantité d'ARNm à partir du gène cloné.

3) les séquences responsables de la traduction.

- Systèmes d'expression eucaryotes

- Bien que de nombreuses protéines eucaryotes puissent être exprimés avec succès dans des systèmes bactériens, **certaines protéines exprimées sont instables ou biologiquement inactives.**

- Des systèmes d'expression eucaryotes ont été développés : **produire des versions de protéines ressemblant davantage à la forme native.**

Plusieurs levures sont utilisées pour exprimer les protéines recombinantes ; les plus souvent utilisées sont *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactus* et *Pichia pastoris*.

Le premier vaccin produit par la technique de l'ADN recombinant pour une utilisation chez l'homme (antigène de surface de l'hépatite B) a été créé par expression chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Avantages :

Les levures sont capables de proliférer rapidement et dans un milieu de culture simple, peu coûteux, en absence de facteurs de croissance d'origine animale.

- S'adaptant bien à la culture en masse, les fermentations produisent en général une haute densité cellulaire et le taux d'expression de la protéine hétérologue est généralement voisin de la centaine de milligrammes par litre.
- Les levures offrent également l'avantage d'avoir un matériel génétique simple et de n'être ni pyrogènes, ni pathogènes et constituent ainsi un organisme de choix pour la production de protéines à visée thérapeutique.

Inconvénients :

- Les protéines synthétisées sont souvent obtenues à l'intérieur du cytoplasme et nécessitent de lyser la cellule afin de les récupérer.
- La sécrétion des protéines hétérologues fonctionne très bien pour de petits polypeptides comme l'insuline, mais les résultats sont moins probants pour les protéines de masse moléculaire élevée, bien que la sécrétion et la maturation puissent être améliorées par adjonction de signaux spécifiques.

III. Le génie génétique dans l'industrie pharmaceutique

Techniques utilisées pour synthétiser une protéine

- Obtention de l'ADNc
- Expression de l'ADNc

1^{ères} expériences : une grande déception (clonage d'un gène eucaryote dans une Bactérie = réussite mais pas d'expression !)

- Nécessité des **signaux Bactériens** pour exprimer un gène eucaryote dans une Bactérie.

Exemples de synthèses de protéines

1- Médicaments Ex l'insuline

Insuline = 1^{ère} protéine obtenue par les techniques du Génie Génétique

Insuline : Hormone synthétisée par le pancréas, et qui fait défaut dans certains types de diabète.

Les insulines bovines et porcines ont une formule voisine de l'insuline humaine ils peuvent être utilisés comme médicaments par extraction du pancréas du bœuf ou le porc et purification.

Actuellement, 2 procédés pour l'insuline humaine :

- **Insuline semi synthétique** : « insuline humanisée »

Substitution de l'ala porcine (COOHt) de la chaîne B par la thr (transpeptidation)

- **Insuline humaine par les techniques du Génie Génétique.**

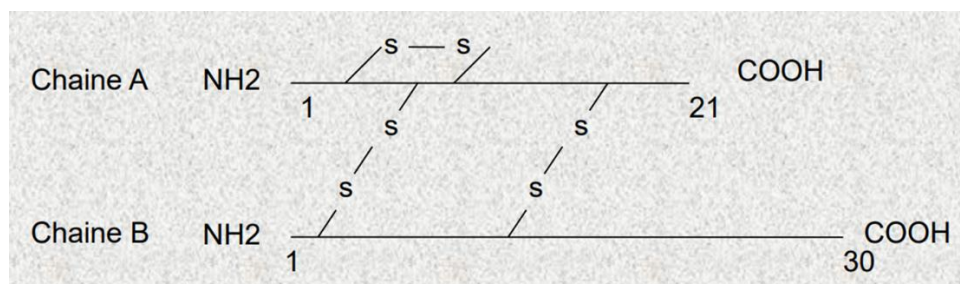


Fig.1 Structure de l'insuline

Synthèse de l'insuline humaine par E. coli

L'insuline est une hormone peptidique constituée de 2 chaînes (A) et (B) reliées par des ponts disulfures et formées à partir de la proinsuline par clivage d'une partie de la chaîne peptidique (fig.1).

Utilisée pour le traitement des diabètes insulino-dépendants, elle fut tout d'abord extraite du bœuf (3 a.a différents avec l'insuline humaine) puis du porc (1 a.a différent).

Le génie génétique a permis de produire de l'insuline humaine à partir de bactéries génétiquement modifiées. La stratégie expérimentale suivante a été utilisée :

- **Isolement du gène de l'insuline** : L'ARNm codant pour la proinsuline est isolé de cellules du pancréas. L'ADNc est obtenu par la reverse transcriptase, l'ADNc bicaténaire est obtenu par la polymérase.

- **Vecteur de clonage** : Le plasmide pBR322.

Le gène de résistance à la tétracycline contient un site de 6 bases reconnu par l'enzyme de restriction Bam HI. Il contient aussi un promoteur puissant.

- **Insertion dans le vecteur** : Le plasmide est ouvert au site Bam HI. L'ADNc codant pour la proinsuline est flanqué de 2 linkers (séquence d'ADN bicaténaire artificiellement ajoutée) pour avoir la séquence de nucléotides appropriée à la ligation (compatibilité). La ligation des 2 molécules d'ADN (vecteurs et ADNc) se fait par une ligase.

- **Hôte** : « cellule transformée » Le plasmide ainsi modifié est introduit dans une bactérie. La souche choisie est *E coli* K12 initialement sensible à la tétracycline et à l'ampicilline.

- **Sélection des clones**

- **Vérification de la production de proinsuline**

- **Modification et caractérisation du produit** : Les clones sélectionnés sont mis à cultiver à grande échelle.

Le produit obtenu est purifié puis converti en insuline par un mélange de trypsine et de carboxypeptidase B (enzymes protéolytiques).

L'insuline est ensuite analysée par HPLC et sa stéréochimie (disposition dans l'espace des atomes qui la constituent) vérifiée.

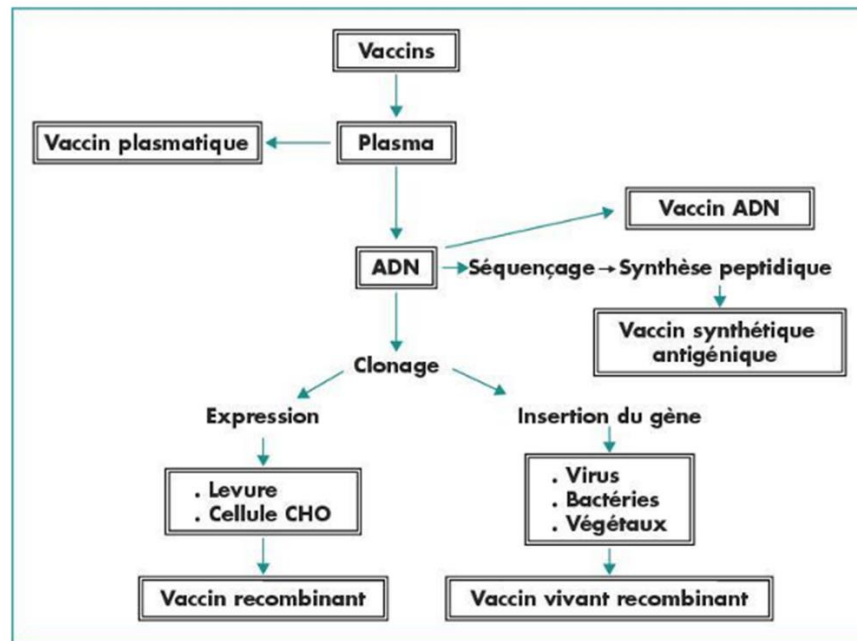
Enfin, des tests de toxicité et d'activité biologique sont effectués sur animal en mêmes temps que des études pharmacologiques et cliniques.

- **Expression de l'insuline humaine chez E coli** : Les deux chaînes d'insuline sont synthétisées séparément sous forme de protéines de fusion avec la B-galactosidase. Elles sont ensuite libérées par un traitement chimique puis mélangées.

L'insuline active est obtenue par une réaction d'oxydation chimique des cystéines. Actuellement l'insuline est produite en grande quantité par *E. coli* par une insertion de son gène dans un plasmide.

2- Production du vaccin contre le virus de l'hépatite B

Le vaccin contre le virus de l'hépatite B (VHB) est obtenu par génie génétique. Avec le schéma actuel comportant deux injections distantes de 1 mois d'intervalle et un rappel à 6 mois, le pourcentage de séroconversion (désigne la phase au cours d'une maladie infectieuse où les anticorps apparaissent suffisamment dans le sang pour qu'on puisse les doser) se situe entre 99 et 99,5 %.



Voies actuelles de fabrication des vaccins

Fig.2 La production du vaccin par génie génétique

Cellules CHO (Chinese hamster ovary cells) sont des lignées cellulaires originaires de hamster chinois et sont actuellement les plus utilisées pour l'expression de protéines thérapeutiques recombinantes.

La production du vaccin contre l'hépatite B est encore plus compliquée, Aujourd'hui, c'est possible grâce au **génie génétique** (figure ci-dessous). Le mode de fabrication du vaccin VHB présente les avantages suivants : son prix économique et absence de risque de contamination par des virus vivants.

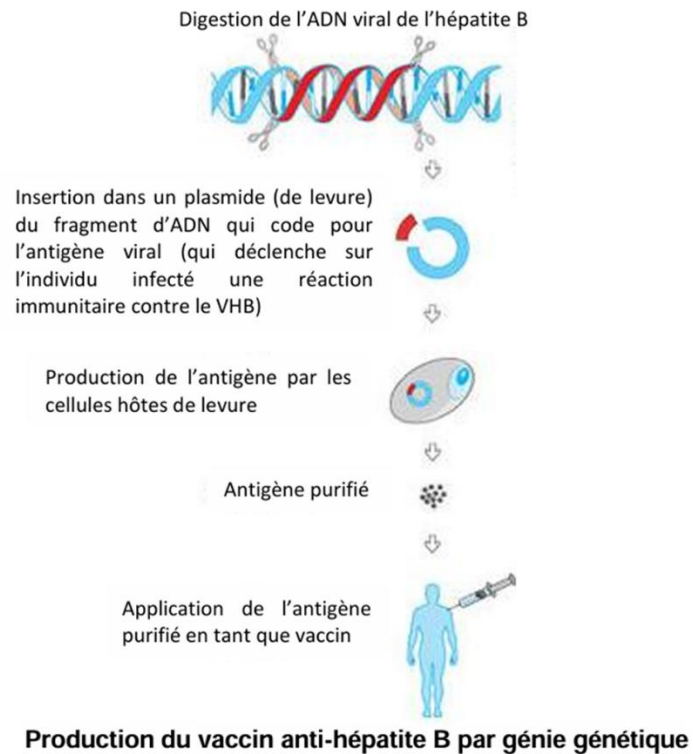


Fig.3 Les étapes de production du vaccin par génie génétique

Exemple

Les vaccins antigrippes sont également produits par génie génétique.

?

De tels systèmes sont déjà utilisés dans la production de vaccins contre : variole, l'hépatite A et la poliomyélite.

IV- Les applications de la transgénèse

1. Principe

Les applications de la transgénèse peuvent être regroupées dans quatre grands domaines :

- Améliorations agronomiques et environnementales
- Qualités alimentaires
- Production de molécules à intérêt industriel
- Production de molécules destinées à la santé humaine

➤ L'agronomie et l'environnement

De nombreux travaux de transgénèse concernent l'introduction de gènes de résistance aux herbicides ou aux insectes, et dans une moindre mesure, à certains virus et maladies.

Associées à un usage raisonné d'herbicides et de pesticides, ces plantes transgéniques vont améliorer l'efficacité de l'agriculture, tout en respectant encore mieux l'environnement.

- La résistance des plantes à des insectes ravageurs

La transgénèse offre aujourd'hui un outil supplémentaire aux agriculteurs pour limiter les traitements chimiques et protéger leurs récoltes contre les insectes et les maladies et ainsi réduire les pertes.

Pour rendre une plante résistante à un insecte, un gène codant une protéine toxique pour cet insecte a été introduit dans le génome de la plante.

- La résistance à des maladies

Par transgénèse, il est possible d'obtenir des plantes résistantes aux virus.

Ces plantes transgéniques synthétisent des protéines qui bloquent la multiplication et le développement des virus.

- La résistance à des herbicides

De nombreuses plantes transgéniques ont été développées pour obtenir une tolérance à ces herbicides.

La création de plantes tolérantes aux herbicides permet l'utilisation de matières actives au profil écotoxicologique favorable, c'est à dire à faible durée de vie,

à biodégradabilité rapide, respectant l'environnement et à large efficacité.

Ces cultures peuvent supporter ce traitement grâce à l'introduction d'un gène de tolérance spécifique.

➤ L'alimentation

Il s'agit de modifier la composition d'une plante afin de lui apporter des avantages nutritionnels et gustatifs ou de lui conférer de nouvelles caractéristiques qui permettent de diversifier les débouchés.

- **Les qualités nutritionnelles**
- **La maturation des fruits**
- **La transformation agro-alimentaire**

2. Génie génétique des plantes

- Génie Génétique : méthode directe pour produire des plantes modifiées
- **Plantes : particulièrement adaptées à des modifications**
- Ex à succès : **Plasmide Ti**

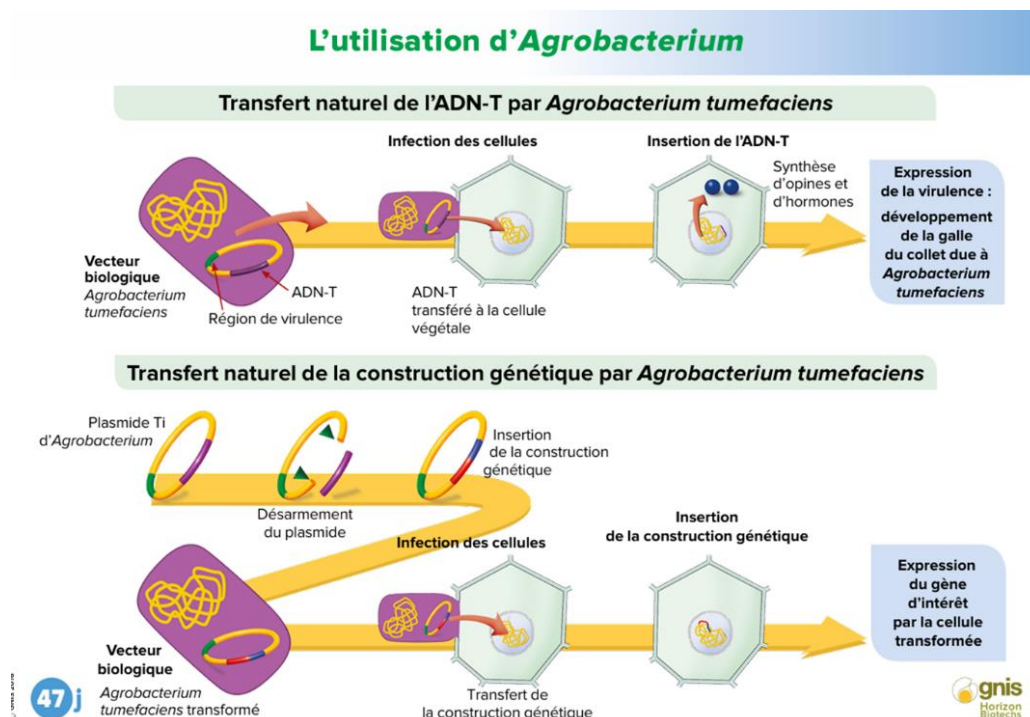


Fig. 4 Principe d'utilisation d'*Agrobacterium*

- Caractéristiques conférées aux plantes par Génie Génétique :

- **Résistance aux attaques des insectes** : Fabriquer par Génie Génétique des plantes ayant une activité insecticide
- **Résistance à l'infection virale** : Transférer un gène codant une protéine capsidale virale
- **Résistance aux herbicides** : 10% de la production totale est perdue par les mauvaises herbes ; Les herbicides sont coûteux, potentiellement toxiques pour l'environnement, et peuvent tuer aussi bien des cultures que des mauvaises herbes.

Transfert des gènes pour conférer une résistance aux herbicides des plantes.

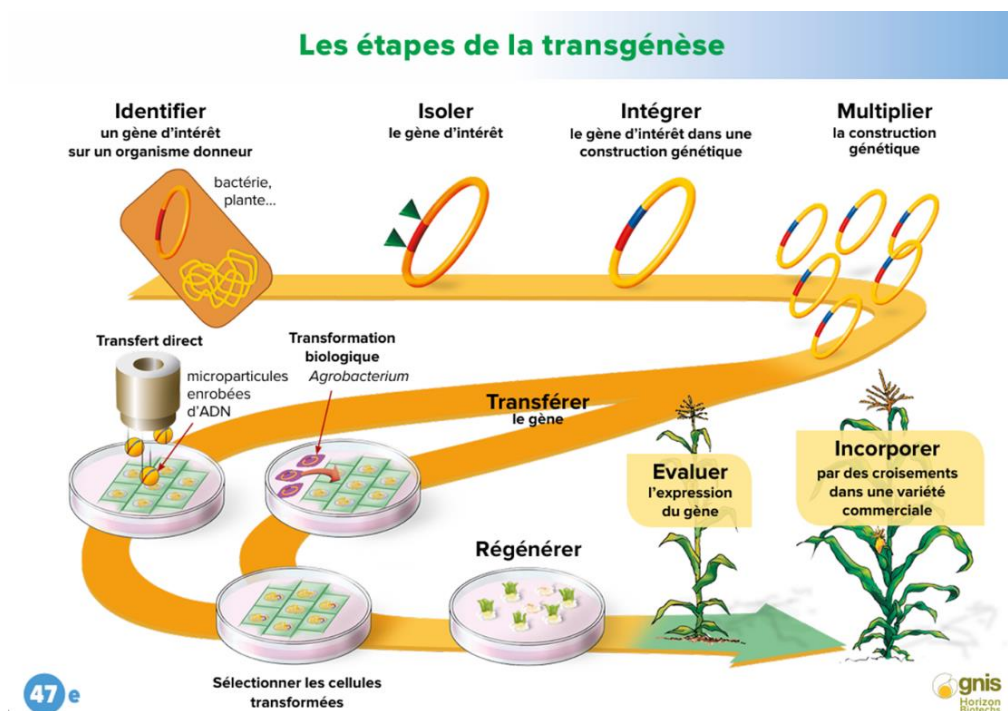


Fig.5 Les étapes de la transgénèse

Le génie génétique

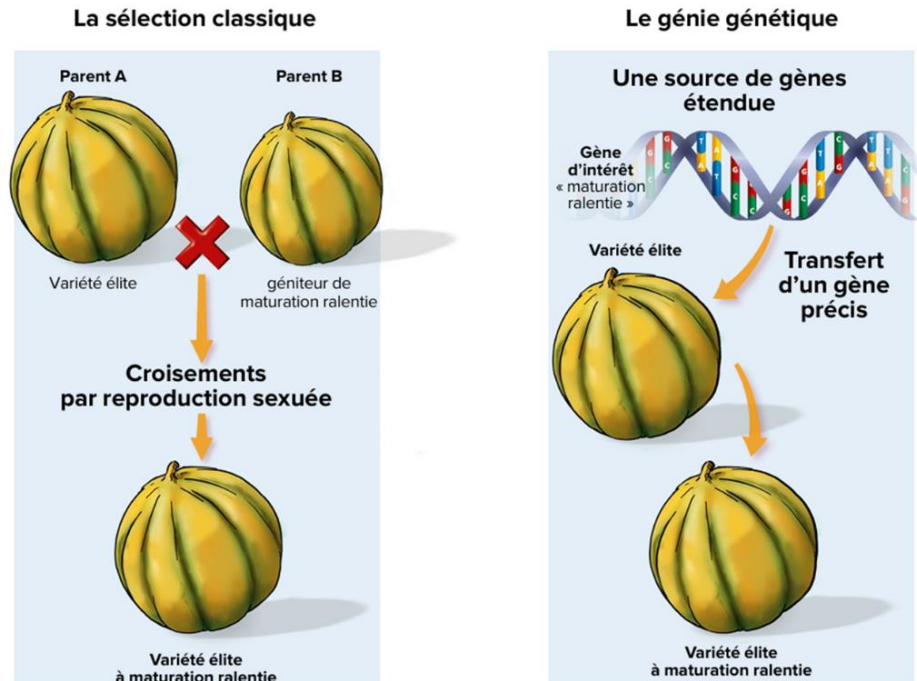


Fig. 6 Principe du génie génétique

3. Les animaux transgéniques

La sélection génétique sur les population d'élevage, très utilisé « Animaux ayant des caractéristiques intéressantes » Ex: Haut rendement en lait ; Vitesse de croissance importante...

L'élevage sélectif est très efficace, mais il est difficile d'introduire de nouvelles caractéristiques sans modifier les traits existants : **introduire directement des caractères souhaités** chez les animaux par **transfert de gènes** : **Animal transgénique**

Références :

- Cours de Génie génétique: Dr Ghembaza Boublenza. L, Université de Tlemcen, Faculté SNV , Algérie.
- TD Techniques de séparation et d'analyse des acides nucléiques: ADN, ARN & PLASMIDES : Dr Leila Medraoui, Université de Rabat, Faculté des Sciences, Maroc.
- SUPPORT DE COURS de GENIE GENETIQUE: Dr. KHOUAJA Fattouma, Université DE LA MANOUBA, INSTITUT SUPERIEUR DE BIOTECHNOLOGIE DE SIDI THABET (ISBST),Tunisie.
- Polycopié de la matière de génie génétique incluant Les cours, les travaux dirigés et les travaux pratiques: Dr Fathi Berrabah, Université de Djelfa, Faculté SNV, Algérie .
- www.medatice-grenoble.fr chapitre 8 méthodes d'études en biologie moléculaire.
- LES OUTILS DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE: Pr Belarbi-Amar N, Université Oran1 Ahmed Benbella, Faculté de Médecine, Département de médecine, Laboratoire d'Histologie-Embryologie, Cytologie et Génétique cliniques, Algérie .
- Biologie Moléculaire et Génie Génétique: Dr. Nehal Fatima, Université de Chlef, FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE, Département des Sciences Agronomiques et Biotechnologies, Algérie.