

Vecteurs, cellules hôtes et méthodes de transfection utilisées pour la production de protéines recombinantes

Plan:

Introduction: qu'est ce qu'une protéine recombinante?

Rappels: construire un vecteur d'expression

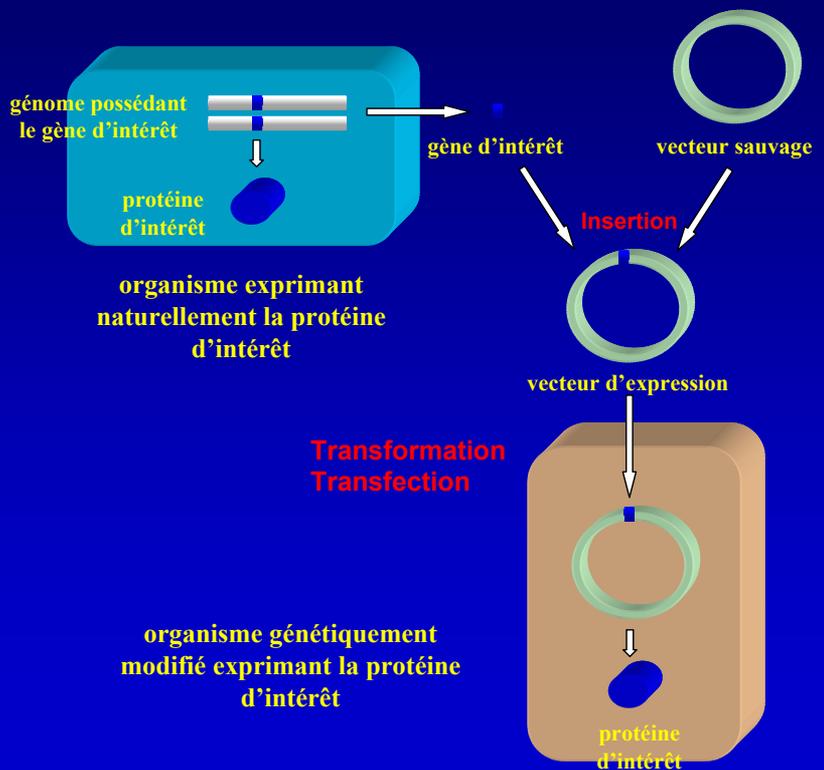
Systèmes d'expression procaryotes

Systèmes d'expression eucaryotes

Méthodes de transfection

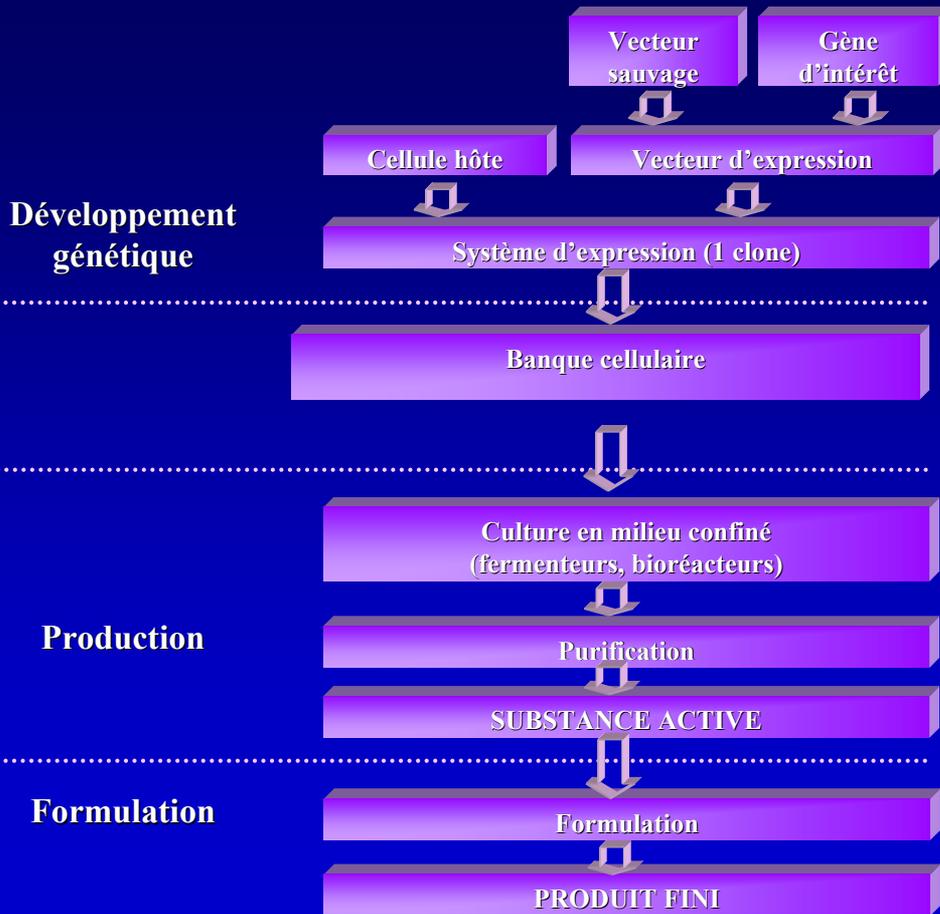
Contrôle de l'expression

Technologie des protéines recombinantes



- **Protéine recombinante:** produite par des cellules dont l'ADN a été modifié par recombinaison génétique

Procédés de fabrication



Système de production adapté:

Protéines à usage pharmaceutique
Production d'enzymes à échelle industrielle
Protéines modifiées: mutées, fusionnées...

Principales difficultés:

Taux d'expression de la protéine, cinétique
Modifications post-traductionnelles, repliement, glycosylation
Procédés de purification
Stabilité, solubilité
Considérations économiques: équipements disponibles, coûts de production

Utilisations des OGM en thérapeutique

OGM		TYPE	UTILISATION	MILIEU
Utilisé comme système de production de produits de santé	Milieu confiné	micro-organismes	développement et/ou production de substances à usage thérapeutique (protéines recombinantes essentiellement)	milieu confiné (réacteurs, salles blanches, établissements classés)
	Milieu disséminé	plantes transgéniques		- champs ou serres confinées - production extensive en champs ?
		animaux transgéniques		- élevage « clos »
Utilisé en tant que produit de santé		micro-organismes (y compris virus)	vecteur de thérapie génique	milieu disséminé <i>NB. selon la directive 2001/18/CE, l'être humain n'est pas considéré comme OGM!!!</i>
			vaccin	
		plantes	produit de santé ("alicament")	

Principaux systèmes d'expression et vecteurs utilisés pour la production de protéines recombinantes

Système d'expression	Principaux vecteurs disponibles	Exemples de protéines recombinantes
Bactérien		
<i>E.coli</i>	- plasmide - virus	somatropine, insuline, chymosine, interféron, interleukine...
Fongique		
<i>S. cerevisiae</i>	- plasmide	antigène HBs, insuline...
Insecte		
<i>Spodoptera frugiperda</i>	-baculovirus (<i>Autographa californica</i> ...) -plasmide	<i>pas de produit commercialisé mais de nombreuses voies de recherche</i> : interféron, interleukine, EPO, tPA, anticorps murin, antigène VRS, antigène VIH...
Mammifère		
<i>CHO</i>	- plasmide - virus	antigène HBs, somatropine, cytokines, EPO, facteur de coagulation...
<i>Cellules humaines</i>	- plasmide - virus (EBV...)	EPO , protéine C, α -galactosidase, anticorps monoclonaux ...

Construction d'un vecteur d'expression:

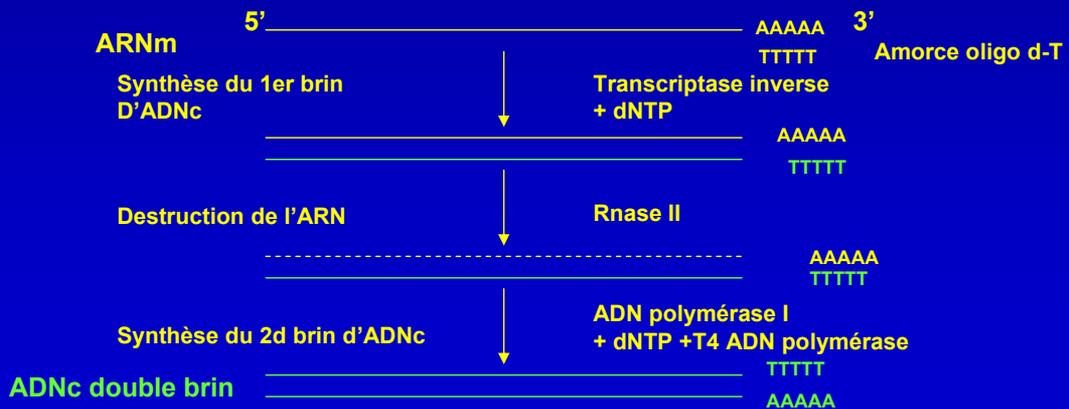
1. Isoler la séquence à exprimer = préparation d'un ADNc

Cellules ou tissu producteurs de la protéine d'intérêt

Extraction des ARN totaux

Purification des ARNm (1 à 2%): possèdent une queue polyA
chromatographie sur colonne oligo-dT
(cellulose/sépharose/billes magnétiques)

Synthèse d'un ensemble ADNc par transcription inverse:



Construction d'un vecteur d'expression:

1. Isoler la séquence à exprimer = préparation d'un ADNc

Cellules ou tissu producteurs de la protéine d'intérêt



Extraction des ARN totaux
Purification des ARNm (1 à 2%): possèdent une queue polyA
chromatographie sur colonne oligo-dT
(cellulose/sépharose/billes magnétiques)



Synthèse d'un ensemble ADNc par transcription inverse:



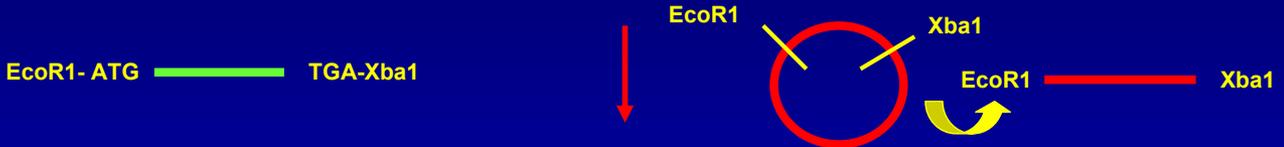
PCR d'amplification de l'ADNc ciblé: importance du choix des amorces

EcoR1- ATG ————— TGA-Xba1

Construction d'un vecteur d'expression:

2. Inersion dans le vecteur d'expression

Digestion de l'ADNc amplifié et du vecteur par une enzyme de restriction



Recombinaison chimique: ADN ligase → ADN recombinant

Contrôle qualité de l'ADN recombinant:

Transformation dans E. Coli
Sélection des clones recombinants
et extraction du vecteur d'expression (mini-prep)
Restriction du vecteur purifié

3. Préparation de grandes quantités de vecteur

Incorporation dans la cellule hôte

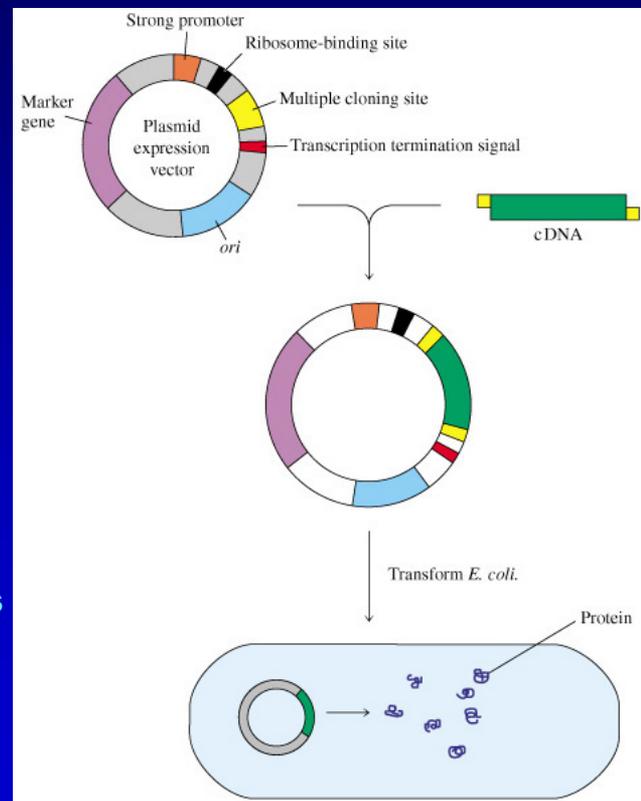
**Systemes d'expression procaryotes:
Production de proteines recombinantes par E. Coli**

Vecteurs d'expression: les plasmides (1)

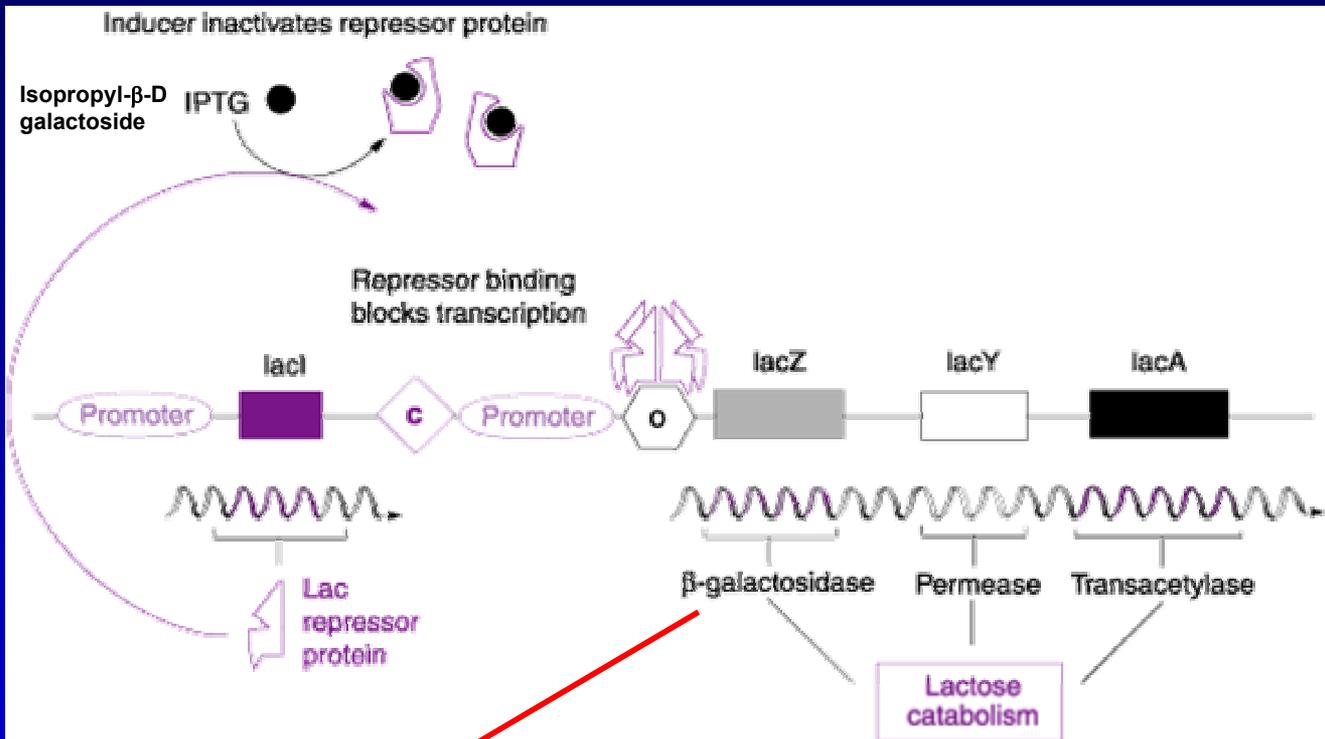
Caractéristiques communes

- >ADN circulaire extra chromosomique (2 à 6 kb)
- >Réplication indépendante/ chromosome bactérien
- >Nombre de copies contrôlé (gène *rop*)
- >ADN exogène: 8 à 9 kb
- >Possibilité de co-transformer plusieurs plasmides différents

Promoteur (constitutif ou inductible)
Site de fixation des ribosomes
Polylinker / Multiple cloning site (MCS)
Signal de terminaison de transcription
Origine de réplication dans les bactéries
Gène de résistance à un antibiotique
(marqueur de sélection)



Rappel: l'opéron lactose

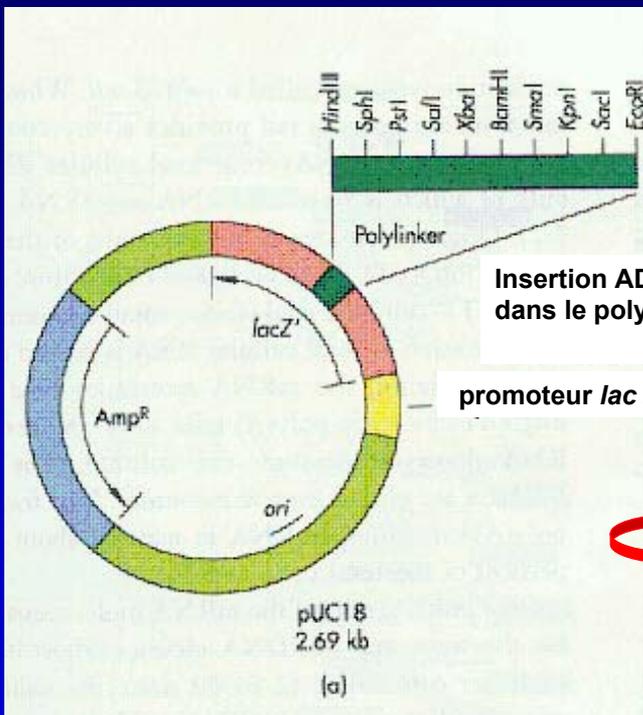


X-gal
5-bromo-4chloro-3-indolyl- β -D
galactoside



X (5-bromo-4chloro-3-hydroxyindole) + **galactose**
Bleu

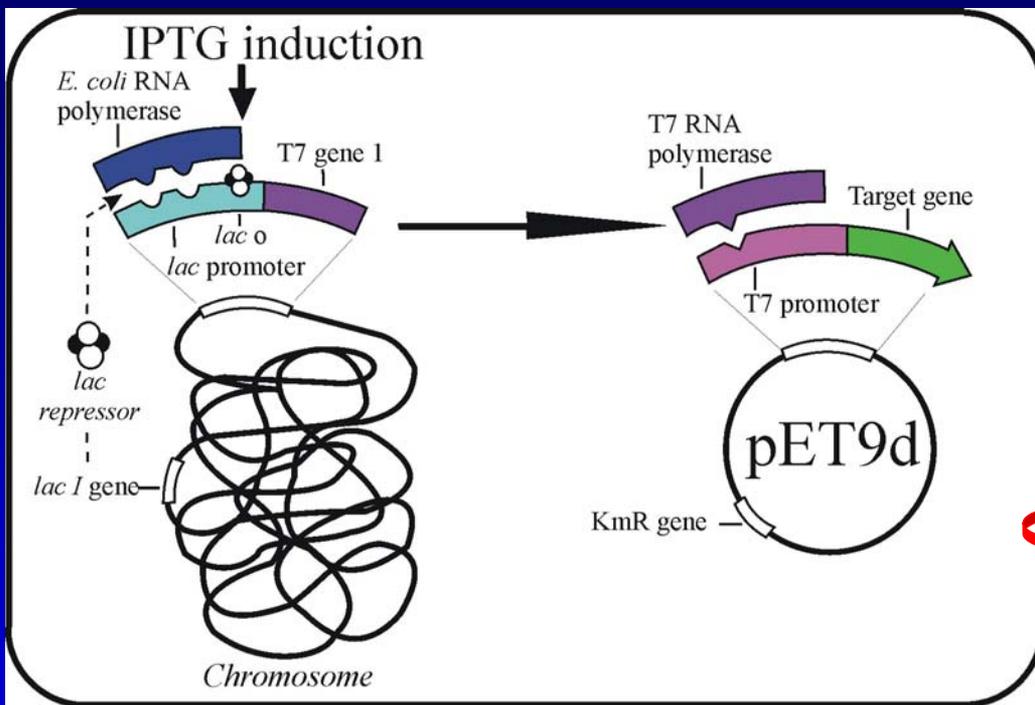
Les plasmides (2) promoteur de l'opéron lactose



- ✓ Sélection par résistance à l'ampicilline
- ✓ Screening des colonies par addition du substrat X-gal

Induction de l'expression de la protéine par addition d'IPTG

Les plasmides (3) promoteurs: pET (Novagen), un double système de verrouillage



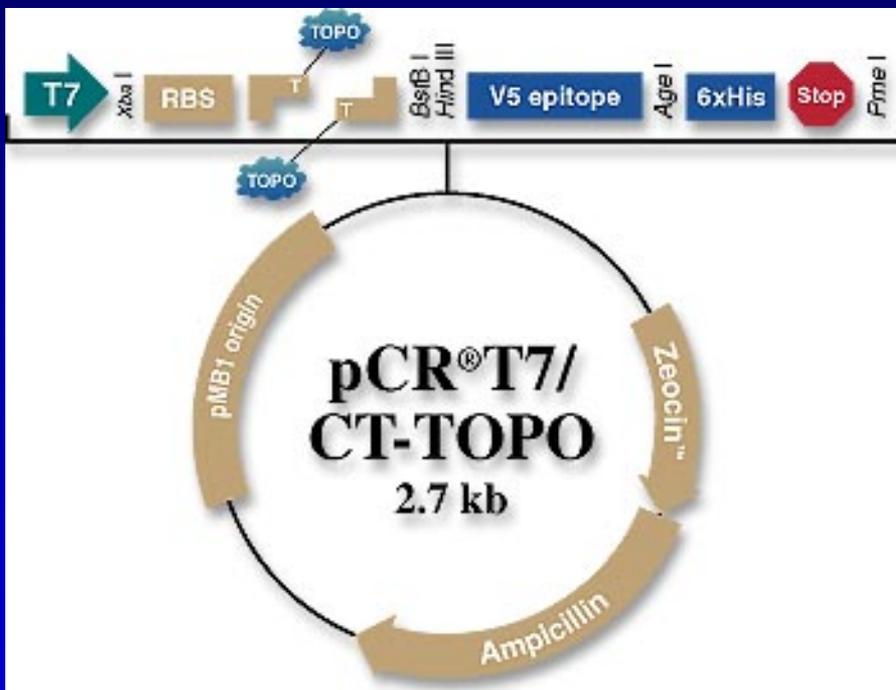
**T7: promoteur fort
du bactériophage**

**Régulation fine
de l'expression
de protéines
toxiques pour
la cellule**

E. coli BL21(DE3) / pET9d

Les plasmides (4)

Séquences permettant la détection et la purification de la protéine recombinante: les TAG



Autres TAG: Glutathione-S-transférase (GST), Maltose-binding-protein (MBP), Green-fluorescent protein (GFP)...

Avantages des systèmes d'expression procaryotes

- **Croissance rapide et peu onéreuse (1 génération toutes les 20-30 min pour E. Coli), non pathogènes pour l'homme**
- **Système génétique bien connu, nombreuses souches améliorées pour optimiser l'expression de la protéine**
- **Expression des gènes facilement contrôlable**
- **Nombreux vecteurs d'expression disponibles, facilité de transfection dans les cellules-hôtes**
- **Bons rendements de production des protéines (plusieurs dizaines de grammes par litre de culture)**
- **Production de la protéine recombinante sous forme de corps d'inclusion cytoplasmique ou sécrétée dans l'espace péri plasmique**
Facilité de purification

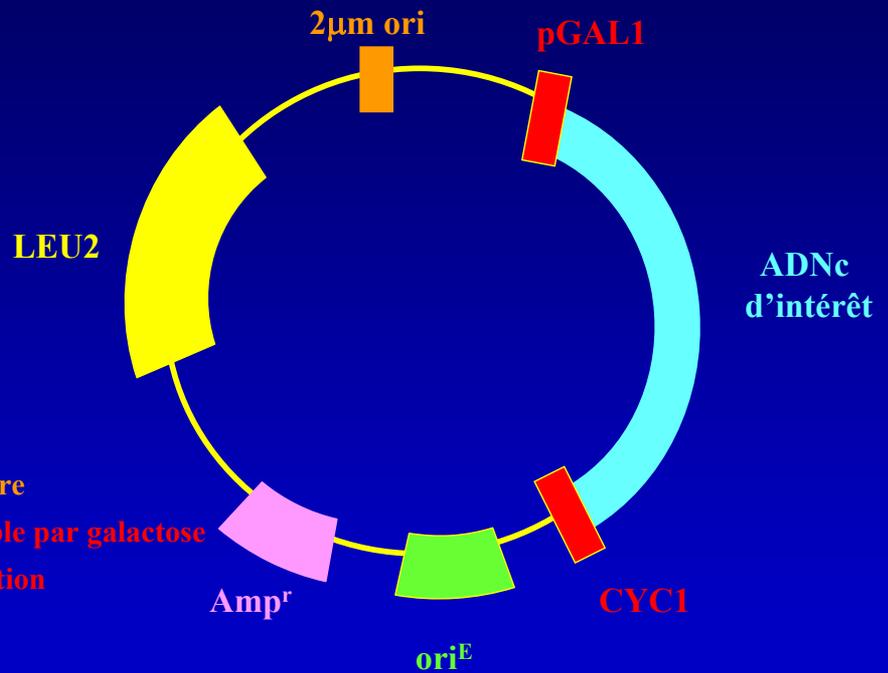
Inconvénients des systèmes d'expression prokaryotes

- Conséquences de la présence du vecteur (taux de croissance cellulaire, consommation d'énergie)
- Surexpression de la protéine recombinante (toxicité)
 - ➡ Amélioration par les systèmes inductibles
- Pas de modification post-traductionnelle
 - ➡ Activité biologique différente de la protéine native
- Corps d'inclusion: protéine insoluble, mal repliée
 - ➡ co-expression de protéines chaperonnes (foldases)
- Protéines sécrétées dans l'espace péri plasmique: rendement moins important
 - ➡ co-expression de translocases
- Utilisation des Tag: avantage pour la purification mais il faut ensuite les cliver (protéases onéreuses)
Pas de clivage à 100%
- Présence d'endotoxines bactériennes en large quantité

Systemes d'expression dans la levure

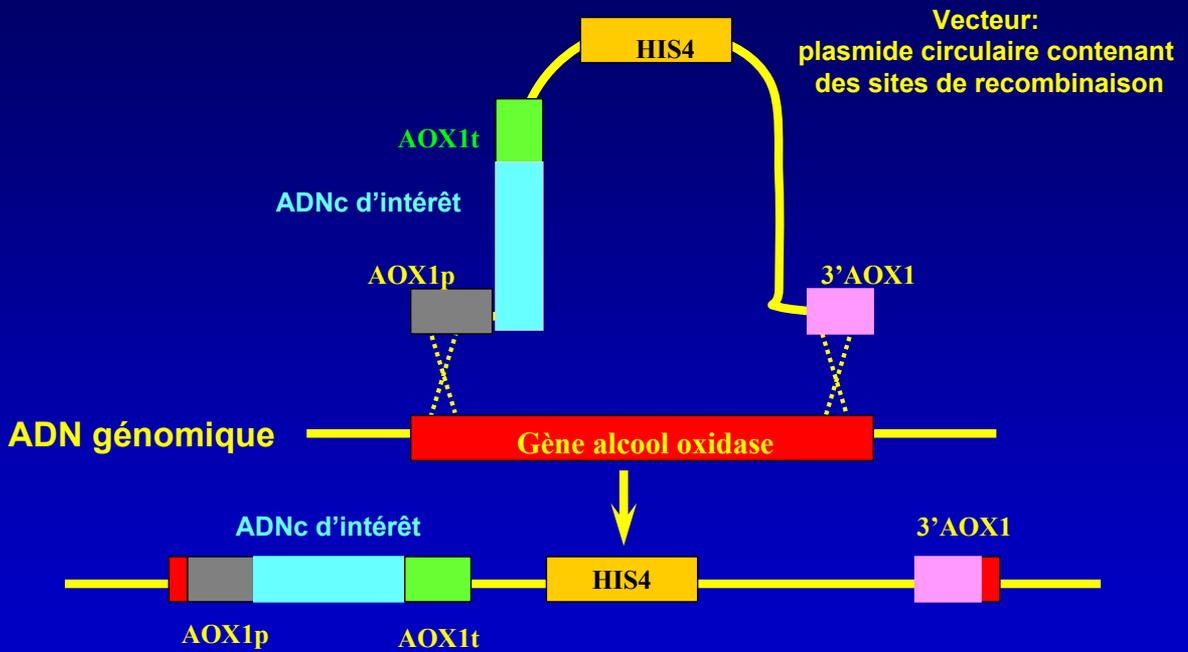
Vecteurs d'expression chez *Saccharomyces cerevisiae*

Systemes épisomiques



2µm ori: répllication dans la levure
pGAL1: promoteur fort inductible par galactose
CYC1: terminaison de transcription
ori^E = répllication bactérienne
Amp^r = sélection bactérienne
LEU2 = sélection dans la levure

Vecteurs intégratifs chez *Pichia pastoris*



Promoteur AOX1 inducible par le méthanol

Systemes d'expression dans la levure

AVANTAGES

- Petit génome eucaryote facilement manipulable et bien caractérisé
- Absence d'endotoxine
- Fermentation peu coûteuse
- Bons rendements (quelques grammes par litre de culture)
- Modifications post traductionnelles simples possibles
- Possibilité de sécrétion de la protéine d'intérêt

INCONVENIENTS

- Hypoglycosylations
- N-glycosylation: immunogène chez l'homme
- Mauvais repliement de la protéine produite

Systemes d'expression dans les cellules d'insecte

Vecteurs baculoviraux

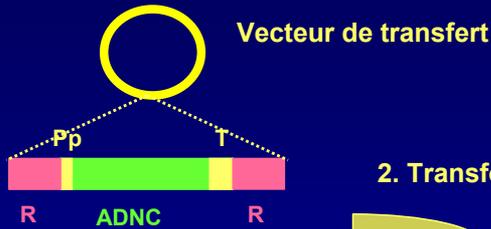
Baculovirus: virus infectant les insectes
ADN circulaire super enroulé (88-200Kb) contenu dans la nucléocapside
présence d'une enveloppe
plus de 500 isolats différents (selon l'hôte infecté)
Non pathogènes pour les vertébrés

Cycle viral:

Phase d'infection: attachement, fusion à la membrane cellulaire,
dissociation de la nucléocapside,
transfert de l'ADN dans le noyau cellulaire

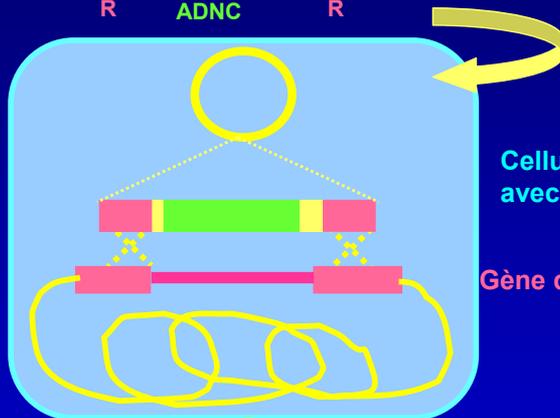
Phase de réplication: expression des gènes précoces (régulateurs),
intermédiaires (réplication et assemblage),
tardifs (protéines de structure P10 et polyhédrine)

Construction de Baculovirus recombinants

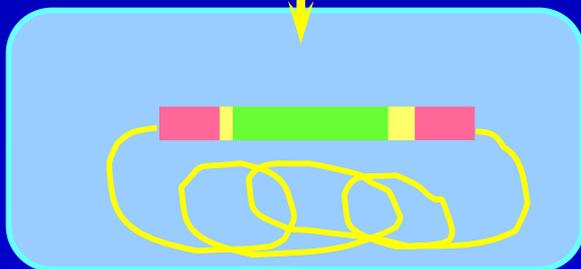


2. Transformation

1. Préparation d'un vecteur de transfert avec gène d'intérêt et séquences de recombinaison flanquant le gène de la polyhédrine

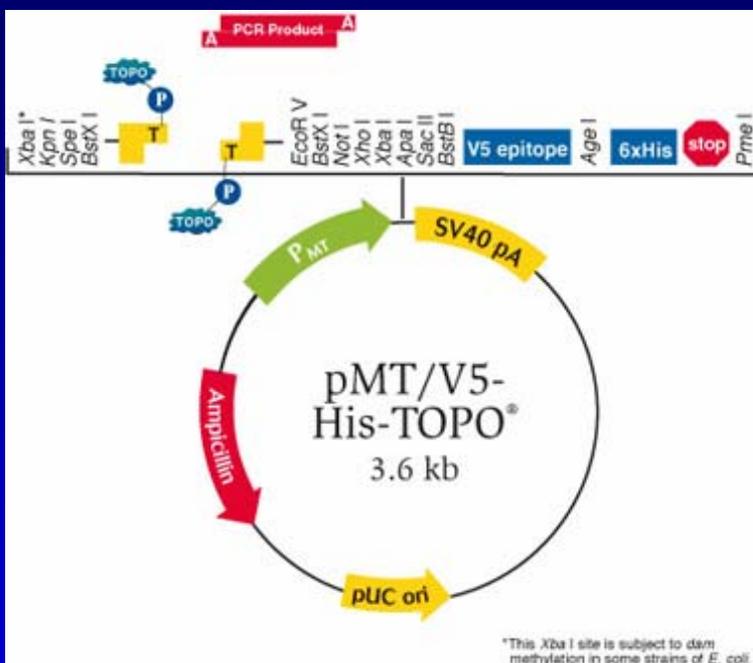


3. Recombinaison des séquences homologues



➔ Méthodologie fastidieuse

Utilisation de vecteurs d'expression plasmide pour transformer les cellules de drosophile (S2)



Promoteur fort Metallothionein, inducible par Cu^{2+}

Polylinker ou site de clonage « TOPO »

SV40: signal de polyadénylation

TAG poly-histidine et épitope V5

pUC ori: Origine de réplication bactérienne

- ✓ Sélection bactérienne par l'ampicilline
- ✓ Sélection dans les cellules S2 par co-transfection avec un plasmide portant un gène de résistance à l'hygromycine

Systemes d'expression dans les cellules d'insecte

AVANTAGES

- Croissance rapide des cellules, en suspension
- Bons rendements de production (centaines de mg/L de culture)
- Modifications post-traductionnelles poussées:
 - reconnaissance des signaux d'adressage hétérologues (excrétion des protéines matures dans le milieu)
 - clivage des pro-peptides et du peptide signal
 - assemblage des complexes oligomériques
 - formation de ponts disulfure
 - repliement
 - modifications chimiques (glycosylation, acétylation, ...)

INCONVENIENTS

- Systemes de fermentation particulier (sans apport de CO₂, 22°C)
- Glycosylation: absence d'acide sialique
- Production coûteuse (mort des cellules si infection par baculovirus)

Systemes d'expression dans les cellules mammifères

Expression constitutive de la protéine d'intérêt

Promoteur fort d'origine virale: CMV

Expression transitoire de la protéine sans pression de sélection (24-48 heures post-transfection)

Expression stable avec pression de sélection: les cellules n'ayant pas incorporé le vecteur meurent (culture sur plusieurs semaines)

Comments for pcDNA3.1/V5-His A

5503 nucleotides

CMV promoter: bases 209-863

T7 promoter/priming site: bases 863-882

Multiple cloning site: bases 902-999

V5 epitope: bases 1000-1041

Polyhistidine tag: bases 1051-1068

pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1091-1108

BGH polyadenylation signal: bases 1090-1304

ϕ 1 origin of replication: bases 1357-1780

SV40 promoter and origin: bases 1845-2170

Neomycin resistance gene: bases 2206-3000

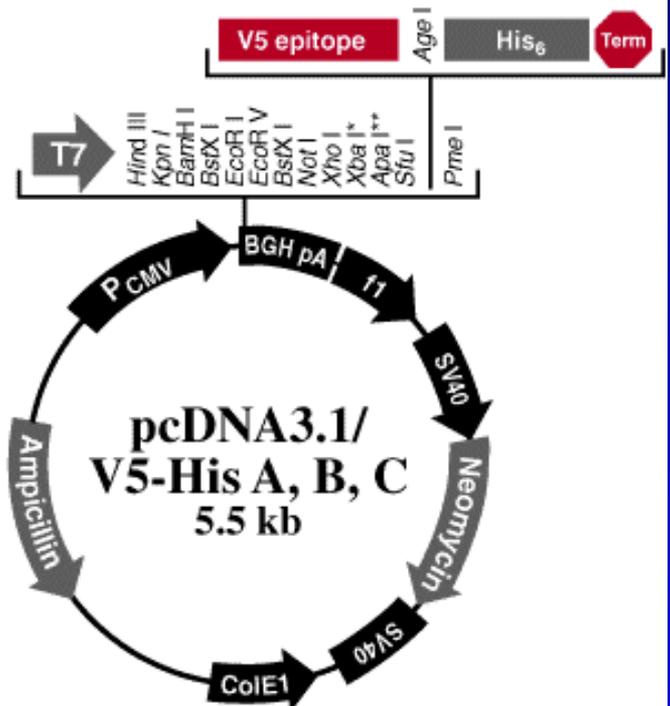
SV40 polyadenylation signal: bases 3019-3257

ColE1 origin: bases 3689-4362

Ampicillin resistance gene: bases 4507-5367

* After the *Xho* I site, there is a unique *Bst*E II site, but no *Xba* I or *Apa* I sites in version C.

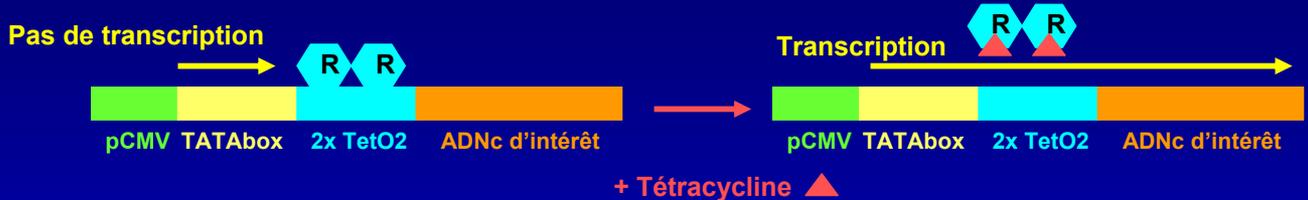
** There is a unique *Sac* II site between the *Apa* I site and the *Sfu* I site in version B only.



Autres éléments régulateurs

□ Systèmes inductibles

Exemple: promoteur sous contrôle d'éléments régulateurs de l'opéron Tétracycline (origine bactérienne)



Utilisation de lignées cellulaires exprimant le répresseur

□ Tags pour la détection et la purification des protéines exprimées

- Séquences de localisation: peptide signal de sécretion
- peptide transmembranaire
- peptides signaux de transport vers les organites

Lignées cellulaires mammifères utilisées pour l'expression de protéines recombinantes

CHO: chinese hamster ovary
HeLa: human cervical carcinoma
BHK: baby hamster kidney
Jurkat: human lymphocyte
NOS: murine myeloma

Manipulations génétique des lignées cellulaires pour améliorer la production des protéines recombinantes:

➤ Contrôle de la glycosylation:

Surexpression des gènes codant pour la galactosyltransférase ou la sialyl transférase

➤ Contrôle de la croissance cellulaire:

Expression inductible d'une protéine régulatrice bloquant le cycle cellulaire en phase G1
Surexpression de protéines anti-apoptotiques (Bcl2 ou BclXL)

Systemes d'expression dans les cellules mammiferes

AVANTAGES

- Nombreux vecteurs d'expression disponibles
- Maturation proche de la proteine native
Profil de glycosylation complet si utilisation de cellules humaines
- Possibilite de produire des proteines chimeres
ex: ligand associe a la partie Fc d'une immunoglobuline
Anticorps humanises

INCONVENIENTS

- Culture des cellules difficile et couteuse
- Croissance lente
- Cellules recombinées peu stables (perte des vecteurs)
- Faibles rendements (10mg/L de culture)
- Peu de recul sur la securite virale (lignees cellulaires transformees)

Méthodes d'incorporation des vecteurs d'expression dans les cellules (1)

INFECTION:

Cas d'utilisation de phages (virus bactériens) ou virus portant l'information génétique à transférer
Infection de la totalité des cellules
Utilisation limitée (sécurité)
Les lignées cellulaires doivent exprimer le récepteur d'entrée du virus

TRANSFORMATION

Traitement chimique des cellules pour fragiliser la membrane cellulaire = cellules compétentes

- Choc thermique (réservé aux bactéries)
- Electroporation: brève impulsion électrique (20 à 2500 volts) induisant une différence de potentiel à la membrane. Ouverture temporaire de pores laissant pénétrer l'ADN exogène
Optimisation essentielle des paramètres de manipulation. 50% de mortalité cellulaire.

Méthodes d'incorporation des vecteurs d'expression dans les cellules (2)

TRANSFECTION

Chimique:

Précipitation de l'ADN au phosphate de Ca

Adhésion à la membrane cellulaire, entrée du complexe ADN-Ca par endocytose

Importance des conditions chimiques (pH, concentrations salines)

DEAE-dextran:

Polymère chargé + / Interaction avec ADN-

Adhésion à la membrane cellulaire

Choc osmotique (DMSO ou glycérol)

Méthode limitée aux transfections pour une expression transitoire

Méthodes d'incorporation des vecteurs d'expression dans les cellules (3)

Biolistique:

**L'ADN exogène est adsorbé sur des particules d'or ou de tungstène (co-précipité avec Ca)
Projection du complexe sur les cellules, sous pression d'hélium**



Méthodes d'incorporation des vecteurs d'expression dans les cellules (4)

Lipofection:

Utilisation de lipides cationiques = liposomes unilamellaires (100 à 400 nm)

Surface chargée + / interaction avec ADN exogène.

Endocytose probable des complexes

Inconvénients:

Efficacité (30%)

Reproductibilité

Toxicité

Avantages:

Amélioration des taux de transfection pour certains types cellulaires

Diminution de la quantité d'ADN exogène nécessaire

La production de protéines recombinantes En résumé...

