

République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
Biochimie Option Biochimie appliquée

Module:

**Production de protéines et d'enzymes
recombinantes**

Niveau Master II

Par: Dr. MEDOUKALI I.

Systemes d'expression génique



Différents systèmes eucaryotes et procaryotes sont utilisés pour la production des protéines d'intérêt thérapeutiques et biotechnologiques (bactéries, levures, champignons, plantes, cellules d'insectes, cellules de mammifères, animaux transgéniques, etc...)

Le choix d'un système adéquat dépend de la nature, de l'origine et de l'utilisation de la protéine désirée, ainsi de sa quantité et de son cout de fabrication.

Le choix de l'hôte d'expression sera en partie dicté par les impératifs économiques, mais la qualité des protéines recombinantes produites constituera également un paramètre déterminant, en particulier dans le cas de la production de protéines destinées à être injectées chez l'homme.

Plusieurs systèmes sont aujourd'hui disponibles et chacun d'eux possède des avantages et des inconvénients.

Tableau – Exemples de protéines recombinantes thérapeutiques produites dans différents systèmes d'expression et commercialisées (1^{re} AMM pour chaque système d'expression)

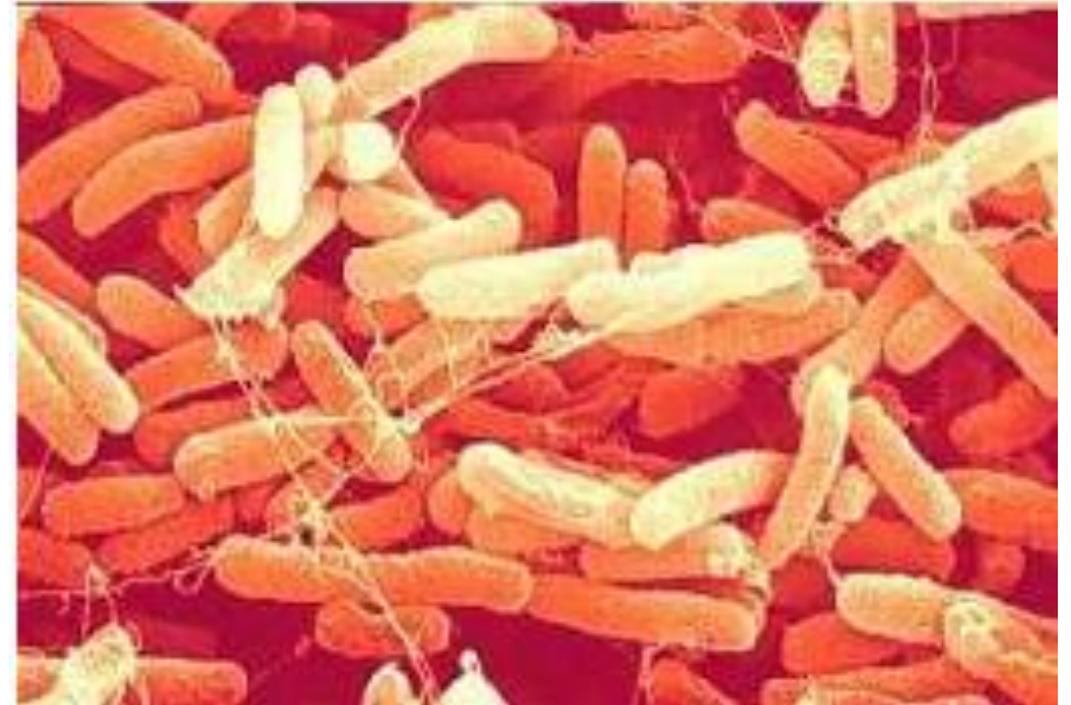
Nom commercial	Société	Catégorie	Système d'expression	Indication	AMM (1)
Humulin®	Eli Lilly	Insuline	<i>E. coli</i>	Diabète	1982
RECOMBIVAX HB®	Merck	Vaccin Recombinant	Levures (<i>S. cerevisiae</i>)	Prévention de l'hépatite B	1986
Activase®	Genentech	Activateur tissulaire du plasminogène (tPA)	Cellules animales (CHO)	Infarctus du myocarde	1987
Concert™	Dow AgroSciences	Vaccin	Plantes (non-nicotine tobacco)	Maladie de Newcastle chez les volailles	2006
ATryn®	GTC Biotherapeutic	Antithrombine III	Animaux transgéniques (chèvre)	Thromboses	2006
Cervarix®	GSK	Vaccin contre le papillomavirus	Cellules d'insecte	Cancer du col de l'utérus	2007

(1) AMM : autorisation de mise sur le marché.

Plusieurs systèmes sont aujourd'hui disponibles et chacun d'eux possède des avantages et des inconvénients.

On va pouvoir exprimer des protéines soit dans des systèmes procaryotes, soit dans des systèmes eucaryotes. Il faudra donc tenir compte des différences entre ces deux systèmes.

Systemes d'expression procaryotes



Systemes
d'expression
génique

Systemes d'expression procaryotes

-Escherichia coli a été très étudié depuis les années 60 si bien que c'est un des organismes actuellement les mieux connus.

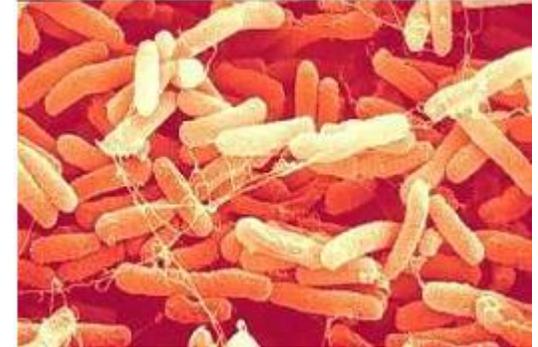
-L'ensemble de ces connaissances en biochimie, génétique et biologie moléculaire a été exploitée pour exprimer des protéines en grande quantité.

-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 cher et les souches de laboratoires sont inoffensives.

-De plus, tous les laboratoires de biologie moléculaire utilisent E. coli pour d'autres expériences (clonage, séquence...).

*Cette facilité en a fait le système d'expression le plus populaire.

Escherichia coli



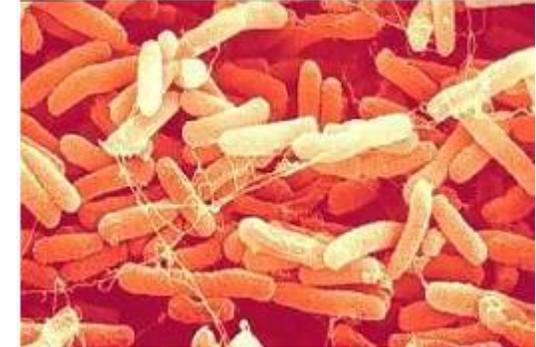
Systemes d'expression procaryotes

Ce qui est indispensable pour produire une protéine dans E. coli.

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

- 1) **une origine de répllication**, un marqueur sélectionnable pour trier et maintenir les bactéries ayant incorporé le vecteur et un polylinker, comme tous les plasmides servant de vecteur.
- 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** telle qu'une séquence de liaison au ribosome, ces séquences doivent être bien positionnées.

Escherichia coli



Systemes d'expression procaryotes

Ce qui est indispensable pour produire une protéine dans E. coli.

1/ L'origine de réplication

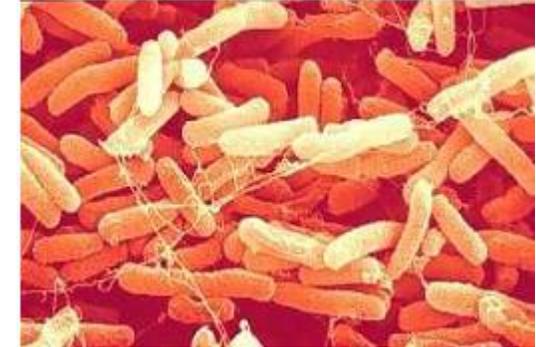
Le gène doit être répliqué dans la bactérie, autrement, on va le perdre très rapidement. La méthode générale consiste à l'insérer dans un plasmide qui porte une origine de réplication.

Il existe plusieurs origines de réplication (**ori**) disponibles. Celle de **bluescript** (500-700 copies par chromosomes), celle de **pBR322** (15-20 copies) et celle de **P15A** (10-12 copies).

-Si le produit du gène est toxique on utilisera une origine de réplication qui donne peu de copies,

-Au contraire si le gène n'est pas toxique et s'il est bien régulé, on utilisera une origine à fort nombre de copies

Escherichia coli



Systèmes d'expression procaryotes

Ce qui est indispensable pour produire une protéine dans E. coli.

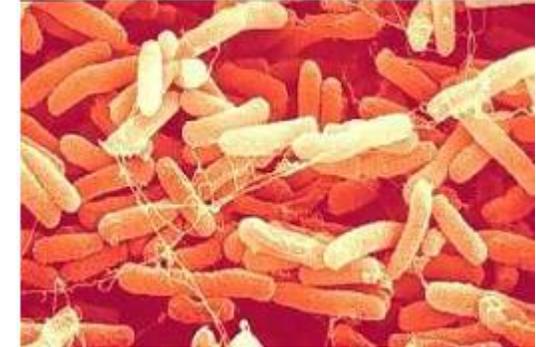
1/ L'origine de réplication

-L'origine de réplication la plus utilisée est **ColE1**, elle donne de **15 à 20 copies** par cellule.

-L'origine **M15** est parfois utilisée (**10-15 copies**). Elle est plus particulièrement utilisée avec **ColE1** lorsqu'on veut produire deux protéines simultanément dans la même bactérie.

*En effet **ColE1** et **M15** sont compatibles.

Escherichia coli



Systemes d'expression procaryotes

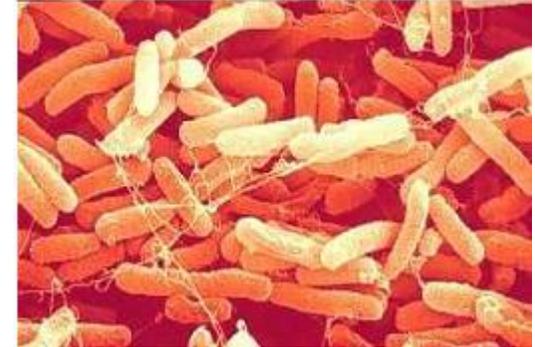
Ce qui est indispensable pour produire une protéine dans E. coli.

1/ L'origine de réplication

On peut positionner l'origine de réplication pour favoriser la production de protéines.

- Si on veut exprimer un gène non toxique pour la bactérie, l'expression sera simultanée à la croissance de la population bactérienne. La fourche de réplication doit alors plutôt progresser dans le même sens que la transcription du gène de sélection, ainsi la transcription ne gênera pas la réplication du plasmide. Ce phénomène est le même que celui qui gouverne réplication et transcription dans le chromosome bactérien.
- Si on veut exprimer un gène toxique pour la bactérie, l'expression s'effectuera en phase stationnaire, lorsqu'il n'y a plus de réplication. La fourche de réplication doit progresser en sens inverse de la transcription pour avorter toute transcription non désirée.

Escherichia coli



Systèmes d'expression procaryotes

Ce qui est indispensable pour produire une protéine dans E. coli.

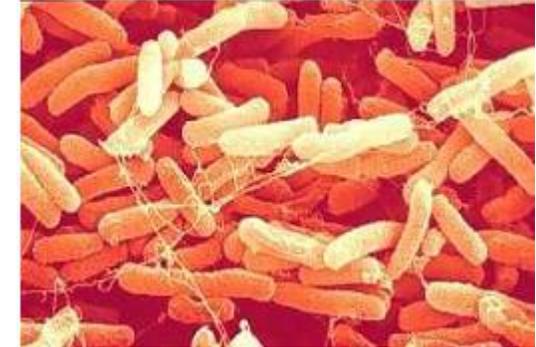
2/ Les promoteurs

- Deux domaines en amont du site d'initiation de la transcription sont importants dans les promoteurs procaryotes:

Le domaine à -10 (Pribnow box, 5' T-A-T-A-A 3') et un domaine à -35 (5' T-T-G-A-C-A 3').

- Ces deux domaines sont en contact avec l'ARN polymérase lors de l'initiation de la transcription.

Escherichia coli



Systemes d'expression procaryotes

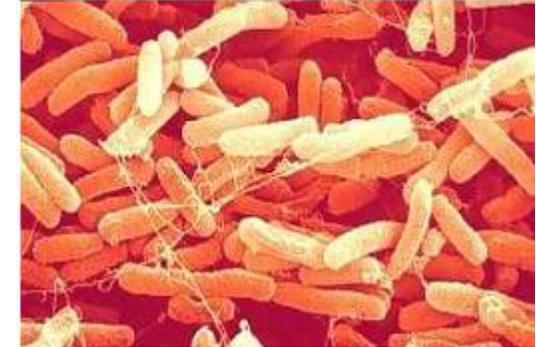
Ce qui est indispensable pour produire une protéine dans E. coli.

2/Les promoteurs

Deux caractéristiques des promoteurs sont importantes pour l'expression des protéines, **la force** du promoteur et **son inductibilité**.

- **La force du promoteur** : les promoteurs bactériens sont relativement faibles du moins pour les besoins de production. Pour les améliorer, des mutations ponctuelles ou des petites délétions ont été effectuées au sein de ces promoteurs, ce qui a permis d'augmenter la transcription.
- **L'inductibilité**, c'est à dire son contrôle : le plus souvent on désire utiliser un promoteur inductible par exemple lorsque la protéine est très toxique pour la bactérie. Dans ce cas, la protéine est produite en début de la culture et inhibe la croissance cellulaire.

Escherichia coli



En utilisant **un promoteur inductible**, on cherchera à inhiber la production au début de la phase de croissance des bactéries puis à l'approche de la phase stationnaire, on induira la production.



Systèmes d'expression procaryotes

Ce qui est indispensable pour produire une protéine dans E. coli.

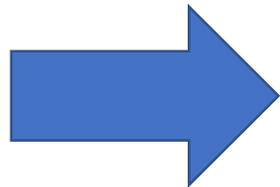
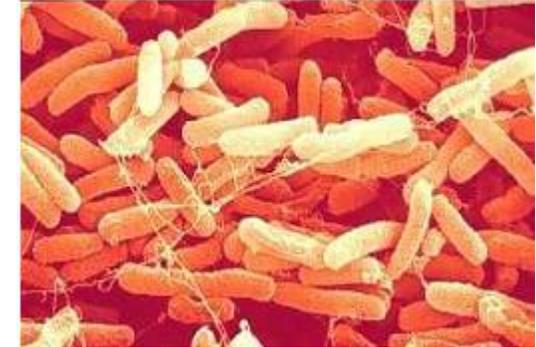
3/Les séquences responsables de la traduction

-Chez les procaryotes, l'initiation s'effectue par reconnaissance d'une séquence particulière (RBS, ribosome binding site).

-Cette séquence est composée d'une séquence riche en purine (Shine-Dalgarno, SD, AGGAGG) et du codon d'initiation qui doit être proche, idéalement, l'extrémité 3' de la boîte de Shine-Dalgarno doit être à 6 bases de l'ATG.

-Il y a plusieurs possibilité de boîte de Shine-Dalgarno : UAAGGAGG donne une meilleure traduction que AAGGA

Escherichia coli

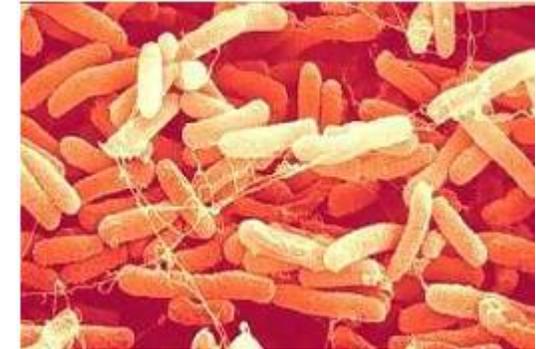


Donc, si on veut exprimer un clone provenant d'une cellule eucaryote dans une bactérie, il faudra incorporer cette séquence en amont de l'ATG d'initiation. Généralement, on mutagenise la séquence du gène d'intérêt au niveau de l'ATG en y incorporant un site de restriction tel que NdeI (CATATG). Ce site est présent sur le vecteur 8 nucléotides en aval d'un site de liaison au ribosome.

Systemes d'expression procaryotes

La bactérie *E. coli* fut et reste le premier hôte utilisé pour la production de protéines recombinantes, la première protéine recombinante (insuline) ayant été mise sur le marché en 1982. D'autres protéines sont depuis lors produites, comme par exemple, l'hormone de croissance, les interférons alpha et bêta, l'interleukine et le TNF (tumor necrosis factor).

Escherichia coli



Ses avantages incontestables sont:

- une excellente caractérisation génétique et physiologique,
- un temps de génération court
- une bonne adaptation à la culture en masse.
- De nombreux vecteurs plasmidiques ont été construits et sont disponibles afin d'insérer et exprimer un gène étranger.
- Cette bactérie possède une grande capacité à accumuler des protéines étrangères, puisque ces dernières peuvent représenter plus de 20 % des protéines cellulaires totales.
- Le niveau d'expression de la protéine recombinante peut atteindre plusieurs grammes par litre.

Systèmes d'expression procaryotes

Parmi les inconvénients;

- E. coli est parfois incapable de synthétiser des protéines recombinantes possédant une conformation tridimensionnelle identique à celle de la protéine naturelle, en raison de l'absence de protéines chaperonnes spécifiques.
- De plus, les protéines sont souvent accumulées dans le cytoplasme sous forme d'agrégats protéiques insolubles, appelés « corps d'inclusions ».
- Il est souvent difficile de récupérer ces protéines mal repliées, car les étapes successives de dénaturation et de renaturation sont susceptibles d'amoinrir l'activité biologique des protéines.

Escherichia coli



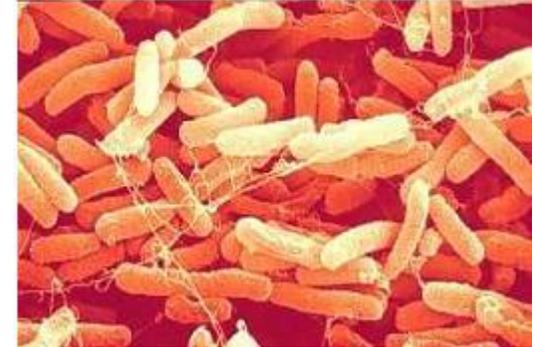
Tableau - Principaux avantages et inconvénients du système d'expression <i>E. coli</i>	
Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none">- Expression rapide des protéines- Concentrations élevées en cellule- Caractéristiques génétiques bien établies- Facilités pour la culture en masse et pour les modifications génétiques- Coût peu élevé	<ul style="list-style-type: none">- Difficulté pour assurer les ponts disulfures corrects sauf dans le périplasme- Protéines non glycosylées- Protéines produites avec des endotoxines- Formation d'acétate limitant la croissance cellulaire- Corps d'inclusion inactifs

Systemes d'expression procaryotes

De nombreuses études sont menées afin d'améliorer l'expression et le repliement des protéines recombinantes produites par E. coli:

- l'utilisation de différents promoteurs ;
- l'utilisation de différentes souches hôtes ;
- l'expression de protéines chaperonnes ;
- la diminution de la température ;
- la sécrétion des protéines dans l'espace périplasmique ou dans le milieu de culture ;
- le changement du milieu de croissance cellulaire ;
- l'ajout de protéines de fusion ;
- l'expression d'un fragment de la protéine ;
- la dénaturation et le repliement de la protéine in vitro.

Escherichia coli



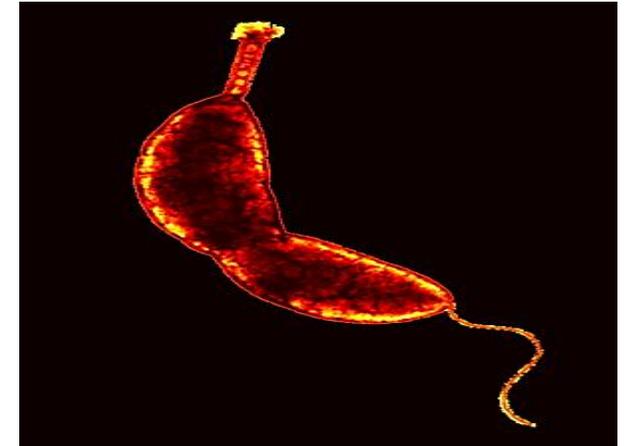
A noter que d'autres bactéries possèdent des capacités de sécrétion supérieures à E. coli.

Cependant leur génétique est moins connue, et le niveau de production de protéines est inférieur à celui obtenu avec E. coli.

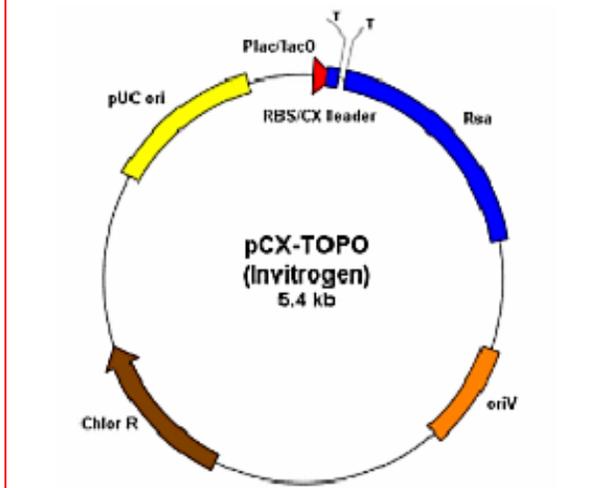
Systemes d'expression procaryotes

Caulobacter crescentus est une bactérie gram négative non toxique qui est très répandue dans l'environnement principalement dans les biofilms. *C. crescentus* est couverte à sa surface par une protéine qui s'arrange selon un réseau en deux dimensions régulièrement structuré. Cette protéine sert vraisemblablement à se protéger contre les virus, les bactéries pathogènes ou les enzymes lytiques susceptibles d'attaquer la protéine.

Autres bactéries utilisées en production de protéines



Exemple de vecteur utilisé pour exprimer une protéine chez *Caulobacter crescentus*.



-Le système de sécrétion de cette protéine (RsaA) a été utilisée pour produire des protéines recombinantes en faisant une fusion entre la protéine RsaA et la protéine recherchée.

-Les protéines sécrétées se retrouvent à la surface de la bactérie ou sur des liposomes.

-Le vecteur doit comporter deux origines de réplication, une pour *E. coli* et une pour *C. crescentus*, le signal de sécrétion en C terminal de la protéine produite et un promoteur pour l'expression.

Systemes d'expression procaryotes

Autres bactéries utilisées en production de protéines

Les Bacillus

Parmi les bactéries **Gram positives**, les Bacillus ont été et sont toujours très utilisés pour produire des protéines pour plusieurs raisons :

- Ils sont depuis longtemps utilisés par l'industrie pour produire des protéines. **La subtilisine**, protéase incorporée aux lessives. Il existe donc de nombreuses souches modifiées pour les contingences industrielles. Toutefois ces souches ne sont généralement pas disponibles.
- On les connaît bien au niveau génétique et leur manipulation par les techniques de biologie moléculaire est bien développée. Des promoteurs forts sont connus et des peptides signaux responsables de la sécrétion sont disponibles.

Par exemple le peptide signal d'une **subtilisine** de **Bacillus amyloliquefasciens** de 30 acides aminés a été utilisé avec succès.



Systemes d'expression procaryotes

Autres bactéries utilisées en production de protéines

Les Bacillus

Parmi les bactéries **Gram positives**, les Bacillus ont été et sont toujours très utilisés pour produire des protéines pour plusieurs raisons :

- Les **Bacillus** ne sont pas pathogènes et ne produisent pas d'endotoxine.
- Ils sécrètent un grand nombre de protéines, leur système de sécrétion est donc bien développé. Ce sont des bactéries Gram-positives, si bien que les protéines n'ont que la membrane cytoplasmique à traverser.



Systemes d'expression procaryotes

Autres bactéries utilisées en production de protéines

Les Bacillus

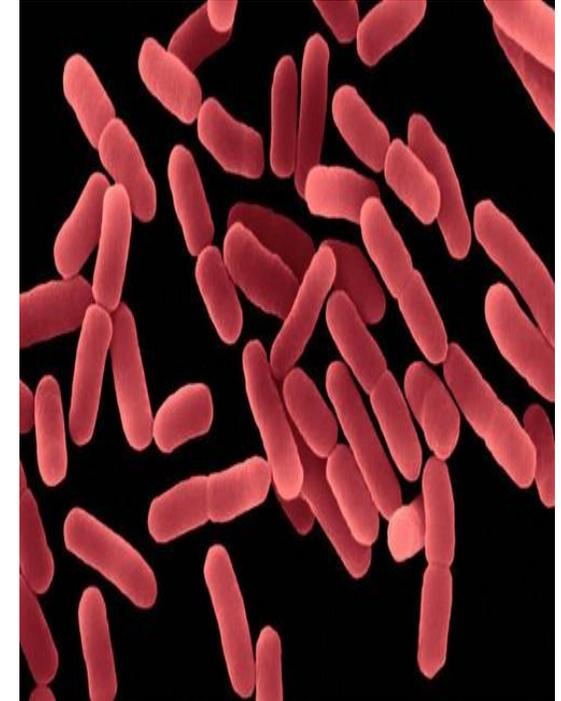
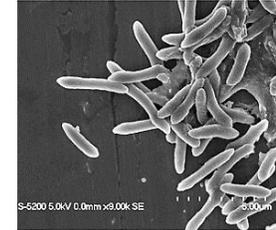
Un cas intéressant est l'expression avec **Bacillus brevis**

-La souche 47 produit de 12 à 25 g de deux protéines sécrétées appelées **MWP** (the middle wall protein) et **OWP** (outer wall protein) par litre de milieu.

-Durant la phase logarithmique, les deux protéines sont insérées dans la membrane mais elles continuent d'être produites pendant la phase stationnaire et elles sont alors sécrétées dans le milieu.

-Les deux protéines appartiennent au même opéron (cpw), elles sont donc sous la dépendance d'un seul promoteur, et présentent un peptide signal.

Bacillus brevis



Systemes d'expression procaryotes

Autres bacteries utilisees en production de proteines

Les Bacillus

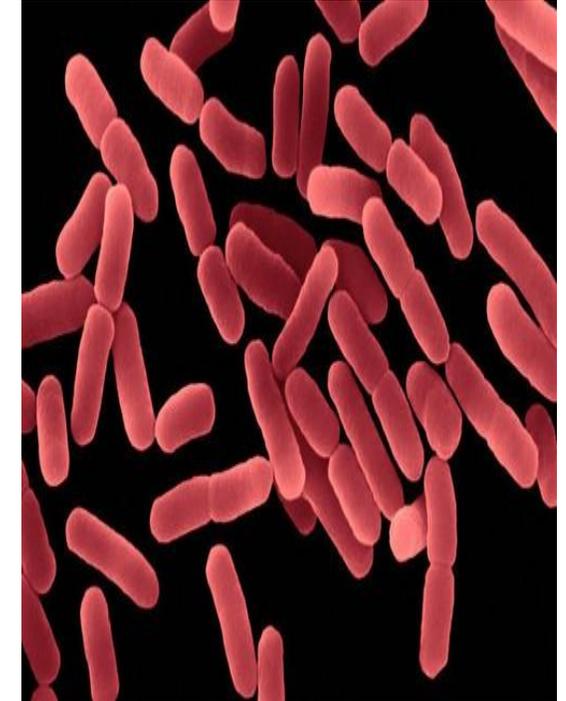
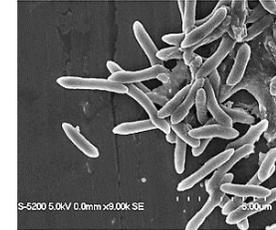
Un cas interessant est l'expression avec **Bacillus brevis**

La production est enorme, on a donc a faire a un promoteur tres fort qu'on peut utiliser pour la surproduction de la proteine recombinante.



Un plasmide contenant ce promoteur, un site de liaison au ribosome et le peptide signal a donc ete construit. La production d'EGF humain (epidermal growth factor) ou d' α -amylase a donne des productions de plusieurs centaines de mg de proteine par litre de milieu.

Bacillus brevis

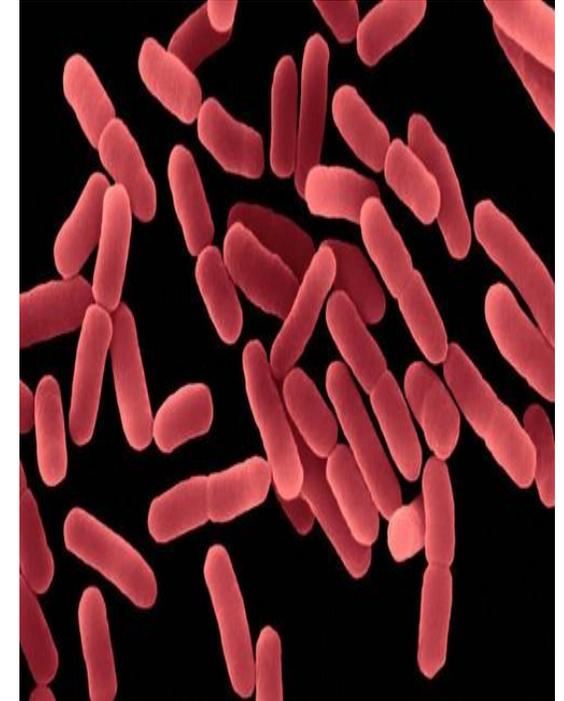
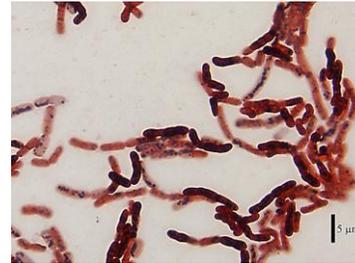


Systemes d'expression procaryotes

Autres bactéries utilisées en production de protéines

Les Bacillus

Bacillus megaterium



-Un des éléments régulateurs de l'utilisation du carbone est l'opéron xylose ce qui permet une inductibilité de 350 fois.

-L'expression des protéines est relativement stable du fait de l'absence de protéases alcaline qui sont par exemple présentes chez **B. subtilis**.

Systemes d'expression procaryotes

Autres bactéries utilisées en production de protéines

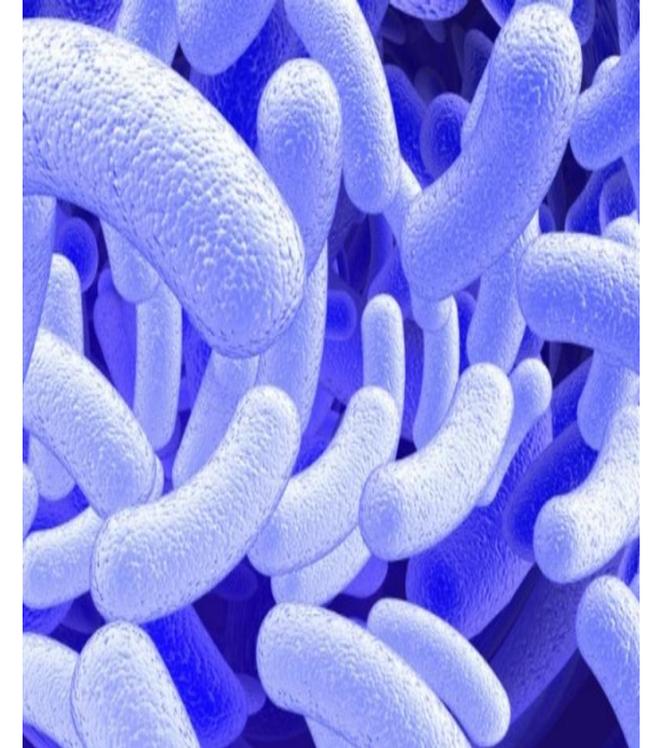
Ralstonia eutropha

Depuis quelques années, une bactérie à Gram négatif, est également utilisée pour produire des protéines recombinantes ; il s'agit de *Ralstonia eutropha*.

-*Ralstonia* peut pousser à haute densité, jusqu'à 230 g par litre et il semble que les protéines qui font des corps d'inclusion chez *E. coli* reste solubles.

-Un système développé a produit des souches qui utilisent la T7 RNA polymérase sous le control du promoteur fort et inductible phaP. Le gène d'intérêt est cloné en aval du promoteur T7 puis introduit dans le génome de la bactérie

-L'enzyme organophosphorylase, connue pour être produite sous forme de corps d'inclusion chez *E. coli* avec une concentration inférieure à 0,1 g/L, a **été produite avec succès chez *R. eutropha*, à une concentration de 10 g/L.**

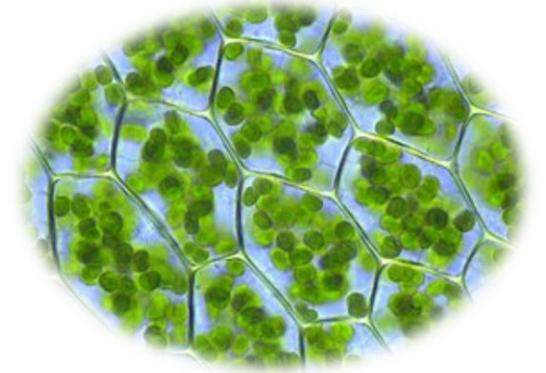
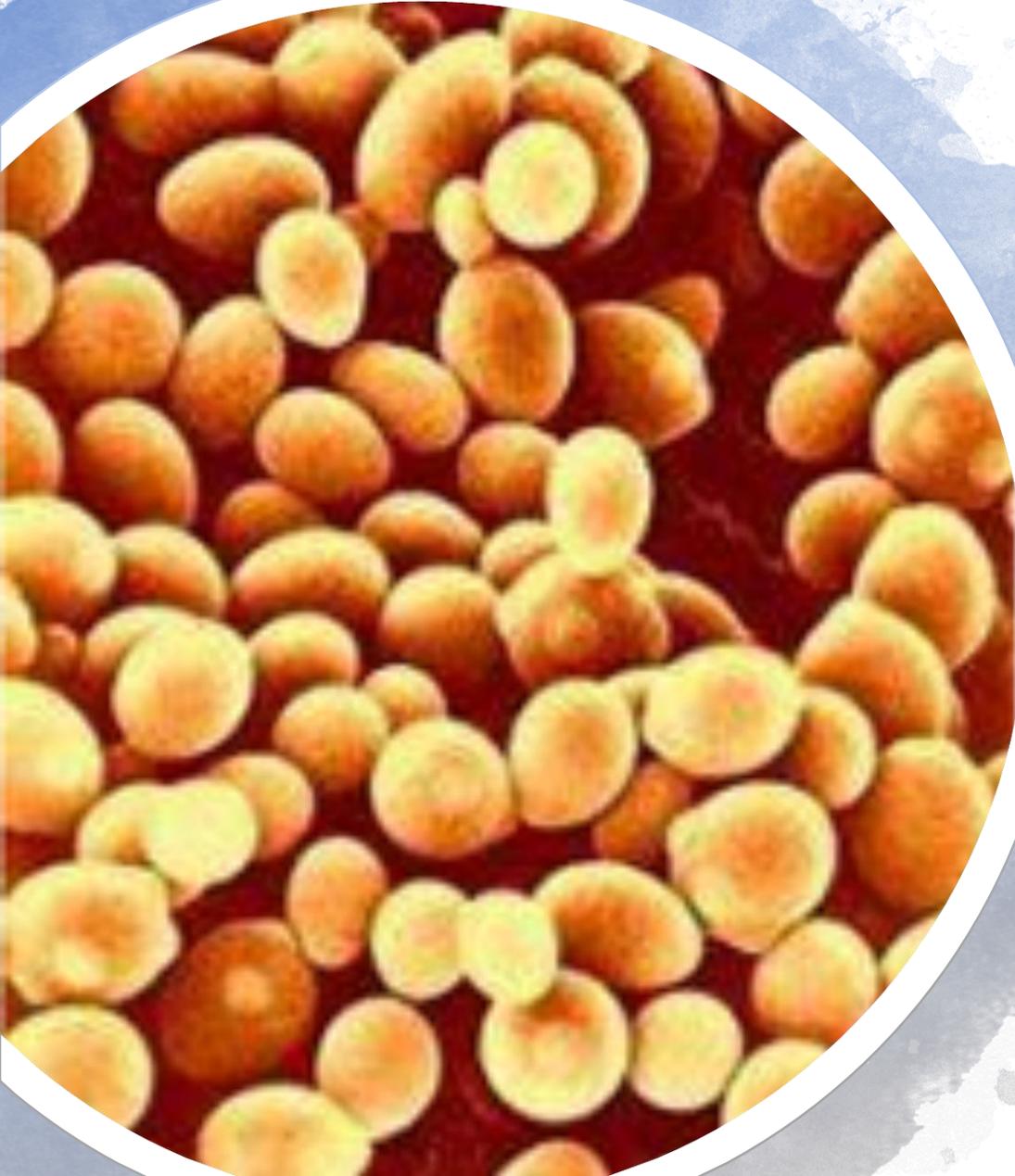


Systemes d'expression procaryotes

La production d'une proteine eucaryote dans un systeme bacterien n'est souvent envisageable que

- Pour des proteines dont l'activite n'est pas requise (pour faire un anticorps par exemple),
- Pour les proteines dont les modifications post-traductionnelle ne sont pas importantes. En effet, les procaryotes sont incapables de realiser la plupart des modifications catalysées par des enzymes.
- Pour les proteines dont le repliement n'est pas dû à des proteines comme c'est le cas pour la plupart des proteines synthétisées dans le réticulum endoplasmique.

Dans les autres cas on utilisera un systeme eucaryote



Systemes d'expression Eucaryotes

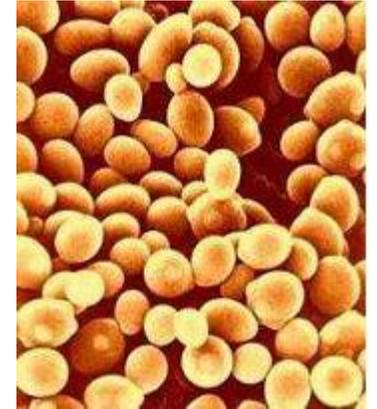
Systemes
d'expression génique

Systèmes d'expression eucaryotes

Les levures sont utilisées depuis l'Antiquité dans l'alimentation humaine, pour la fabrication du pain et des boissons alcoolisées.

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

Les levures



Saccharomyces cerevisiae (levure de boulangerie)

Cette levure présente deux avantages :

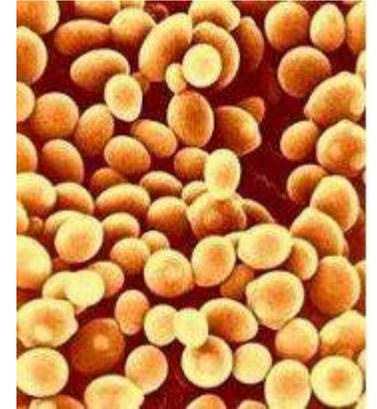
- d'une part, on dispose de vecteurs qui peuvent se maintenir dans les cellules comme des plasmides bactériens,
- d'autre part, on peut facilement intégrer un gène par recombinaison dans le chromosome.

Systèmes d'expression eucaryotes

Les levures sont utilisées depuis l'Antiquité dans l'alimentation humaine, pour la fabrication du pain et des boissons alcoolisées.

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

Les levures



Saccharomyces cerevisiae (levure de boulangerie)

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*

Systemes d'expression eucaryotes

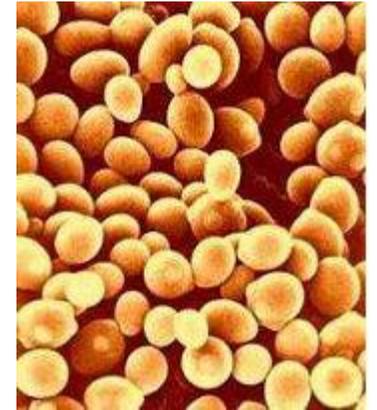
Avantages

- 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.

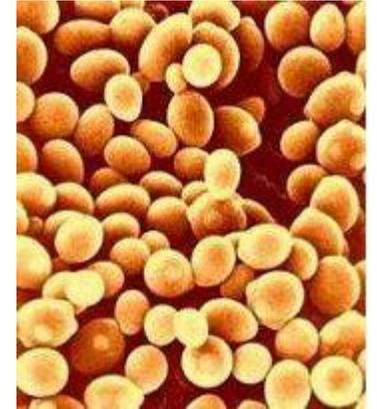
- Les levures offrent également l'avantage d'avoir un matériel génétique simple et de n'être ni pyrogènes, ni pathogènes et constituent ainsi un organisme de choix pour la production de protéines à visée thérapeutique.

Les levures



Systèmes d'expression eucaryotes

Les levures



Inconvénients

- 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.

- Les protéines synthétisées sont souvent obtenues à l'intérieur du cytoplasme et nécessitent de lyser la cellule afin de les récupérer.

Systemes d'expression eucaryotes

Les levures



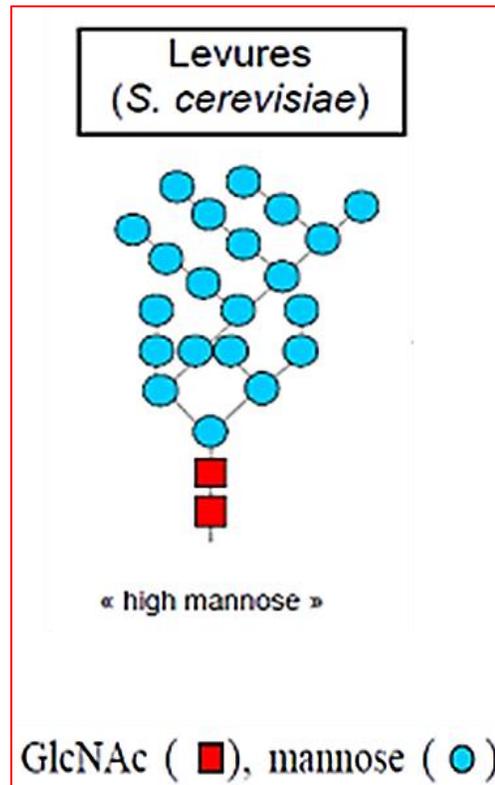
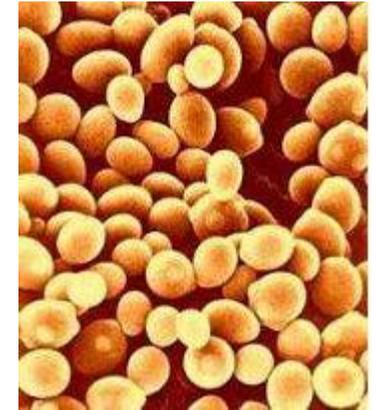
Tableau - Principaux avantages et inconvenients des levures comme systeme d'expression

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none">- Taux de protéines élevé- Souches productrices stables- Coût accessible- Croissance cellulaire élevée- Rendement élevé- Croissance rapide en milieux chimiquement définis- Procédé de production similaire à celui des cellules animales- Formation des ponts disulfures possible- Repliement des protéines possible- Glycosylation possible	<ul style="list-style-type: none">- Glycosylation incomplète (de type <i>High-mannose</i>)- Sécrétion difficile pour les protéines complexes- Niveau d'expression peu élevé

Systèmes d'expression eucaryotes

Les levures

La glycosylation des protéines issues des levures



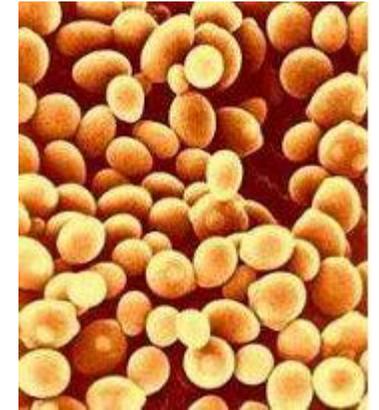
- Les levures sont capables de réaliser certaines modifications post-traductionnelles mais la glycosylation n'est cependant pas identique à celle retrouvée chez l'homme.

- En effet, ces micro-organismes produisent des N-glycannes de type oligomannosidique (high-mannose), « constitués d'une cinquantaine à une centaine de résidus mannoses ».

- Ces glycannes ne ressemblent pas à ceux des cellules animales, si bien que les glycoprotéines produites dans ces systèmes d'expression sont souvent immunogènes pour l'Homme.

Systèmes d'expression eucaryotes

Les levures



Utilisation de *Pichia pastoris* pour la production de protéines recombinantes

Certaines levures sont de meilleurs candidats que *Saccharomyces cerevisiae* pour la production de protéines recombinantes, car ils sont de meilleurs sécréteurs. C'est le cas de la levure méthylotrophe *Pichia pastoris*.

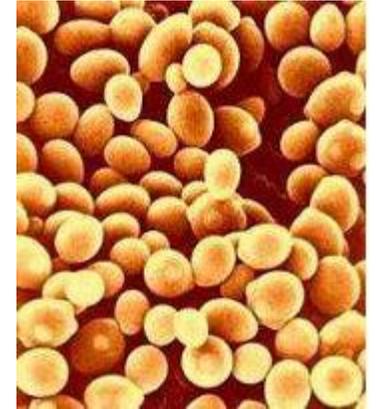
Plus de 400 protéines recombinantes ont été exprimées dans cet hôte, la plupart étant d'origine humaine ou mammalienne.

Le rendement est généralement meilleur que dans *S. cerevisiae*. Le gène d'intérêt peut être placé sous le contrôle du promoteur de l'alcool oxydase (AOX1), réprimé en présence de glucose et inductible en présence de méthanol.

En 2008, le β -amyloïde 1–42 recombinant humain a été synthétisé dans cette levure sous contrôle de ce promoteur (AOX1). Après une simple purification, la protéine fonctionnelle a été obtenue à un rendement de 355 mg/L de milieu de culture

Systèmes d'expression eucaryotes

Les levures



Utilisation de *Pichia pastoris* pour la production de protéines recombinantes

De plus, physiologiquement, *P. pastoris* a recours à la respiration plutôt qu'à la fermentation. Or la fermentation produit de l'éthanol et de l'acide acétique, qui atteignent rapidement des niveaux toxiques dans une culture en cellules à haute densité

Quant à la glycosylation, *Pichia pastoris* peut produire des N-glycannes et des O-glycannes. Les différences dans le nombre et le type de résidus ajoutés par rapport aux cellules humaines pose de gros problèmes d'antigénicité.

toutes ces différences rendent les protéines produites par *P. pastoris* difficilement utilisables en thérapeutique humaine, même si des études d'humanisation de la glycosylation des protéines sont en cours

Systèmes d'expression eucaryotes

Les champignons filamenteux

On utilise principalement deux espèces, *Trichoderma reesei* et *Aspergillus niger*.

Les productions sont très importantes (la cellulase est produite à 30 g/l, l'interleukine à 300 mg/l, la chymosine bovine à 1 g/l et la lactoferrine humaine à 3 g/l). Cette production au stade industriel est due à des mutagenèses aléatoires visant à obtenir des super producteurs.



Généralement on effectue une fusion avec une protéine du champignon pour obtenir la sécrétion de la protéine d'intérêt.

Il y a toutefois plusieurs problèmes :

- Les souches surproductrices sont industrielles et donc ne sont pas disponibles.
- Comme pour *Saccharomyces cerevisiae*, il y a une hyperglycosylation des protéines.
- Les méthodes de transformations sont difficiles.

Systemes d'expression eucaryotes

Necessite la recombinaison homologue pour creer un baculovirus recombinant.

Cette recombinaison se produit entre:

- 1) une version lineaire du genome baculoviral auquel manque un gene permettant la selection (p.ex. gentamicine);
- 2) un vecteur de transfert portant le gene de resistance a la gentamicine ainsi que le gene encodant la proteine d'interet (ce dernier sous le controle du puissant promoteur de la polyhedrine).

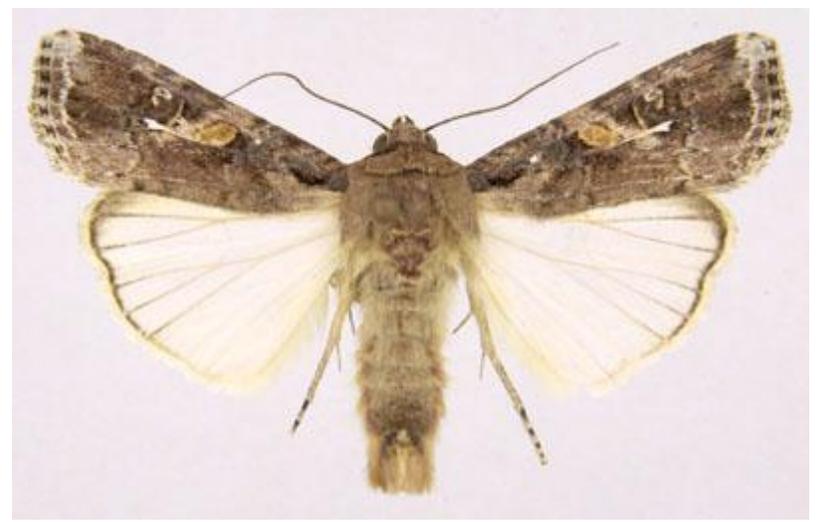
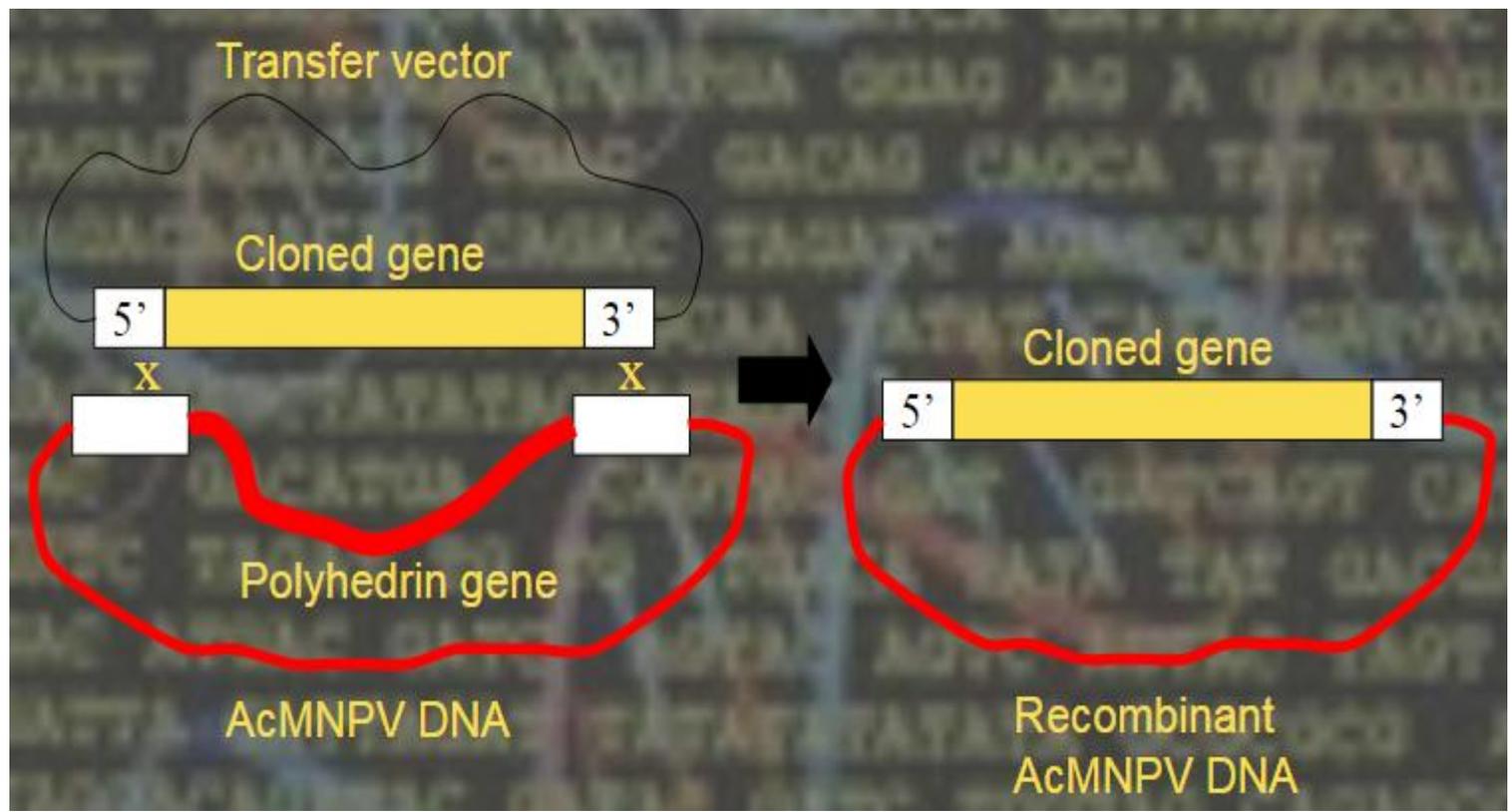
Le virus recombinant est ensuite utilise afin d'infecter des cellules d'insectes. Ces dernieres produiront alors de grandes quantites de la proteine d'interet.

Baculovirus-cellules d'insectes



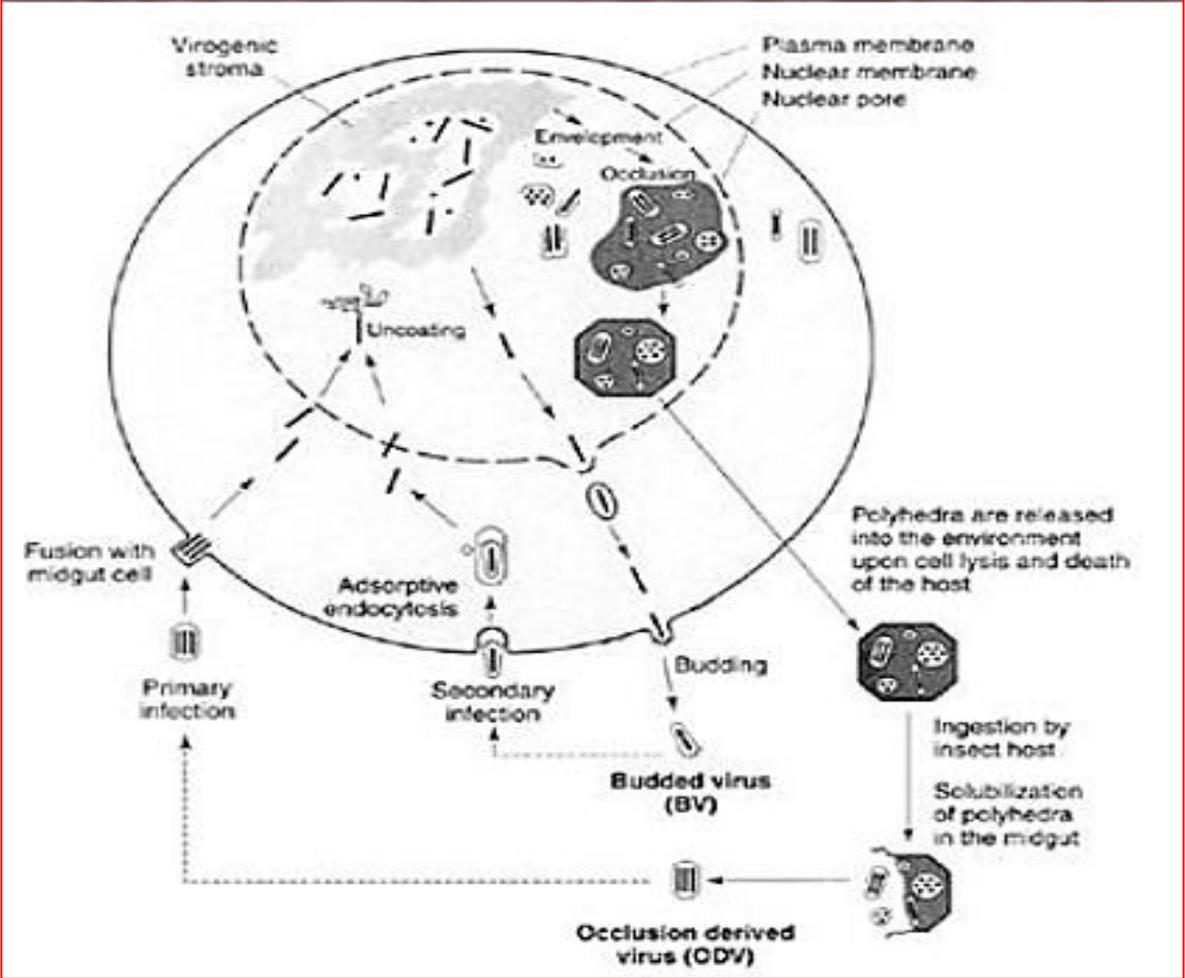
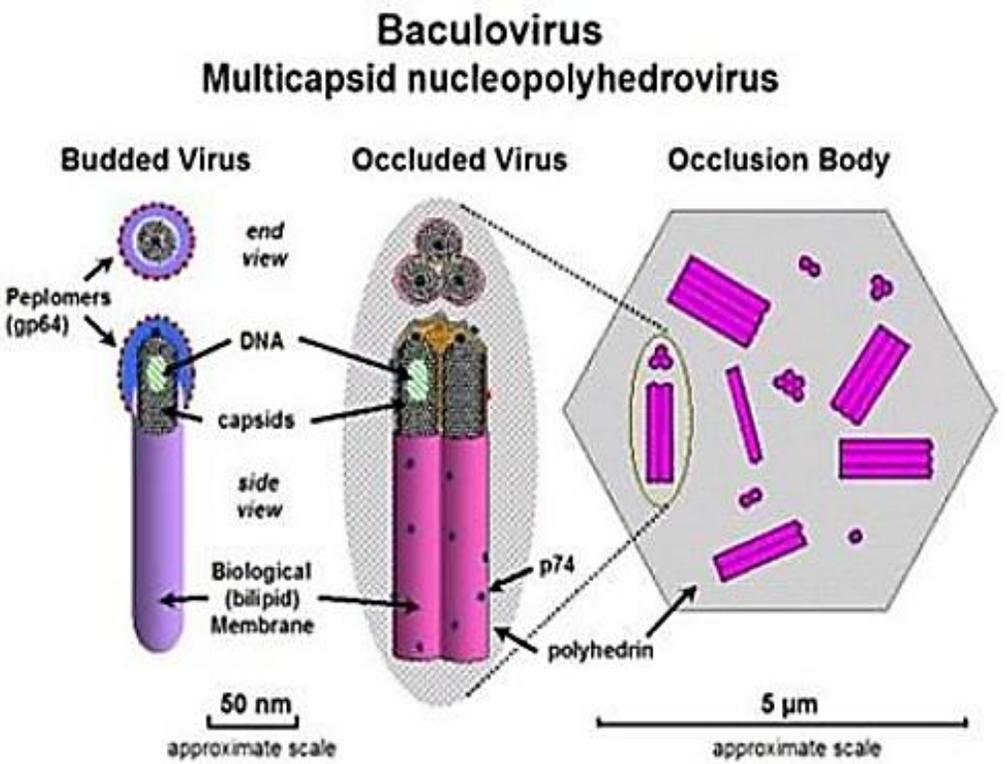
Systemes d'expression eucaryotes

Baculovirus-cellules d'insectes



Systemes d'expression eucaryotes

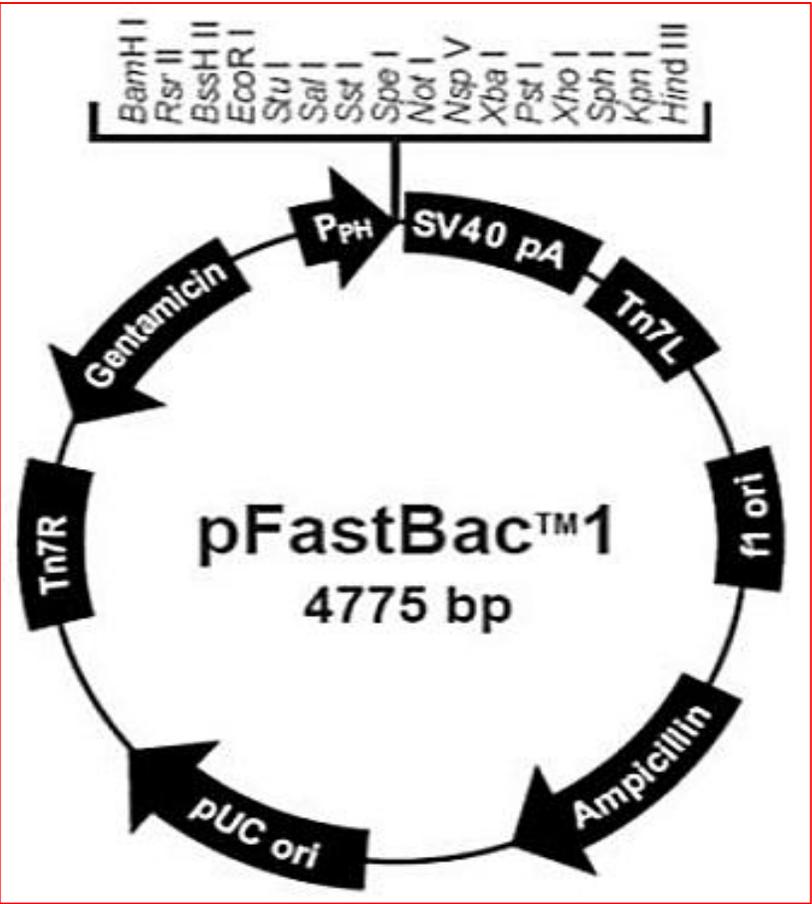
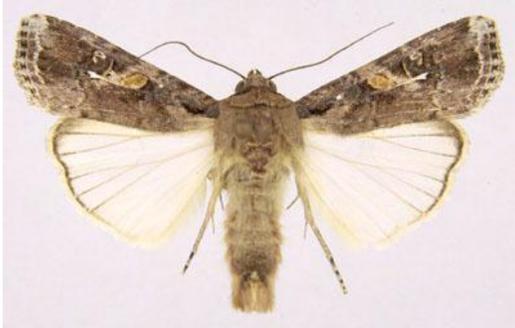
Baculovirus-cellules d'insectes



Systemes d'expression eucaryotes

Baculovirus-cellules d'insectes

Vecteur



PpH: promoteur de la polyhedrine, permettant des niveaux d'expression eleves;

TnTr/TnTL: sequences utilises lors de la recombinaison homologues entre le vecteur de transfert et le genome baculoviral;

Gentamicin: gene de resistance a l'antibiotique gentamicine;

Systèmes d'expression eucaryotes

Avantages

Ce système offre l'avantage de pouvoir obtenir, dans des temps relativement courts, des vecteurs recombinants faciles à sélectionner et de très hauts niveaux d'expression, allant de quelques dizaines à quelques centaines de milligrammes par litre de culture.

Une autre considération importante est liée à la sécurité : aucun virus de vertébrés ne semble se multiplier dans les cellules de lépidoptères employées. Quant au baculovirus, il ne peut accomplir sa multiplication que dans les cellules d'insectes.

L'absence de sérum dans le milieu de culture constitue un avantage non négligeable en terme de coût.

Les cellules présentent également une meilleure tolérance à l'osmolarité et aux coproduits du métabolisme cellulaire.

Baculovirus-cellules d'insectes



Systemes d'expression eucaryotes

Baculovirus-cellules d'insectes

Inconvénients

Un inconvénient majeur réside dans la nécessité de procéder à la réinfection virale à chaque nouvelle culture, compte tenu du cycle lytique du virus.

D'autre part, les cellules d'insectes possèdent les équipements enzymatiques leur permettant d'effectuer la maturation et les modifications post-traductionnelles, mais ces dernières sont cependant très différentes de celles retrouvées chez les eucaryotes supérieurs



Baculovirus-cellules d'insectes



Tableau - Principaux avantages et inconvenients du systeme d'expression baculovirus/cellules d'insecte

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none">- Modifications posttraductionnelles- Repliement des proteines possible- Titres eleves de proteine- <i>Scale-up</i> facile- Sécurité (pas d'agents pathogenes)- Proteines complexes- Clivage efficace des peptides signaux- Expression de genes multiples simultanement	<ul style="list-style-type: none">- Glycosylation de type oligomannose ou paucimannose- Nécessité de réinfection virale à chaque culture- Augmentation de la mort cellulaire après infection virale- Production de la proteine dans un milieu de culture avec potentiellement des proteases et des glycosidases- Titre en virus faible- Pas de lignee stable pour l'industrie

Systèmes d'expression eucaryotes

L'émergence de la culture de cellules animales a commencé avec la production de tPA (tissue Plasminogen Activator, Activase®) par la société Genentech en 1987.

Le marché des protéines recombinantes produites par ce système d'expression dépasse aujourd'hui 20 milliards de dollars annuels et représentant 60 à 70% des protéines thérapeutiques disponibles.

La plupart sont exprimées dans **les cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO)**, mais aussi dans d'autres lignées telles que les cellules de **rein de hamster nouveau-né BHK (Baby Hamster Kidney)**, les cellules de **myélomes de souris** comme les cellules **NSO** et **Sp2/0**, les cellules **rénales d'embryons humains (HEK-293)**, les cellules **humaines issues de carcinome cervical HeLa**, les cellules de **rétine humaine...**

Les cellules animales



Systemes d'expression eucaryotes

On peut distinguer trois grands types d'expression:

Par infection virale

Expression transitoire

Etablissement d'une lignée stable

les cellules sont infectées ou transfectées et analysées quelques jours après

l'ADN injecté est incorporé au chromosome

Les cellules animales



Systèmes d'expression eucaryotes

On peut distinguer trois grands types d'expression:

Par infection virale

L'SV40, Le BPV (Bovine Papilloma Virus), Les lentivirus, Le virus de la vaccine, les rétrovirus, Les alphavirus, Les adenovirus,...

Les premiers vecteurs viraux ont été fabriqués à partir du **virus tumorigène simien SV40**. Ce virus est petit (5 kb) et ne peut pas s'accommoder de séquence supplémentaire importante.

Il faut donc remplacer quelques gènes viraux par le gène d'intérêt. Mais ces gènes sont indispensables pour la viabilité du virus.

On transfecte donc la cellule avec deux virus SV40 : le virus recombinant portant le gène d'intérêt et un virus muté à un autre endroit du génome.

Les deux virus se complètent et on obtient un stock viral comportant les deux virus.

Les cellules animales



Systèmes d'expression eucaryotes

On peut distinguer trois grands types d'expression:

Par infection virale

Les adenovirus sont des virus à ADN double brins linéaires de 36 kb. Ils causent chez l'homme des infections des voies respiratoires ou des conjonctivites.

On peut utiliser des virus atténués comme vecteur en clonant l'ADN d'intérêt derrière un promoteur fort.

L'introduction de l'ADN se fait par un premier clonage dans un plasmide puis par une recombinaison in vivo comme pour le cas du baculovirus ou du virus de la vaccine.

L'avantage de ce virus est que l'expression peut se faire dans un grand nombre de cellules humaines. Ainsi, les modifications post-traductionnelles caractéristiques des cellules humaines sont respectées. L'expression est souvent élevée, jusqu'à 10-20% des protéines cellulaires.

Les cellules animales

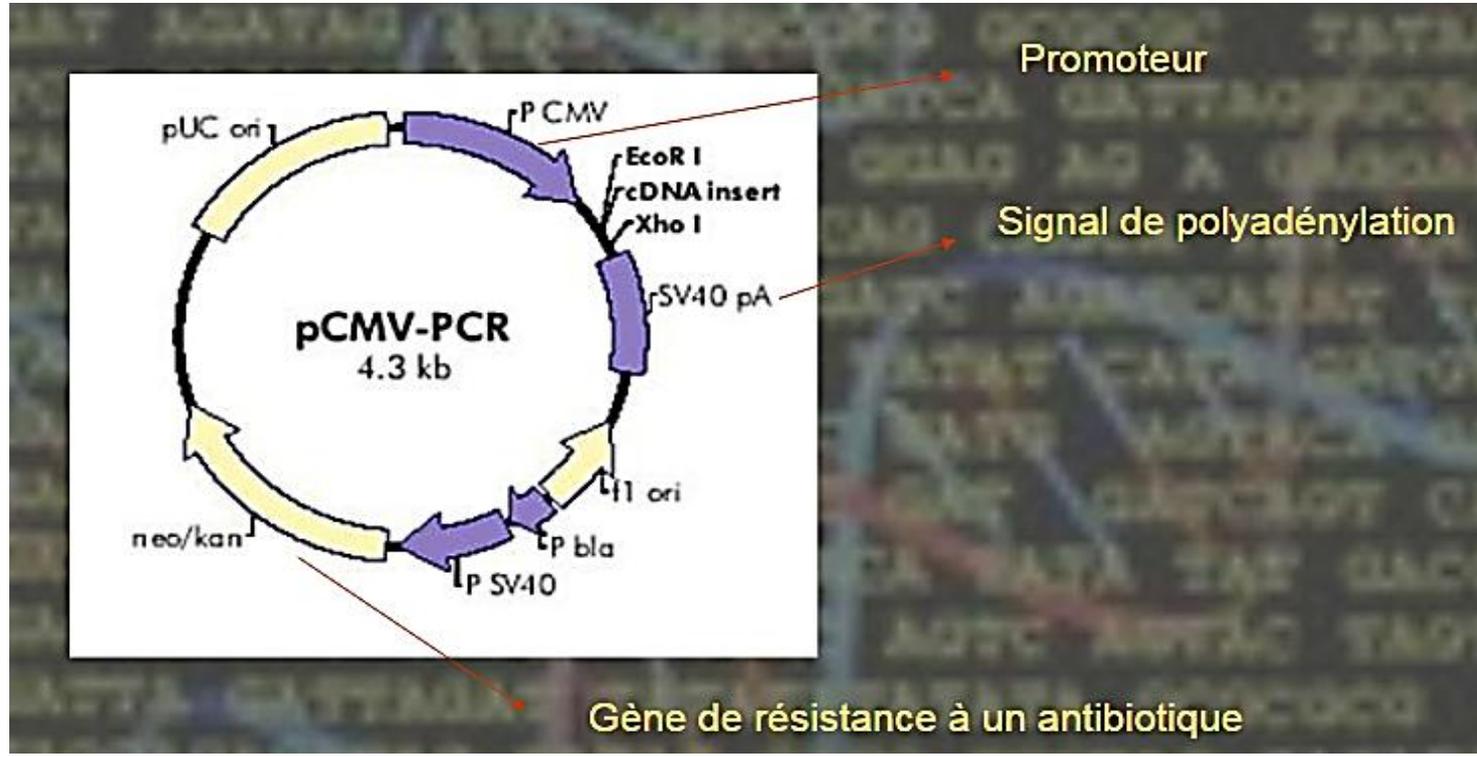


Systemes d'expression eucaryotes

On peut distinguer trois grands types d'expression:

Expression transitoire

Les cellules animales



Promoteur

Signal de polyadénylation

Gène de résistance à un antibiotique

Systemes d'expression eucaryotes

On peut distinguer trois grands types d'expression:

Les cellules animales

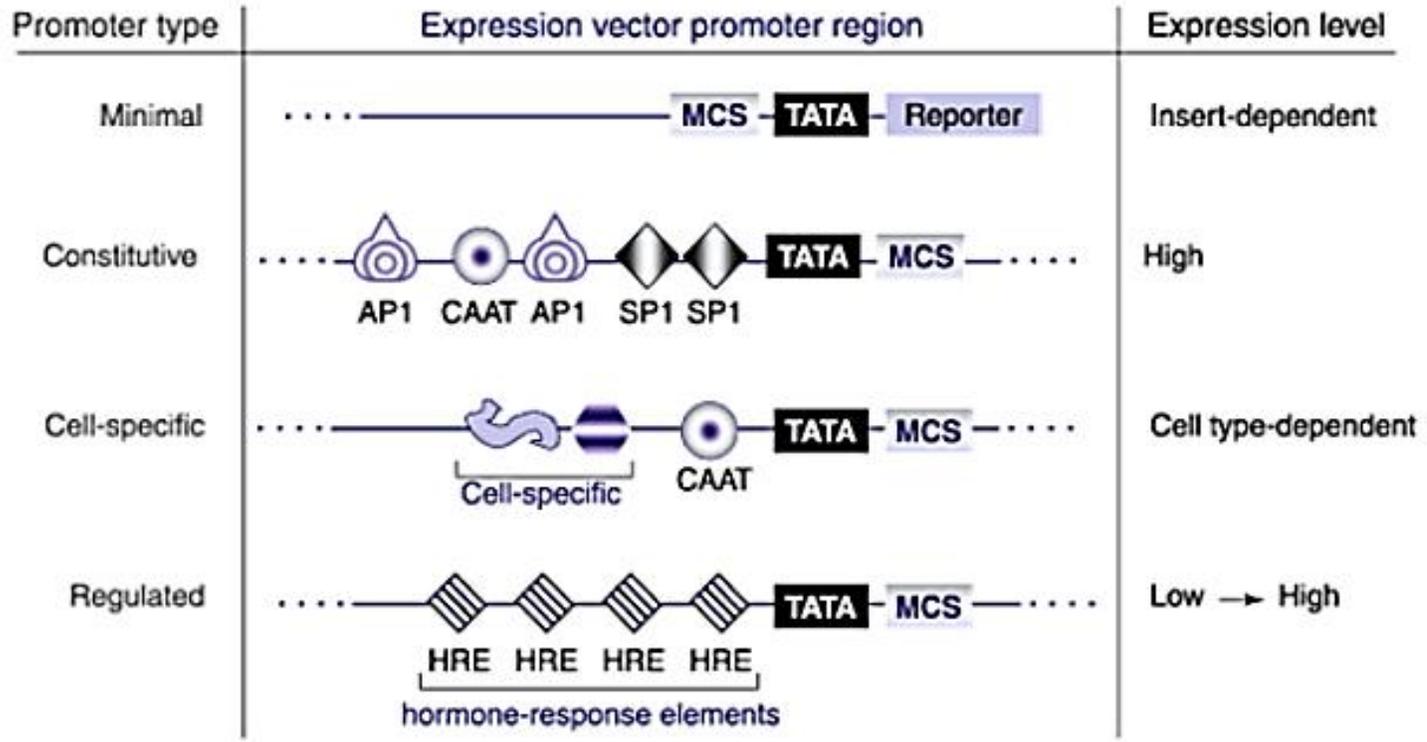


TABLE 12-1
Dominant Selectable Markers Used in Transfection Experiments

ENZYME (abbreviation)	DRUG FOR SELECTION	SELECTION MECHANISM
Aminoglycoside phosphotransferase (APH)	G418 (inhibits protein synthesis)	APH inactivates G418
Dihydrofolate reductase (DHFR): Mtx-resistant variant	Methotrexate (Mtx; inhibits DHFR)	Variant DHFR resistant to Mtx
Hygromycin-B-phosphotransferase (HPH)	Hygromycin-B (inhibits protein synthesis)	HPH inactivates hygromycin-B
Thymidine kinase (TK)	Aminopterin (inhibits de novo purine and thymidylate synthesis)	TK synthesizes thymidylate
Xanthine-guanine phosphoribosyltransferase (XGPRT)	Mycophenolic acid (inhibits de novo GMP synthesis)	XGPRT synthesizes GMP from xanthine
Adenosine deaminase (ADA)	9- β -D-xylofuranosyl adenine (Xyl-A; damages DNA)	ADA inactivates Xyl-A

Systemes d'expression eucaryotes

On peut distinguer trois grands types d'expression:

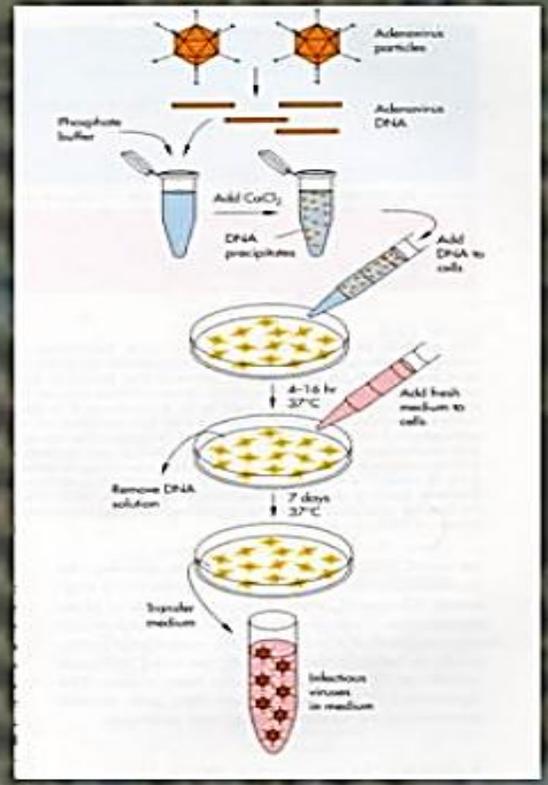


Les cellules animales

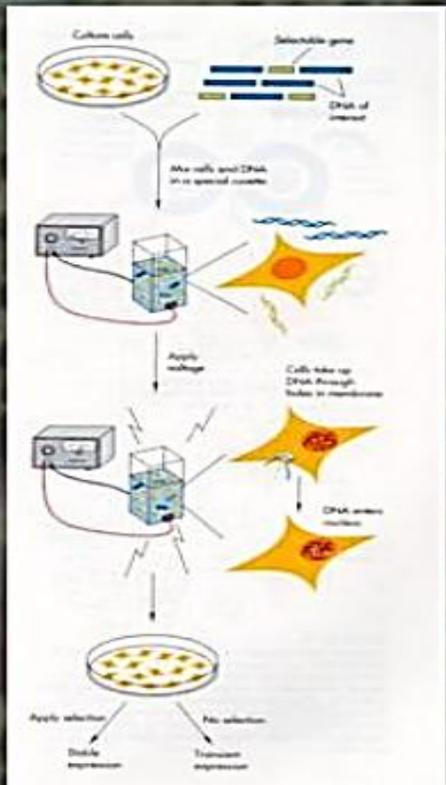


Methodes de transfection

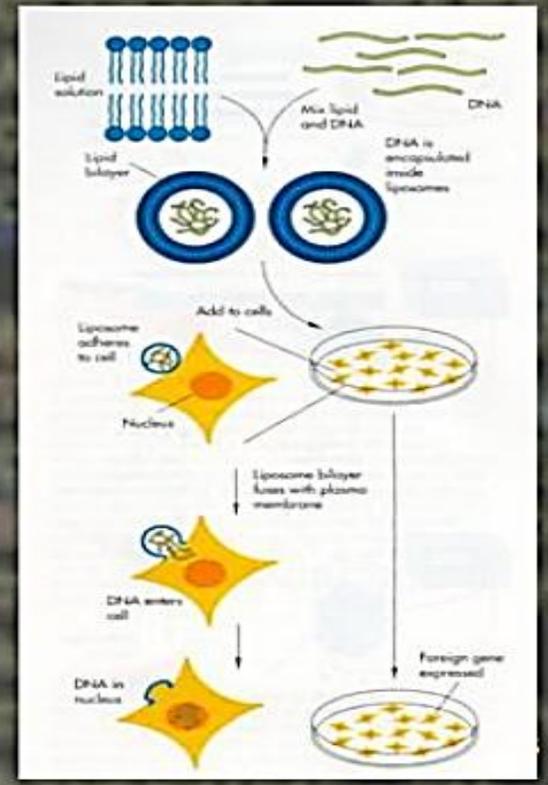
Preecipitation au phosphate de calcium



Electroporation



Lipofection



Methodes de transfection

- Le choix de la methode a employer depend de plusieurs considerations:
 - Le type de molecule a transférer (oligonucléotide, RNA, DNA);
 - La lignée cellulaire (en suspension, adhérente, cultures primaires vs lignées établies);
 - Les applications éventuelles (importance relative de l'efficacité de transfection).

Les cellules animales



Systemes d'expression eucaryotes

Avantages

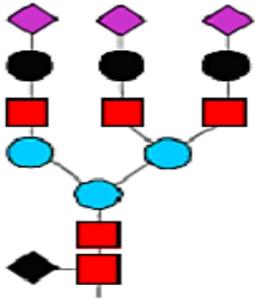
Les cellules animales se prêtent bien à la culture en masse en bioréacteurs, même si les rendements en protéines recombinantes sont plus faibles qu'avec les bactéries ou les levures, soit de l'ordre de 5 à 10 milligrammes par litre de milieu.

les cellules CHO sont capables de synthétiser des protéines complexes, de poids moléculaire élevé, correctement repliées, et possédant les modifications post-traductionnelles très proches de celles retrouvées sur les protéines humaines.

Les cellules animales



Cellules de mammifères



« complexe »

Systemes d'expression eucaryotes

Avantages

Leur physiologie est relativement bien connue et l'optimisation des rendements fait l'objet de nombreuses études.

Parallèlement au développement de vecteurs toujours plus puissants, il est notamment possible de travailler sur le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose, afin d'augmenter la productivité et d'améliorer la qualité des protéines recombinantes synthétisées.

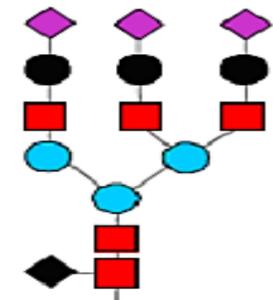
Des travaux portant sur l'amélioration de la composition du milieu de culture (Allen et al., 2008) ou sur le contrôle de l'expression des gènes endogènes (Warner, 1999) sont également menés.

Les améliorations récentes portent aussi sur la sécurité sanitaire : la tendance est au remplacement de substances d'origine animale dans le milieu par des substances végétales afin de limiter les risques de contamination.

Les cellules animales



Cellules de mammifères



« complexe »

Systemes d'expression eucaryotes

Les cellules animales

Inconvénients

Les cellules animales sont relativement exigeantes en éléments nutritifs, et la culture est délicate, limitée et coûteuse.

En effet, les investissements requis pour mettre en place une unité de fermentation de cellules mammifères sont importants (environ 200 millions \$US pour une capacité de 200 kg d'anticorps annuelle)



Systemes d'expression eucaryotes

Cellules de mammifères

•Avantages:

- Modifications post-traductionnelles appropriées
- Pré-ARNm est modifié de manière appropriée;

•Désavantages:

- Croissance lente
- Requiert un expertise particulière pour la culture de cellules de mammifères
- Coûteux;
- Les protéines purifiées peuvent être contaminées par des microorganismes;

Les cellules animales



Systemes d'expression eucaryotes

Protéines recombinantes produites dans des cellules CHO, dont la commercialisation a été approuvée par la FDA

Les cellules animales



Médicament	Protéines	Applications thérapeutiques	Compagnies	FDA autorisation
Recothrom™	Trombine α	Cicatrisation plaies chirurgicales	Zymogenetics	2008
Xyntha™	facteur VIII	Hémophilie A	Wyeth	2008
Vectibix™	Anti-EGFR mAb	Cancer colorectal métastatique	Amgen	2006
Myozyme™	α -glucosidase	Maladie de Pompe	Genzyme	2006
Aldurazyme™	Laronidase	Mucopolysaccharidose I	Genzyme	2006
Hylenex™	Hyaluronidase	Augmente l'absorption des autres médicaments	Halozyme Therapeutics	2005
Orencia®	Ig-CTLA4 fusion	polyarthrite rhumatoïde	Bristol-Myers Squibb	2005
Naglazyme™	N-acétylgalactosamine-4-sulfatase	Mucopolysaccharidose VI	Biomarin Pharmaceutical	2005
Luveris®	Hormone lutéinisante	Infertilité	Serono	2004
Avastin™	Anti-VEGF mAb	Cancer colorectal métastatique et de la langue	Genentech	2004
Advate™	Facteur VIII	Hémophilie A	Baxter	2003
Xolair™	Anti-IgE mAb	Asthme	Genentech	2003
Raptiva™	Anti-CD11a mAb	Psoriasis chronique	Genentech	2003
Fabrazyme™	α -galactosidase	Maladie de Fabry	Genzyme	2003

Systemes d'expression eucaryotes

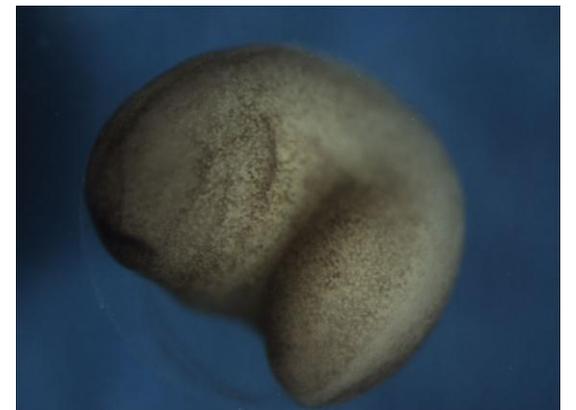
On peut faire exprimer une protéine par l'ovocyte de Xénope en injectant de l'ADN dans le noyau.

Le noyau est situé au 2/3 du pôle animal et n'est pas visible sur l'ovocyte vivant.

Pour pouvoir injecter l'ADN on centrifuge doucement (200-400 g) pendant 5 min. Le noyau plus dense que le cytoplasme se déplace vers le pôle animal jusqu'à le toucher. On observe alors une décoloration au pôle animal qui nous permet de le localiser.

On injecte environ 10 nl d'ADN. Le gène d'intérêt est cloné derrière un promoteur eucaryote fort. Il y a alors transcription puis traduction.

L'ovocyte de Xénope



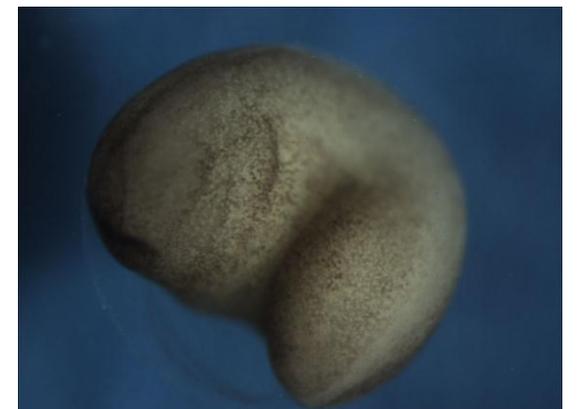
Systemes d'expression eucaryotes

Les avantages et inconvénients du système sont les mêmes que ceux énoncés pour l'injection d'un ARNc, c'est à dire **peu de protéines** sont produites **mais** cette protéine est **active**. On va donc l'utiliser principalement pour exprimer des **récepteurs**.

Par rapport à l'injection d'un ARNc, il y a plusieurs **avantages**: c'est plus facile à réaliser puisque la transcription in vitro n'est plus nécessaire de plus, on obtient généralement plus de protéines.

Toutefois il y a aussi des **désavantages** : la production est très variable selon les ovocytes, certains produisent beaucoup de protéines alors que d'autres n'en produisent que très peu. Cette variabilité est sans doute due au moins en partie à la centrifugation et à l'injection dans les noyaux qui peut les abîmer.

L'ovocyte de Xénope



Systemes d'expression eucaryotes

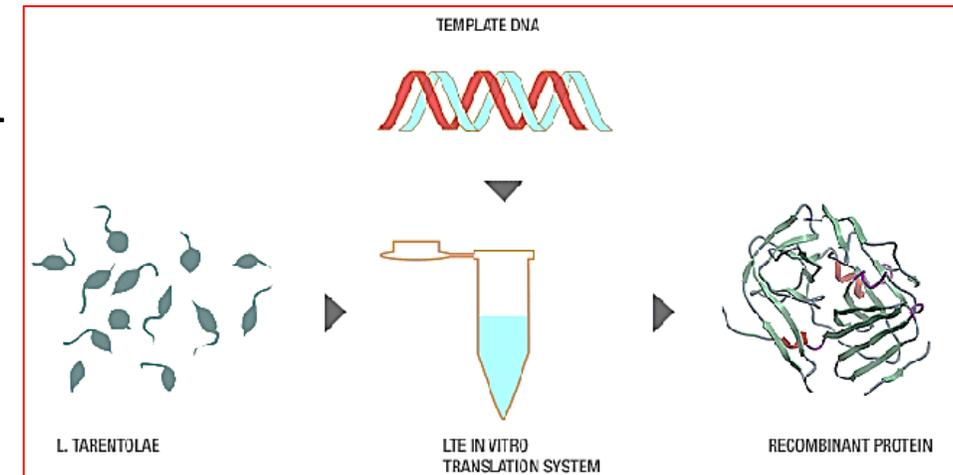
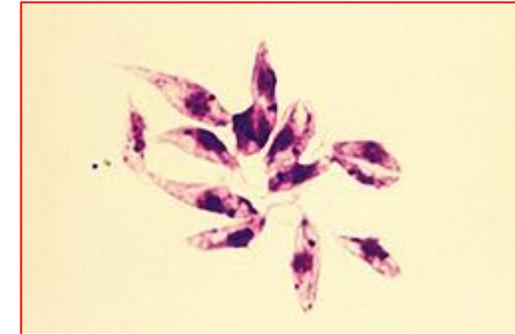
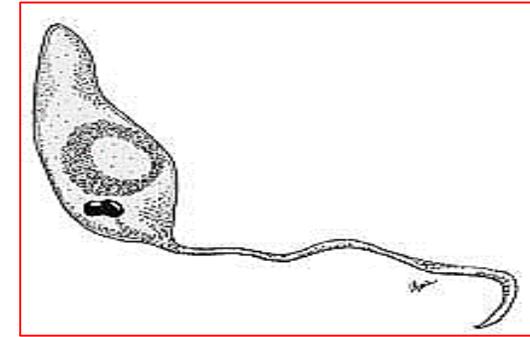
Expression dans des eucaryotes unicellulaires

Exemple de l'utilisation de **Leishmania tarentolae**, un **Kinetoplastidae non pathogene**. Ce systeme a ete developpe par une compagnie, JenaBioScience.

Le gene est introduit par transfection et maintenu soit sous forme episomale soit par integration dans le genome.

Les proteines sont produites avec les **maturations post-traductionnelles des eucaryotes**.

Avantage du systeme : la culture est facile dans un milieu peu cher.



Systemes d'expression eucaryotes

Les recherches sur la transgenese animale ont debuté en 1980, avec l'obtention des premieres souris transgeniques (Gordon et al., 1980).

Aujourd'hui, les techniques du genie genetique ont rendu possible la production de proteines recombinantes, et leur adressage, en particulier dans le lait de l'animal.

L'operation consiste à :

- Isoler le gene codant pour la proteine d'interet, à l'associer à des elements regulateurs (sous le controle du promoteur des genes codant pour de la caséine par exemple) capables de diriger sa synthese et sa secretion.
- Ensuite le gene peut être introduit par exemple (plusieurs methodes existent) par microinjection dans les pronoyaux des embryons au stade une cellule.

Les animaux transgeniques



Systemes d'expression eucaryotes

Les animaux transgeniques

Plusieurs especes d'animaux transgeniques peuvent produire des proteines recombinantes mais actuellement deux systemes sont exploites:

1/ Le premier consiste à produire la protéine dans **le lait des animaux transgéniques** de Ferme → Ce système est étudié depuis 20 ans. Il a permis la mise en marché de **l'antithrombine III humaine**, en 2006.

L'entreprise française BioProtein Technologies (créée en 1998) s'est spécialisée dans la production à la demande de **protéines recombinantes dans le lait de lapines transgéniques**, pour des entreprises **pharmaceutiques, de biotechnologies ou pour des laboratoires publics**.



Systemes d'expression eucaryotes

Les animaux transgeniques

Plusieurs especes d'animaux transgeniques peuvent produire des proteines recombinantes mais actuellement deux systemes sont exploites:

2/ Dans le second systeme, la proteine est produite dans **le blanc d'oeuf de poules transgeniques.**

→ Ce systeme est devenu recemment plus attractif suite a l'amelioration des methodes d'obtention d'oiseaux transgeniques (Houdebine, 2008).

Deux **anticorps monoclonaux** et **l'interferon- β 1a humain** ont ete produits dans **le blanc d'oeuf de poule**



Systemes d'expression eucaryotes

Les animaux transgéniques

Plusieurs espèces d'animaux transgéniques peuvent produire des protéines recombinantes mais actuellement deux systèmes sont exploités:

La production de protéines recombinantes dans **le sang, le plasma séminal, les urines** (Houdebine, 2000), **les glandes séricigènes des vers à soie** (Royeret al., 2005), **l'hémolymphe des larves d'insectes** (Markakiet al., 2007) sont d'autres systèmes théoriquement exploitables mais **moins développés à l'heure actuelle**.



Systemes d'expression eucaryotes



Les animaux transgéniques



Plusieurs espèces de mammifères sont couramment étudiées et utilisées pour la production de protéines recombinantes dans leur lait : **lapines, truies, brebis, chèvres, et vaches.**



Systemes d'expression eucaryotes

Les animaux transgéniques

Les lapines offrent un grand nombre **d'avantages** :

- génération facile de fondateurs et de progénitures transgéniques,
- grande fertilité,
- production relativement importante de lait,
- insensibilité aux maladies à prions → pas de transmissions de maladies sévères à l'homme.



Les ruminants sont potentiellement mieux appropriés pour une grande production de protéines, mais:

- Les étapes de clonage ou d'utilisation de vecteurs lentiviraux pour l'intégration d'ADN étranger sont fastidieuses,
- leur reproduction est relativement lente.
- De plus, ils ne glycosylent pas les protéines aussi bien que les lapines ou les truies,
- et sont sensibles aux maladies à prions

Systemes d'expression eucaryotes

Inconvénients

- Des effets secondaires indésirables que peut avoir la protéine sur les animaux transgéniques. Par exemple:
 - le gène de l'hormone de croissance humaine associé au promoteur WAP (Whey Acidic Protein) de lapin s'exprime en dehors de la glande mammaire et peut perturber la croissance et la reproduction des animaux.
 - De même, le gène de l'érythropoïétine (EPO) humain exprimé dans ces mêmes conditions altère gravement la santé des lapins qui la produisent.

Les animaux transgéniques



Systemes d'expression eucaryotes

Inconvénients

- la purification de la protéine recombinante en quantités commercialement viables, qui est une étape délicate, compte-tenu de la complexité de la composition du lait. Ceci dépend aussi du lieu d'expression de la protéine : dans la phase aqueuse du lait ou dans la membrane des globules gras.
- La production de protéines recombinantes dans le lait d'animaux transgéniques se heurte également à des niveaux d'investissements très lourds, puisque le coût de la production d'un animal transgénique peut être estimé entre 20 et 300 milliers de dollars (selon l'animal)

Les animaux transgéniques



Systemes d'expression eucaryotes

Inconvenients

- Un probleme lie a certaines modifications post-traductionnelles: La glande mammaire peut exprimer 2g de proteines recombinantes par litre de lait → A des concentrations plus elevees, les proteines ne sont pas correctement glycosylees (machinerie cellulaire saturée).

Par exemple: **l'inhibiteur humain C1** produit dans le lait de lapine et **des anticorps monoclonaux** secretes dans le blanc d'oeuf ne contiennent pas d'acide sialique (ou non completement sialyle).

→ Ces modifications au niveau de la glycosylation peuvent engendrer une diminution du temps de demi-vie de la molecule et peuvent compliquer l'utilisation clinique. Dans d'autres cas, il peut en resulter des problemes d'ordre immunitaire (generalement tres antigeniques pour l'homme)

Les animaux transgeniques



Systèmes d'expression eucaryotes

Inconvénients

Malgré ces quelques inconvénients, il existe des cas de production de protéines par ce biais qui ont très bien fonctionné. Par exemple, **la métalloprotéine superoxyde dismutase humaine** produite dans **le lait de lapines transgéniques** a été produite sous forme **active** et **tétramérique**, normalement **glycosylée** et **associée à l'ion cuivre**

Les animaux transgéniques



Systemes d'expression eucaryotes

Les animaux transgeniques

Protéines recombinantes en phase cliniques produites par des animaux transgeniques

Protéines	Espèces animales	Applications	Compagnies
Antithrombine III* [#]	Brebis	Thrombose, Embolie pulmonaire	GTC Biotherapeutics (USA)
tPA	Brebis	Thrombose	PPL Therapeutics (UK)
α -antitrypsine*	Chèvre	Emphysème, Cirrhose	PPL Therapeutics (UK)
Facteur IX*	Chèvre	Hémophilie b	PPL Therapeutics (UK)
Facteur VIII*	Chèvre Truie	Hémophilie a	PPL Therapeutics (UK)
Anticorps polyclonaux*	Vache	Vaccins	Hematech (USA)
Lactoferrine*	Vache	Bactéricide	Pharming Group (NED)
C1 inhibitor* ^Δ	Lapine	Angioedème héréditaire	Pharming Group (NED)
Calcitonine	Lapine	Ostéoporose, hypercalcémie	PPL Therapeutics (UK)



Systemes d'expression eucaryotes

Pour transformer une cellule végétale, le plus facile est d'utiliser **Agrobacterium tumefaciens**.

Cette bactérie infecte certaines plantes, et les cellules infectées ont acquis la capacité de croître de façon indépendante et non régulées (elles sont transformées).

Ces cellules sont capables de se développer en culture même sans hormone et même en l'absence de la bactérie.

Les plantes transgéniques



Systemes d'expression eucaryotes

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie très répandue retrouvée naturellement dans le sol.

Elle est responsable de la galle du collet et a la capacité d'introduire de nouveaux matériels génétiques dans une cellule végétale.

Le matériel génétique introduit est appelé un T DNA et est situé sur un plasmide Ti.

Un plasmide Ti est un morceau d'ADN circulaire retrouvé dans presque toutes les bactéries.

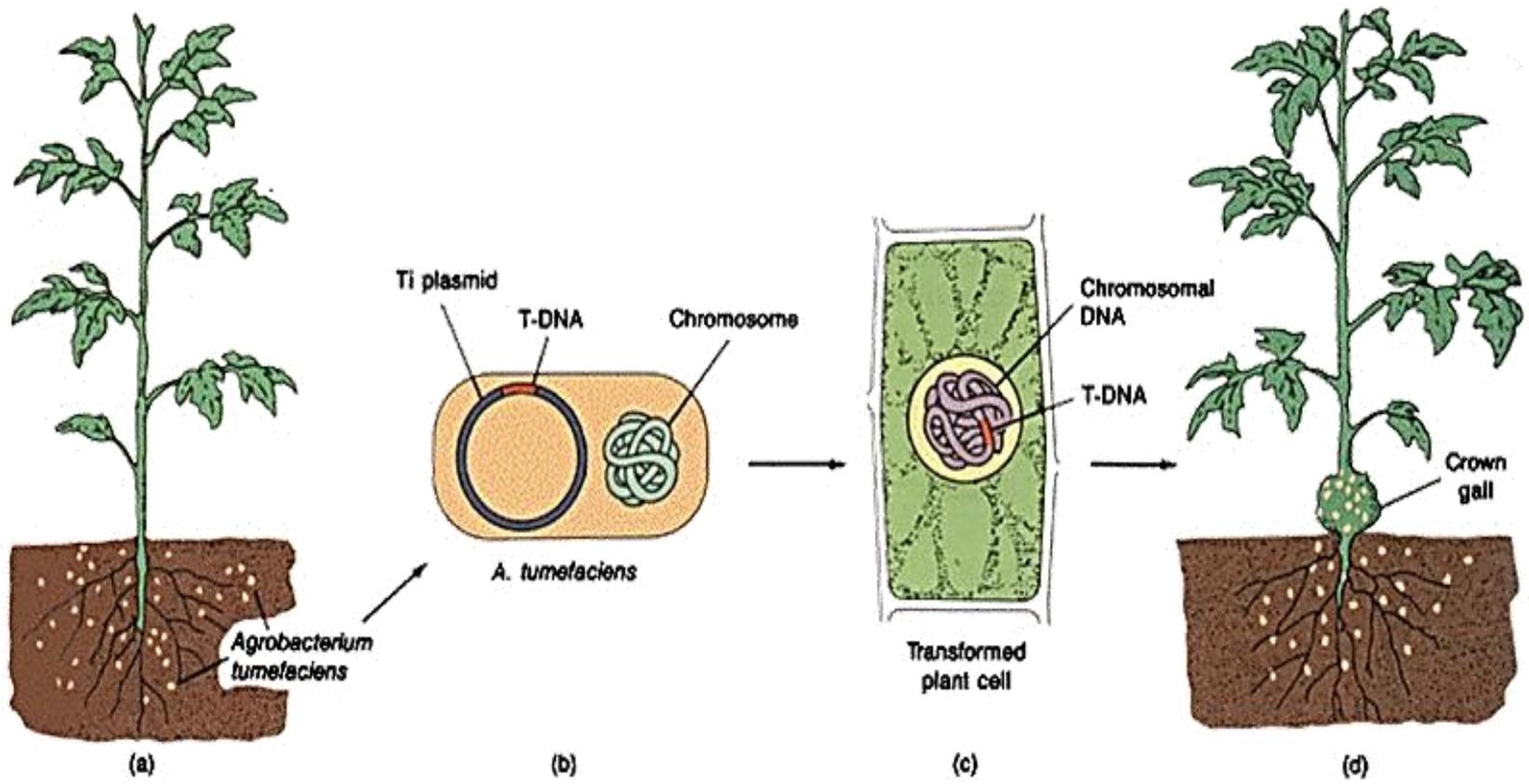
Les chercheurs croyaient avant que l'Agrobacterium affectait uniquement les dicotylédones mais il a été plus tard prouvé qu'elle peut être également utilisée pour la transformation des monocotylédones telles que le riz.

Les plantes transgéniques



Systemes d'expression eucaryotes

Les plantes transgeniques



Systemes d'expression eucaryotes

Au cours de la transformation, plusieurs éléments du plasmide Ti permettent un transfert effectif des gènes d'intérêt dans les cellules de la plante cible. Ce sont entre autres :

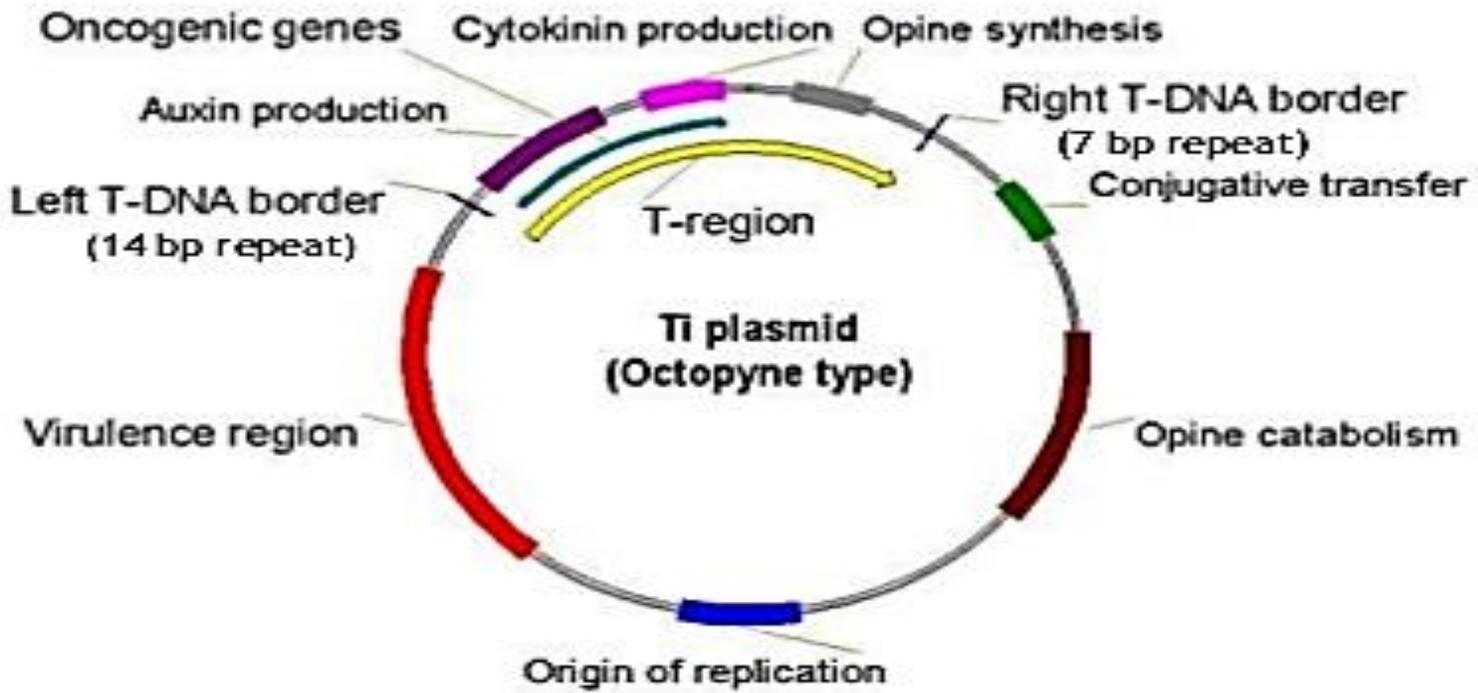
- Les séquences bordures de l'ADN-T qui délimitent le segment d'ADN (ADN-T) à transférer dans le génome de la plante.
- Les gènes vir (gènes de virulence) qui sont nécessaires au transfert de la région de l'ADN-T dans la plante mais sans être eux-mêmes transférés.
- et la région modifiée de l'ADN-T où les gènes qui causent la galle du collet sont enlevés et remplacés par les gènes désirés.

Les plantes transgéniques



Systemes d'expression eucaryotes

Ti Plasmid



Les plantes transgeniques



Systèmes d'expression eucaryotes

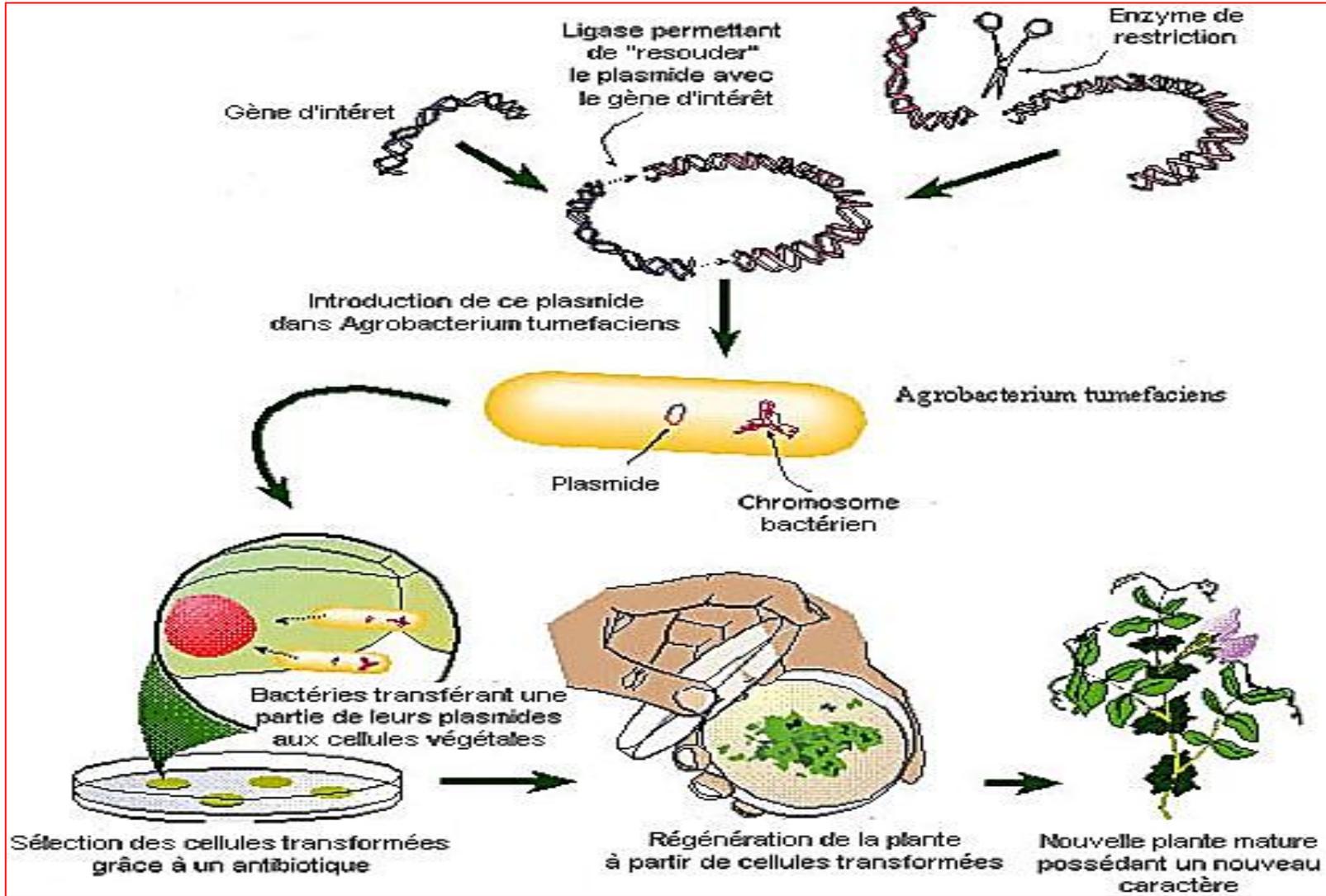
Processus de transformation végétale utilisant l'Agrobacterium comprend un certain nombre d'étapes :

- (a) l'isolation des gènes désirés de l'organisme source ;
- (b) l'élaboration d'une plateforme fonctionnelle transgénique incluant le gène cible, les promoteurs pour coder l'expression du caractère, la modification du codon, si nécessaire pour réussir à améliorer la production de protéine et les gènes marqueurs pour faciliter le traçage des gènes introduits dans la plante hôte ;
- (c) l'introduction du transgène dans le plasmide-Ti ;
- (d) l'introduction de l'ADN-T contenant le plasmide dans l'Agrobacterium;
- (e) le mélange du Agrobacterium avec les cellules de la plante afin de permettre le transfert de l'ADN-T dans les chromosomes de la plante ;
- (f) la régénération des cellules GM en plantes génétiquement modifiées (GM)
- (g) l'évaluation de la performance du caractère ou de l'expression du transgène aux niveaux du laboratoire, de la serre et du champ.

Les plantes transgéniques

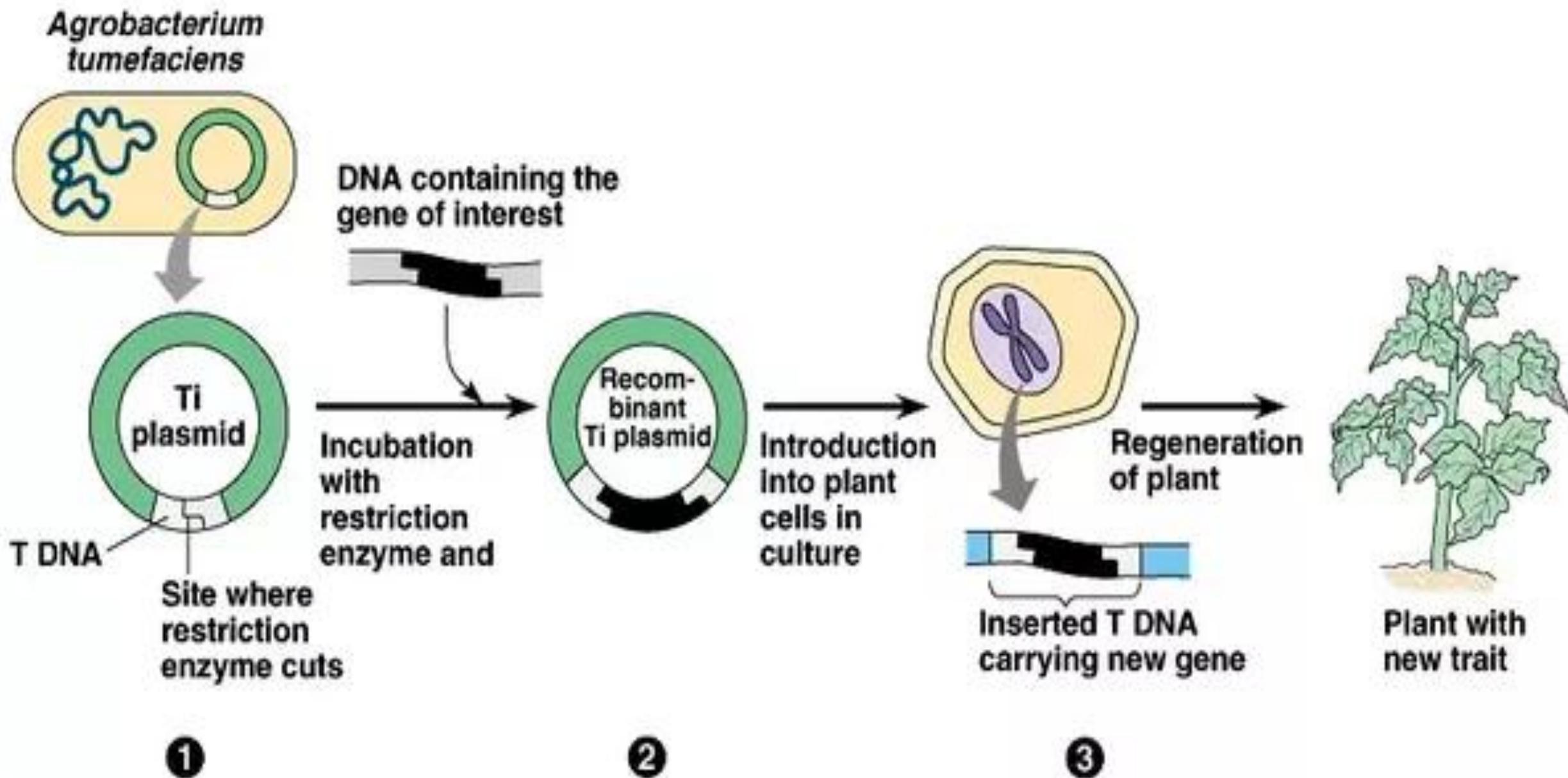


Systemes d'expression eucaryotes



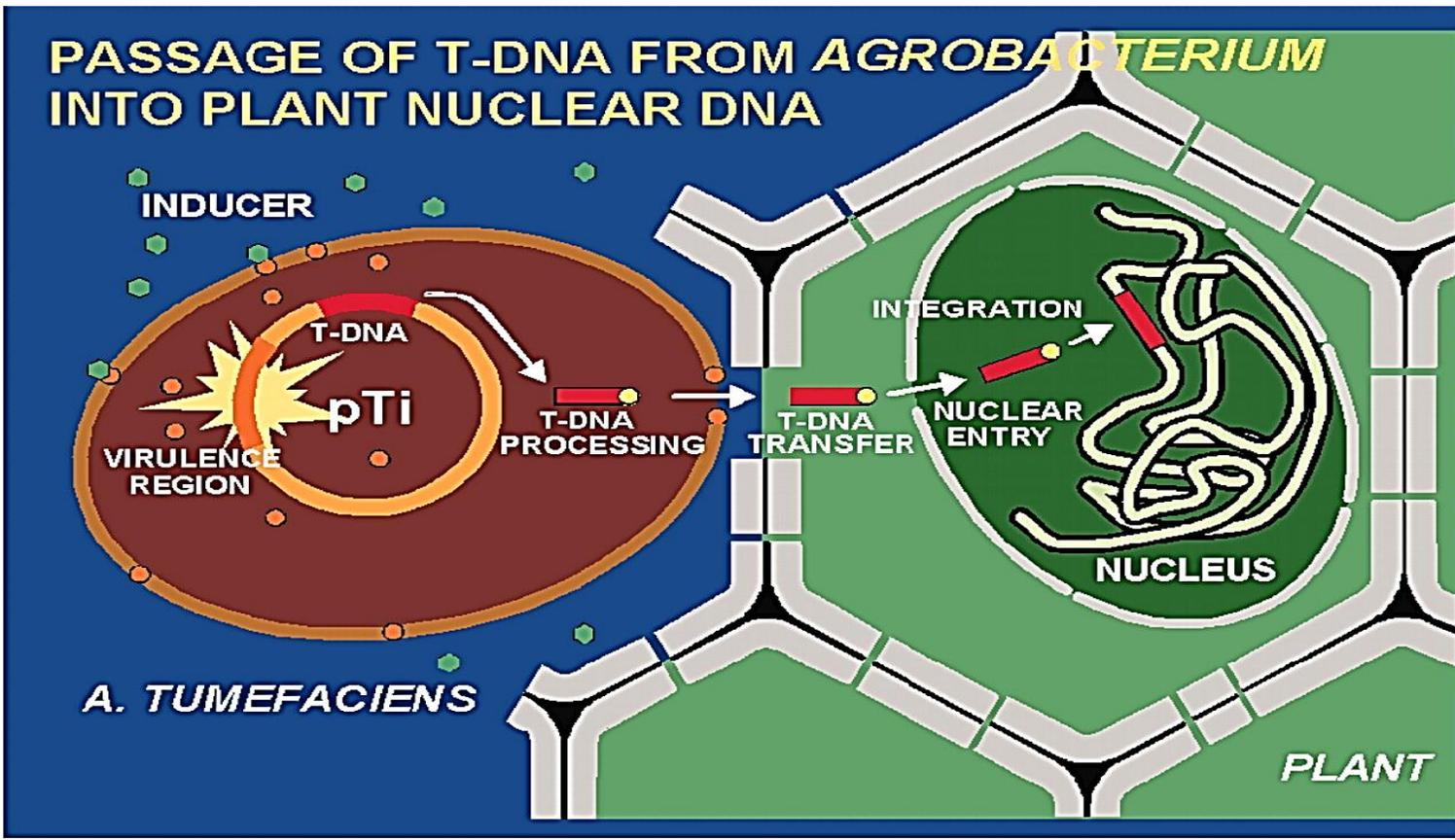
Les plantes transgéniques





Systemes d'expression eucaryotes

Les plantes transgeniques



La Figure illustre la modification végétale grâce à l'Agrobacterium.



Systèmes d'expression eucaryotes

Actuellement, la transformation grâce à l'Agrobacterium est la méthode la plus utilisée dans le génie génétique à cause essentiellement de son niveau élevé d'efficacité.

Avantage de l'expression dans les cellules végétales. Ces cellules se multiplient facilement.

En effet, même si les rendements sont souvent encore limités dans les systèmes d'expression végétaux, la capacité de production dans les plantes transgéniques est quasiment illimitée puisqu'elle dépend exclusivement des surfaces mises en culture.

Ainsi un "bioréacteur" végétal permettra d'obtenir jusqu'à 20 kg de protéines recombinantes par hectare qu'il s'agisse de tabac, de maïs, de soja ou de luzerne.

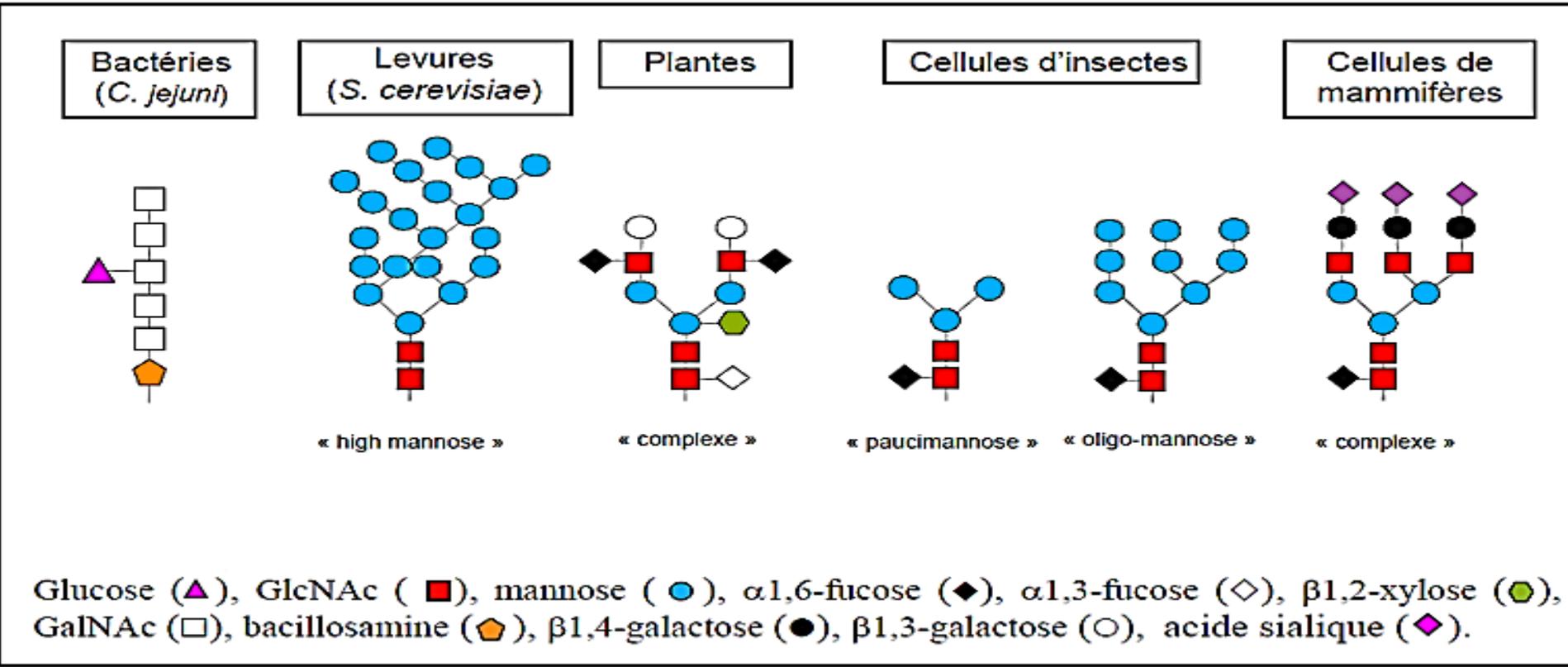
méthode permettant une montée en échelle rapide, utilisant des techniques de purification simple et à moindre coût, avec une qualité reproductible.

Enfin, le principal avantage des plantes transgéniques par rapport aux systèmes traditionnels de culture de cellules de mammifères en fermenteur, est que la production d'anticorps recombinants serait jusqu'à 500 fois moins coûteuse.

Les plantes transgéniques



Systemes d'expression eucaryotes



Exemples de structures N-glycanniques caracteristiques des glycoproteines en fonction du systeme d'expression considere (Kochanowski, 2005)

Systemes d'expression eucaryotes

Comparaison des différents systemes d'expression de protéines recombinantes

(Fischer and Emans, 2000 ; Maet al., 2003 ; Dingermann, 2008)

Systemes de production	Cout de production	Cout d'extraction purification	Temps de production	Capacité de production	Qualité	Cout de stockage	Glycosylation	Risques de contaminations
Bactérie	Faible	Moyen	Court	Elevé, Centaines de mg/L	Médiocre	Modéré (-20°C)	Aucune	Endotoxines
Levures	Moyen	Faible	Moyen	Elevé, 200 mg/L	Moyenne	Modéré (-20°C)	Incorrecte	Risques faibles
Baculovirus/ Cellules d'insectes	Moyen	Faible	Court	Moyen, 10 à 100 mg/L	Bonne	Cher (N ₂)	Différences majeures	Risques faibles
Cellules de mammifères	Elevé	Faible	Long	Moyen, Qq dizaines mg/L	Très Bonne	Cher (N ₂)	Correct	Virus, prions et ADN oncogénique
Animaux transgéniques	Elevé	Elevé	Très long	Très élevé, Qq g/L	Très Bonne	Cher	Correcte	Virus, prions et ADN oncogénique
Cultures cellulaires végétales	Moyen	Faible	Moyen	Moyen	Bonne	Modéré	Différences mineures	Risques faibles
Plantes transgéniques	Très faible	Elevé	Long	Très élevé 600mg/kg Mat fraiche	Bonne	Peu cher (T°C ambiante)	Différences mineures	Risques faibles

Systèmes d'expression eucaryotes

Les plantes présentent donc de nombreux avantages comparées aux systèmes d'expression traditionnels.

Ceci inclut le faible coût de production, la possibilité de monter en échelle rapidement, l'absence de pathogènes pour l'homme, la capacité d'assembler des protéines complexes et de les adresser dans certains tissus.

Cependant, pour que ce système devienne totalement viable, des progrès sont à faire du côté de l'humanisation des motifs de glycosylations, et de l'extraction/purification des protéines.