

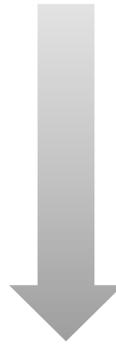
Biotechnologies Appliquées à la Santé et l'Environnement



Dr HARZALLAH B.

Un des grands enjeux scientifiques du début du 21^{ème} siècle

Un des grands enjeux scientifiques du début du 21^{ème} siècle



Biotechnologies

Qu'est-ce que les biotechnologies ?

Qu'est-ce que les biotechnologies ?

Les biotechnologies sont un ensemble de techniques faisant appel aux cellules vivantes dans le but de rendre possible ou de faciliter la synthèse ou la transformation d'un produit.

Qu'est-ce que les biotechnologies ?

Les biotechnologies sont un ensemble de techniques faisant appel aux cellules vivantes dans le but de rendre possible ou de faciliter la synthèse ou la transformation d'un produit.

Le mot « **biotechnologies** » recouvre des techniques très diverses.

Qu'est-ce que les biotechnologies ?

Les biotechnologies sont un ensemble de techniques faisant appel aux cellules vivantes dans le but de rendre possible ou de faciliter la synthèse ou la transformation d'un produit.

Le mot « **biotechnologies** » recouvre des techniques très diverses.

Les biotechnologies utilisent les connaissances croissantes des mécanismes de fonctionnement des êtres vivants (cultures cellulaires, fermentations, génie génétique, thérapie génique...).

Evolution de la biotechnologie dans le temps

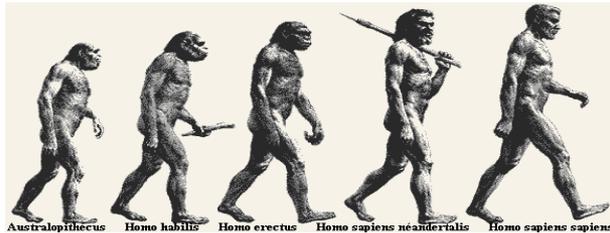


- 4 milliards d'années : apparition de la vie

Evolution de la biotechnologie dans le temps



- 4 milliards d'années : apparition de la vie

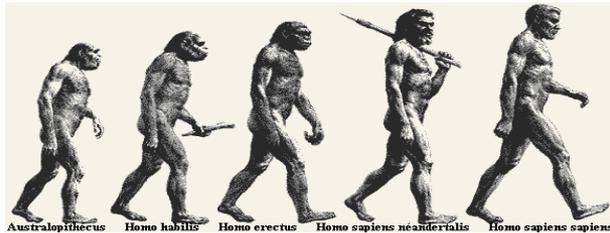


- 5 millions d'années : apparition de l'Homme

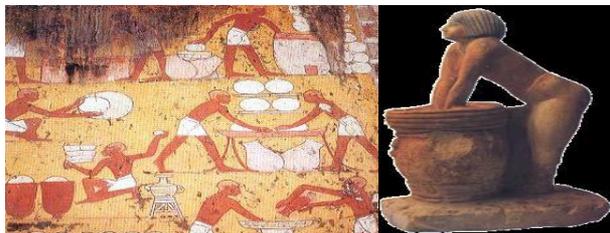
Evolution de la biotechnologie dans le temps



- 4 milliards d'années : apparition de la vie



- 5 millions d'années : apparition de l'Homme



- 4000 ans : «Low Tech» empirique
Alcool, Bière, Cuir, Fromage, Lait fermenté, Pain,
Papier, Textile...

Importance du 19^{ème} siècle pour la biotechnologie

- L'évolution des espèces (Charles Robert Darwin)



- La génétique (Johann Gregor Mendel)



- Les fermentations (Louis Pasteur)



Importance du 19^{ème} siècle pour la biotechnologie

- L'évolution des espèces (Charles Robert Darwin)



- La génétique (Johann Gregor Mendel)



- Les fermentations (Louis Pasteur)



Importance du 19^{ème} siècle pour la biotechnologie

- L'évolution des espèces (Charles Robert Darwin)



- La génétique (Johann Gregor Mendel)



- Les fermentations (Louis Pasteur)



Importance du 19^{ème} siècle pour la biotechnologie

- L'évolution des espèces (Charles Robert Darwin)



- La génétique (Johann Gregor Mendel)



- Les fermentations (Louis Pasteur)



Fermentation ?



Le saviez-vous ?

Le terme « fermentation » dérive du latin *fervere* qui signifie bouillir : un liquide en cours de fermentation présente un important dégagement gazeux (CO_2) et montre l'aspect d'un liquide en ébullition.



... et fermentation

Dans un environnement contrôlé, en l'absence d'oxygène, **des micro-organismes** (par exemple moisissures, levures et bactéries) – génétiquement modifiés ou pas – **transforment des substances organiques**, telles que les sucres et les huiles, **en une gamme pratiquement illimitée de produits**. Il suffit simplement de choisir le micro-organisme adapté, de surveiller son métabolisme et sa croissance et d'être en mesure de l'utiliser à grande échelle.

Parmi les fermentations les plus connues, on peut citer la **fermentation alcoolique** (transformation des sucres en alcool), la **fermentation acétique** (transformation de l'alcool en vinaigre) et la **fermentation lactique** (transformation du lait en fromage).

Les **domaines d'application** des fermentations **dans l'industrie** sont **nombreux et variés**. Outre le secteur de l'alimentation, la chimie, la pharmacie, l'agriculture et l'environnement font appel à de tels procédés.



20^{ème} siècle + 21^{ème} siècle = Révolution biotechnologique

- 1953 : Compréhension de la structure de l'ADN (Watson et Crick)
 - 1962 : Déchiffrage du code génétique (Nirenberg)
 - 1973 : Premières techniques de génie génétique, grâce à la découverte de « ciseaux moléculaires » : les enzymes de restriction (Cohen et Boyer)
 - 1975 : production expérimentale d'anticorps monoclonaux
 - 1977 : clonage et expression d'un gène humain
 - 1982 : HUMULIN*, première insuline recombinante sur le marché
 - 2004 : 90 biomédicaments en France (CA: 2,21 Mds d'€)
 - 2005 : 1 médicament sur 2, soumis à l'agrément de la FDA aux Etats-Unis, est fabriqué par les biotechnologies
- Bioinformatique : augmentation de la puissance de séquençage
Biopuce : détection électrique de séquences d'ADN



Les typologies des biotechnologies

Les typologies des biotechnologies

1- Biotechnologie de première génération : fondée sur la maîtrise des techniques métaboliques de fermentation et de transformation des substrats.

Les typologies des biotechnologies

- 1- Biotechnologie de première génération** : fondée sur la maîtrise des techniques métaboliques de fermentation et de transformation des substrats.
- 2- Biotechnologie de deuxième génération** : fondée sur l'étude de la transmission des caractères entre espèces du même genre.

Les typologies des biotechnologies

- 1- Biotechnologie de première génération** : fondée sur la maîtrise des techniques métaboliques de fermentation et de transformation des substrats.
- 2- Biotechnologie de deuxième génération** : fondée sur l'étude de la transmission des caractères entre espèces du même genre.
- 3- Biotechnologie de dernière génération** : fondée sur la manipulation du gène et son transfert en dehors de l'espèce.

Les domaines d'application des biotechnologies



Biotechnologie (n. f.) : Application de la science et de l'ingénierie à l'utilisation des fonctions biologiques d'organismes vivants - sous leur forme naturelle ou modifiée - pour des application dans la médecine, l'agriculture, l'industrie et la protection de l'environnement.

Les domaines d'application des biotechnologies



Biotechnologie (n. f.) : Application de la science et de l'ingénierie à l'utilisation des fonctions biologiques d'organismes vivants - sous leur forme naturelle ou modifiée - pour des application dans la médecine, l'agriculture, l'industrie et la protection de l'environnement.



Les domaines d'application des biotechnologies



Biotechnologie (n. f.) : Application de la science et de l'ingénierie à l'utilisation des fonctions biologiques d'organismes vivants - sous leur forme naturelle ou modifiée - pour des application dans la médecine, l'agriculture, l'industrie et la protection de l'environnement.



Les domaines d'application des biotechnologies



Biotechnologie (n. f.) : Application de la science et de l'ingénierie à l'utilisation des fonctions biologiques d'organismes vivants - sous leur forme naturelle ou modifiée - pour des application dans la médecine, l'agriculture, l'industrie et la protection de l'environnement.



Les domaines d'application des biotechnologies



Biotechnologie (n. f.) : Application de la science et de l'ingénierie à l'utilisation des fonctions biologiques d'organismes vivants - sous leur forme naturelle ou modifiée - pour des application dans la médecine, l'agriculture, l'industrie et la protection de l'environnement.



Les domaines d'application des biotechnologies



Biotechnologie (n. f.) : Application de la science et de l'ingénierie à l'utilisation des fonctions biologiques d'organismes vivants - sous leur forme naturelle ou modifiée - pour des application dans la médecine, l'agriculture, l'industrie et la protection de l'environnement.





Biotechnologie (n. f.) : Application de la **science** et de l'**ingénierie** à l'**utilisation des fonctions biologiques d'organismes vivants** – sous leur forme naturelle ou modifiée – pour des applications dans la médecine, l'agriculture, l'industrie et la protection de l'environnement.

Les différents domaines d'application sont respectivement symbolisés par une **couleur** :



La **biotechnologie verte** touche à l'**agriculture** et l'**alimentation**. Celle-ci utilise le **génie génétique*** pour transférer certains gènes d'une espèce de plante à une autre et améliorer de façon ciblée la résistance aux insectes, aux champignons, aux virus et aux herbicides.



La **biotechnologie rouge** est liée à la **médecine** et concerne la conception d'organismes pour produire des antibiotiques, le développement de thérapies à travers les manipulations du **génom**e, le diagnostic à l'aide de puces à ADN ou de biocapteurs, etc.



La **biotechnologie bleue** se concentre sur l'utilisation des processus et des organismes de la **biologie marine** à des fins techniques.



La **biotechnologie blanche**, ou industrielle, a pour objet la production et les processus à l'**échelle industrielle**, ainsi que l'utilisation de la **biomasse** comme matière première renouvelable.

Quels sont les risques professionnels associés aux biotechnologies ?

Quels sont les risques professionnels associés aux biotechnologies ?



Quels sont les risques professionnels associés aux biotechnologies ?



Critères de choix des OGM

Critères de choix des OGM

- **Innocuité**

Critères de choix des OGM

- Innocuité
- **Connaître le génome et les protéines synthétisées**

Critères de choix des OGM

- Innocuité
- Connaître le génome et les protéines synthétisées
 - **Culture en masse**

Critères de choix des OGM

- Innocuité
- Connaître le génome et les protéines synthétisées
 - Culture en masse
- **Sécrétion des molécules dans le milieu extérieur (facultatif)**

L'évaluation des risques liés à la construction d'OGM se fait en analysant chaque élément entrant dans sa fabrication:



L'évaluation des risques liés à la construction d'OGM se fait en analysant chaque élément entrant dans sa fabrication:

- **Le gène d'intérêt : le HCB distinguent les inserts de type A (non dangereux) et des inserts de type B (présentant un danger)**



L'évaluation des risques liés à la construction d'OGM se fait en analysant chaque élément entrant dans sa fabrication:

- Le gène d'intérêt : le HCB distinguent les inserts de type A (non dangereux) et des inserts de type B (présentant un danger)
- Le vecteur: son danger dépend de sa nature initiale, de la façon dont il a été rendu inoffensif et de sa stabilité dans la cellule cible



L'évaluation des risques liés à la construction d'OGM se fait en analysant chaque élément entrant dans sa fabrication:

- Le gène d'intérêt : le HCB distinguent les inserts de type A (non dangereux) et des inserts de type B (présentant un danger)
- Le vecteur: son danger dépend de sa nature initiale, de la façon dont il a été rendu inoffensif et de sa stabilité dans la cellule cible
- **L'organisme donneur et receveur du gène: le code du travail et le HCB attribuent un niveau de danger aux différents organismes pouvant être utilisés**



L'évaluation des risques liés à l'usage d'un bioréacteur doit tenir compte de différents points:



L'évaluation des risques liés à l'usage d'un bioréacteur doit tenir compte de différents points:

- **Le danger de la souche cultivée**



L'évaluation des risques liés à l'usage d'un bioréacteur doit tenir compte de différents points:

- Le danger de la souche cultivée
- Le danger des produits générés (molécules, gaz,...)



L'évaluation des risques liés à l'usage d'un bioréacteur doit tenir compte de différents points:

- Le danger de la souche cultivée
- Le danger des produits générés (molécules, gaz,...)
- **Le niveau de pression du bioréacteur**



L'évaluation des risques liés à l'usage d'un bioréacteur doit tenir compte de différents points:

- Le danger de la souche cultivée
- Le danger des produits générés (molécules, gaz,...)
 - Le niveau de pression du bioréacteur
- **Les conditions d'ensemencement et de prélèvement**



L'évaluation des risques liés à l'usage d'un bioréacteur doit tenir compte de différents points:

- Le danger de la souche cultivée
- Le danger des produits générés (molécules, gaz,...)
 - Le niveau de pression du bioréacteur
- Les conditions d'ensemencement et de prélèvement
 - **Les conditions de nettoyage/désinfection**



L'évaluation des risques liés à l'usage d'un bioréacteur doit tenir compte de différents points:

- Le danger de la souche cultivée
- Le danger des produits générés (molécules, gaz,...)
 - Le niveau de pression du bioréacteur
- Les conditions d'ensemencement et de prélèvement
 - Les conditions de nettoyage/désinfection
- **Les procédures en cas de dysfonctionnement**



L'évaluation des risques liés à l'usage d'un bioréacteur doit tenir compte de différents points:

- Le danger de la souche cultivée
- Le danger des produits générés (molécules, gaz,...)
 - Le niveau de pression du bioréacteur
- Les conditions d'ensemencement et de prélèvement
 - Les conditions de nettoyage/désinfection
 - Les procédures en cas de dysfonctionnement
 - **Les procédures de maintenance**



Biotechnologies appliquées à la santé



Secteur de la santé

Les biotechnologies appliquées à la santé concernent la santé humaine et animale, que ce soit pour la prévention, la thérapie ou le diagnostic.



Secteur de la santé

Les biotechnologies appliquées à la santé concernent la santé humaine et animale, que ce soit pour la prévention, la thérapie ou le diagnostic.

Les biotechnologies permettent au secteur de la santé de faire encore plus de progrès : organes artificiels, thérapies innovantes (géniques ou cellulaires), développement de biomédicaments, de vaccins...



Secteur de la santé

Les applications biotechnologiques visent à solutionner des problèmes :

Secteur de la santé

Les applications biotechnologiques visent à solutionner des problèmes :

1. **Thérapeutique** (production de produits biopharmaceutiques du type vaccins, anticorps, hormones..., et les biothérapies du type thérapies géniques, cellules souches...);

Secteur de la santé

Les applications biotechnologiques visent à solutionner des problèmes :

1. Thérapeutique (production de produits biopharmaceutiques du type vaccins, anticorps, hormones..., et les biothérapies du type thérapies géniques, cellules souches...);
- 2. Diagnostic** (utilisation de tests et notamment les tests génétiques);

Secteur de la santé

Les applications biotechnologiques visent à solutionner des problèmes :

1. Thérapeutique (production de produits biopharmaceutiques du type vaccins, anticorps, hormones..., et les biothérapies du type thérapies géniques, cellules souches...);
2. Diagnostic (utilisation de tests et notamment les tests génétiques);
3. **Pharmacogénétique** (interactions entre gènes et médicaments pour personnaliser la médecine).

Secteur de la santé

Quelques applications existantes ou en développement :

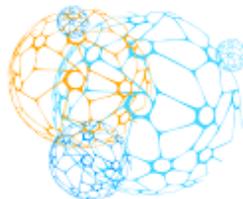
Secteur de la santé

Quelques applications existantes ou en développement :

Biomédicaments et vaccins

Les médicaments issus des biotechnologies comprennent :

- Des médicaments dont la production est issue d'organismes vivants ou de leurs composants cellulaires (par exemple, l'insuline humaine, l'hormone de croissance, les facteurs anti-hémophiliques ou les anticorps) ;
- Des médicaments relevant de la chimie de synthèse, mais dont la conception a fait appel aux biotechnologies, à travers par exemple l'identification d'une cible cellulaire nouvelle.



Secteur de la santé

Quelques applications existantes ou en développement :

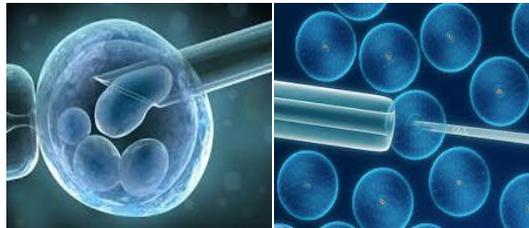
Biomédicaments et vaccins

Les médicaments issus des biotechnologies comprennent :

- Des médicaments dont la production est issue d'organismes vivants ou de leurs composants cellulaires (par exemple, l'insuline humaine, l'hormone de croissance, les facteurs anti-hémophiliques ou les anticorps) ;
- Des médicaments relevant de la chimie de synthèse, mais dont la conception a fait appel aux biotechnologies, à travers par exemple l'identification d'une cible cellulaire nouvelle.

Thérapie cellulaire

- Ce mode de thérapie permet de soigner un patient en lui injectant des cellules sur l'organe touché (cellules souches la plupart du temps). La thérapie cellulaire est utilisée par exemple pour la maladie d'Alzheimer, diabète, leucémie...



Secteur de la santé

Quelques applications existantes ou en développement :

La Médecine « prédictive »

- Grâce à des tests génétiques, on espère pouvoir prévoir et surtout prévenir l'apparition de certaines maladies. Dans ce cadre, une éthique et une législation claire sont indispensables.

Exemple : Les diagnostics pré-symptomatiques pour les affections cérébrales héréditaires, le cancer du sein...



Secteur de la santé

Quelques applications existantes ou en développement :

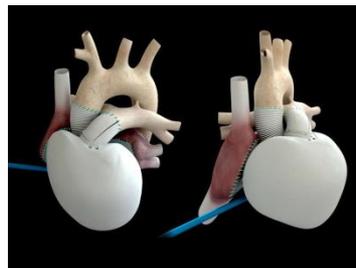
La Médecine « prédictive »

- Grâce à des tests génétiques, on espère pouvoir prévoir et surtout prévenir l'apparition de certaines maladies. Dans ce cadre, une éthique et une législation claire sont indispensables.

Exemple : Les diagnostics pré-symptomatiques pour les affections cérébrales héréditaires, le cancer du sein...

Organe artificiel

- Dans certaines pathologies, il est parfois nécessaire de remplacer l'organe malade mais les donneurs sont rares. Des recherches sont faites pour développer par exemple des reins de synthèse.



Secteur de la santé

La production de molécules pharmaceutique par voie biotechnologiques représente un marché en pleine croissance, estimé aujourd'hui à 15% du marché des médicaments (plus de $\frac{3}{4}$ du CA du secteur).

Secteur de la santé

La production de molécules pharmaceutique par voie biotechnologiques représente un marché en pleine croissance, estimé aujourd'hui à 15% du marché des médicaments (plus de $\frac{3}{4}$ du CA du secteur).

La 1^{ère} molécule thérapeutique produite par un microorganisme est la pénicilline, sécrétée par la moisissure *Penicillium notatum* et administrée pour la 1^{ère} fois en 1941 aux soldats anglais de la 2nd guerre mondiale.



Secteur de la santé

La production de molécules pharmaceutique par voie biotechnologiques représente un marché en pleine croissance, estimé aujourd'hui à 15% du marché des médicaments (plus de $\frac{3}{4}$ du CA du secteur).

La 1^{ère} molécule thérapeutique produite par un microorganisme est la pénicilline, sécrétée par la moisissure *Penicillium notatum* et administrée pour la 1^{ère} fois en 1941 aux soldats anglais de la 2nd guerre mondiale.

La 1^{ère} molécule thérapeutique issue d'un microorganisme génétiquement modifié fut l'insuline humaine, utilisée pour traiter les personnes diabétiques, produite par la bactérie *E. coli* à partir de 1983.



Secteur de la santé

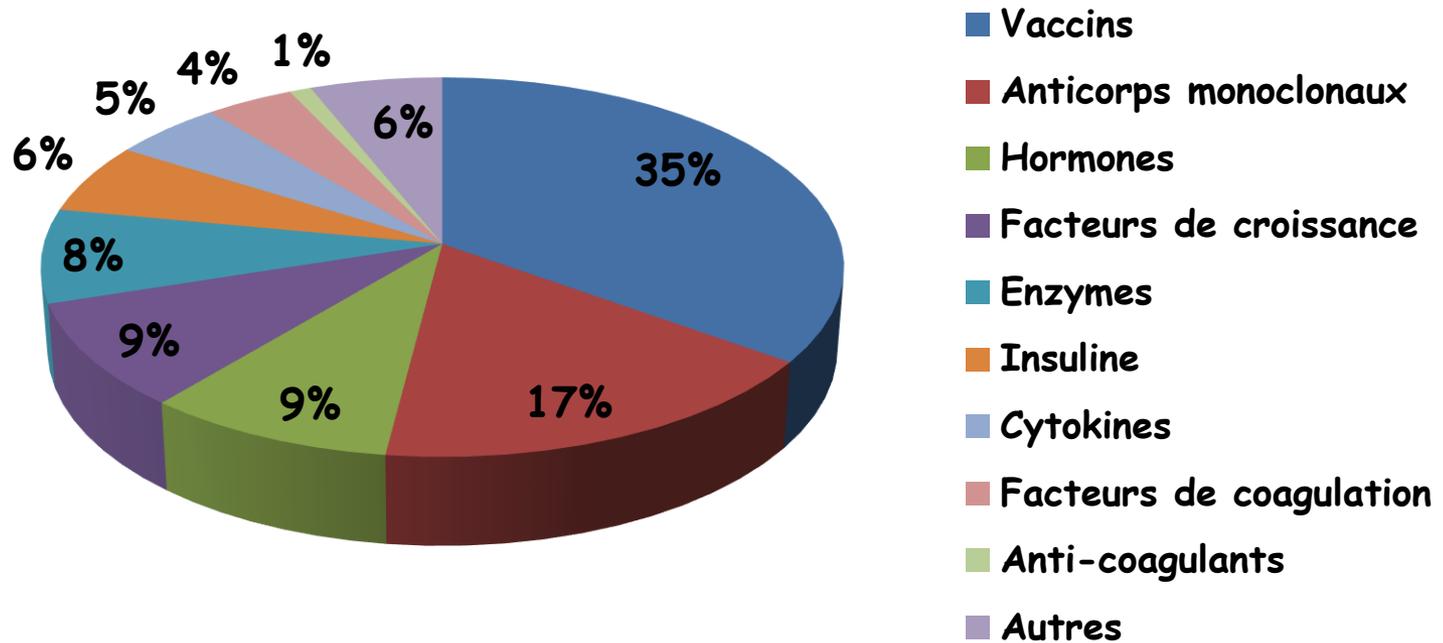
La production de molécules pharmaceutique par voie biotechnologiques représente un marché en pleine croissance, estimé aujourd'hui à 15% du marché des médicaments (plus de $\frac{3}{4}$ du CA du secteur).

La 1^{ère} molécule thérapeutique produite par un microorganisme est la pénicilline, sécrétée par la moisissure *Penicillium notatum* et administrée pour la 1^{ère} fois en 1941 aux soldats anglais de la 2nd guerre mondiale.

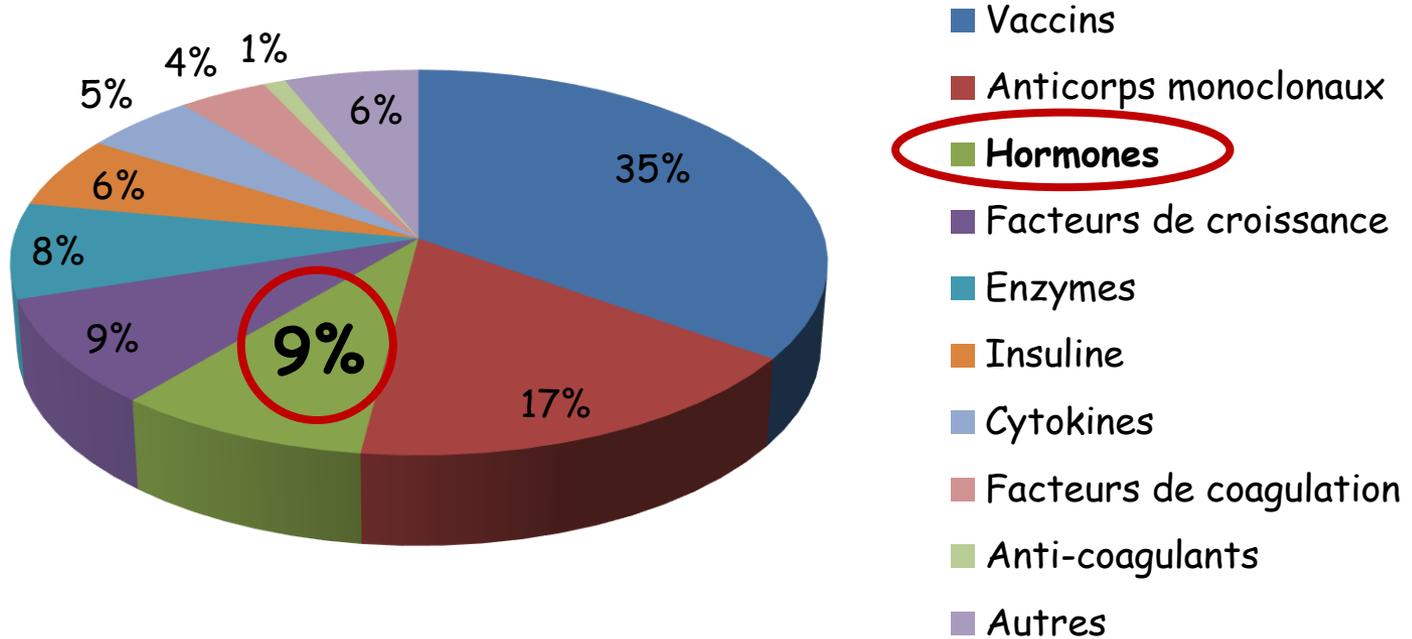
La 1^{ère} molécule thérapeutique issue d'un microorganisme génétiquement modifié fut l'insuline humaine, utilisée pour traiter les personnes diabétiques, produite par la bactérie *E. coli* à partir de 1983.

Encore actuellement, l'industrie pharmaceutique emploie très souvent la bactérie *E. coli* K12 et la levure *Saccharomyces cerevisiae*, cultivées en masse dans des bioréacteurs.

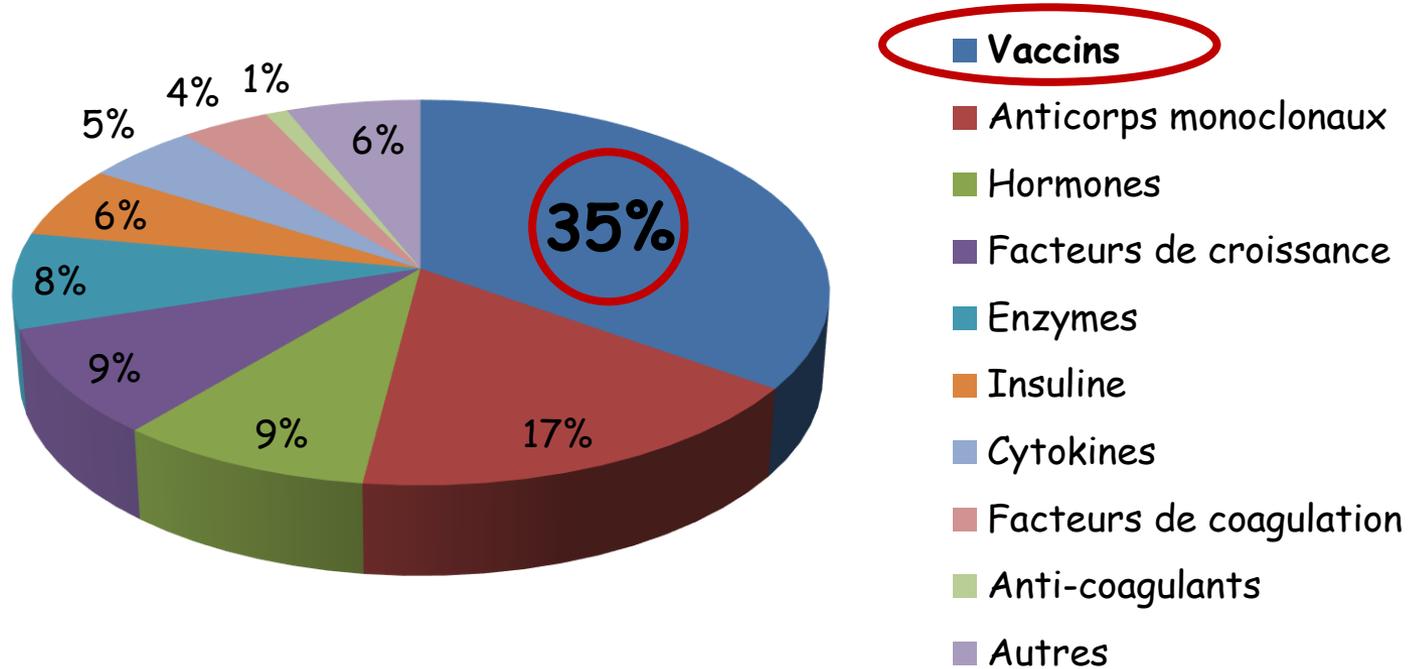
Marché des biomédicaments



Marché des biomédicaments



Marché des biomédicaments



Qu'est-ce qu'une hormone ?

Qu'est-ce qu'une hormone ?

Une hormone est une substance biologique synthétisée par des cellules spéciales (les cellules endocrines) et directement sécrétée dans le sang ou la lymphe.

Qu'est-ce qu'une hormone ?

Une hormone est une substance biologique synthétisée par des cellules spéciales (les cellules endocrines) et directement sécrétée dans le sang ou la lymphe.

Une hormone est un messenger chimique véhiculé par le système circulatoire qui agit à distance de son site de production par fixation sur des récepteurs spécifiques.

Qu'est-ce qu'une hormone ?

Une hormone est une substance biologique synthétisée par des cellules spéciales (les cellules endocrines) et directement sécrétée dans le sang ou la lymphe.

Une hormone est un messager chimique véhiculé par le système circulatoire qui agit à distance de son site de production par fixation sur des récepteurs spécifiques.

Une hormone est une molécule chimique biologiquement active, sécrétée par une glande endocrine, régulant à distance et par voie sanguine des cellules cibles.

Qu'est-ce que le système endocrinien ?

Qu'est-ce que le système endocrinien ?

Système endocrinien (SE) = organes + de cellules productrices d'hormones.

Qu'est-ce que le système endocrinien ?

Système endocrinien (SE) = organes + de cellules productrices d'hormones.

Rôle des glandes endocrines= production et relargage d'hormones dans la circulation sanguine ou le système lymphatique.

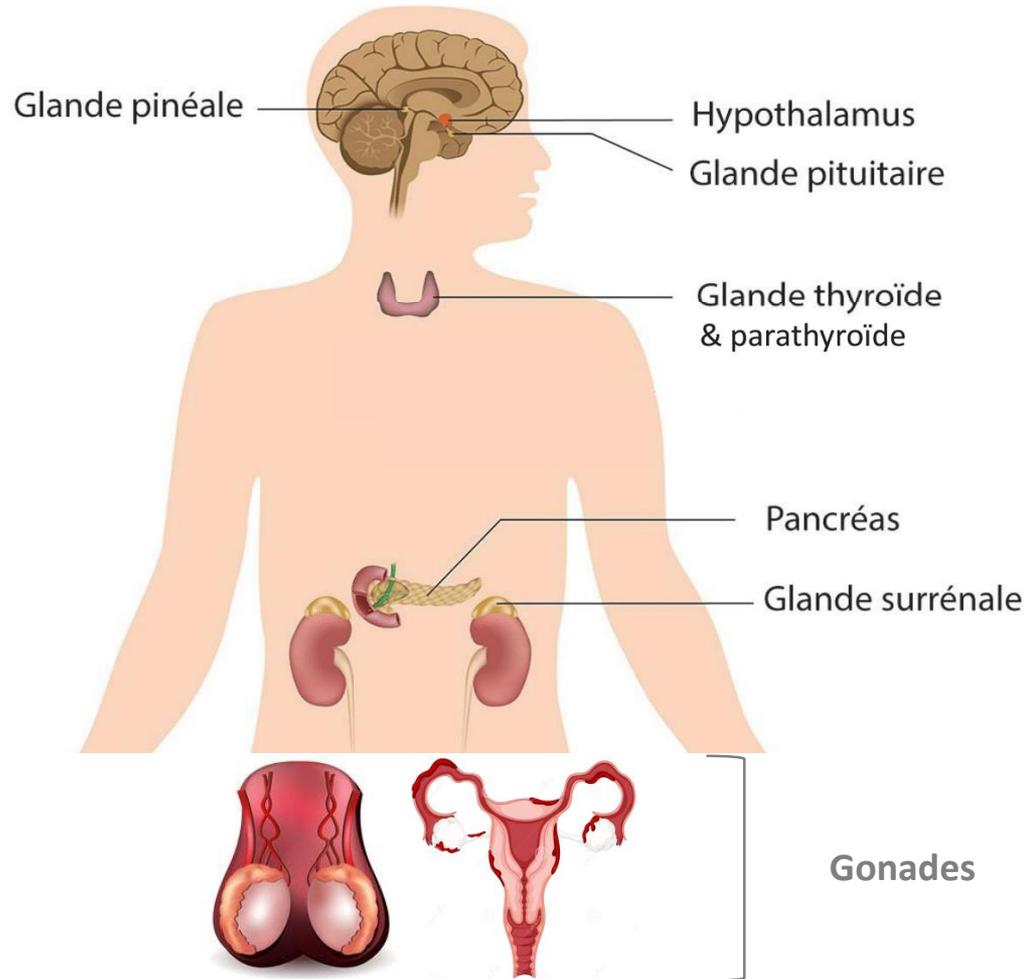
Qu'est-ce que le système endocrinien ?

Système endocrinien (SE) = organes + de cellules productrices d'hormones.

Rôle des glandes endocrines= production et relargage d'hormones dans la circulation sanguine ou le système lymphatique.

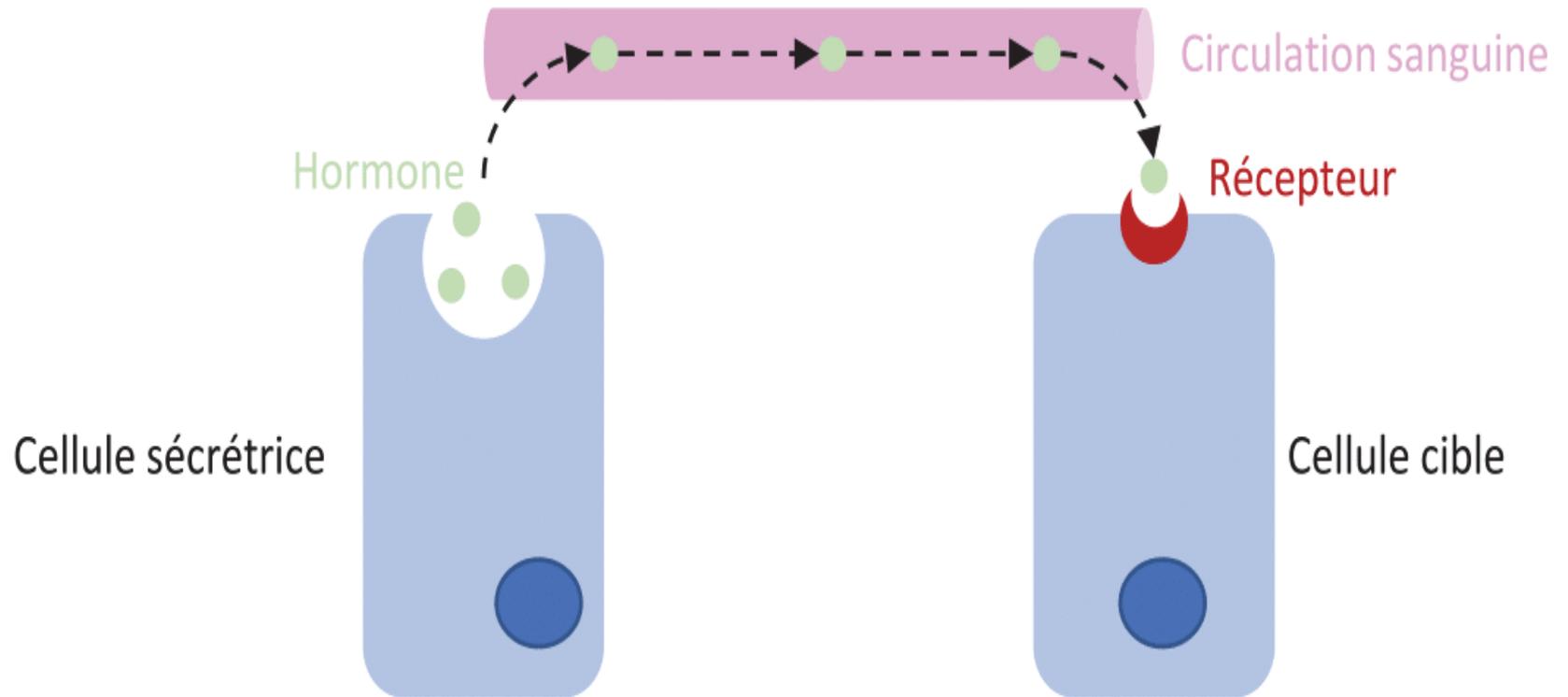
Hormones/Cibles (cellules, tissus ou organes).

Schéma du système endocrinien



Les différents modes de communications des hormones

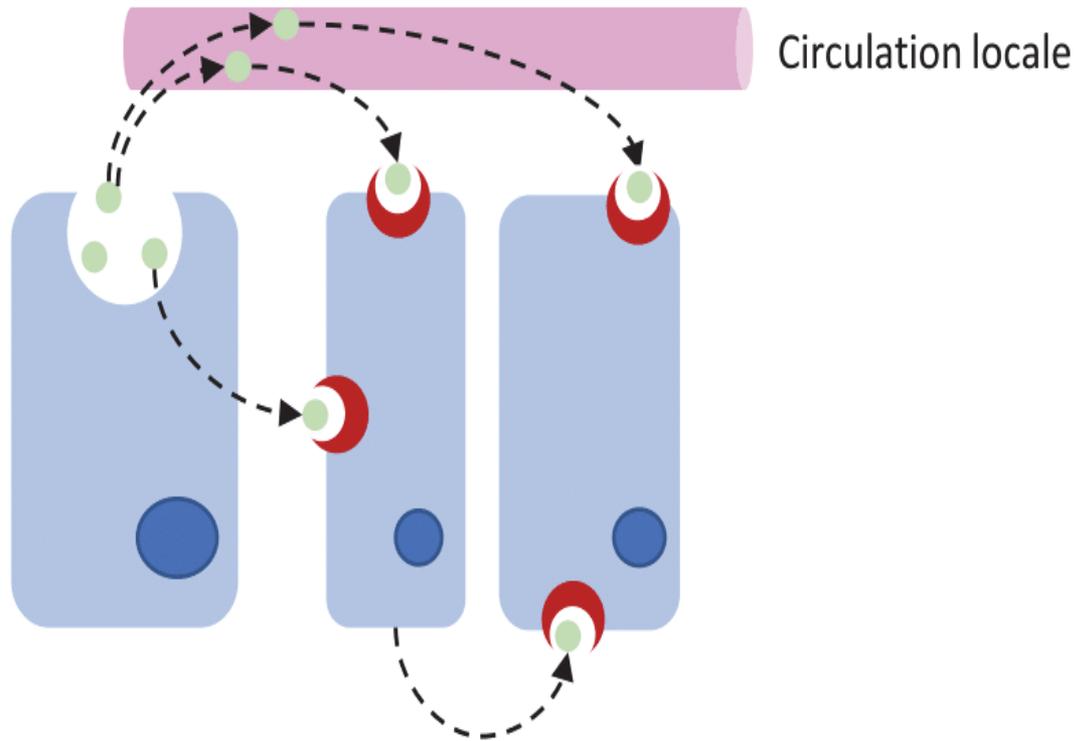
Les différents modes de communications des hormones



activité endocrine

L'hormone est relâchée dans la circulation sanguine afin d'atteindre la cellule cible.

Les différents modes de communications des hormones

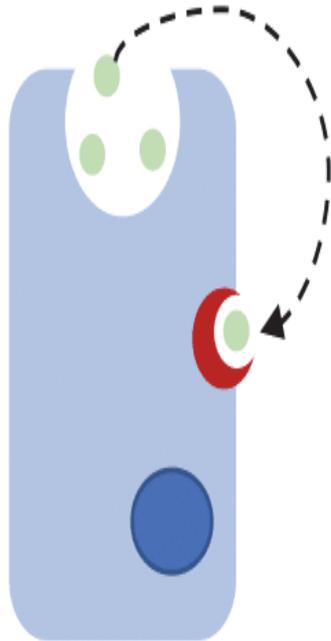


activité paracrine

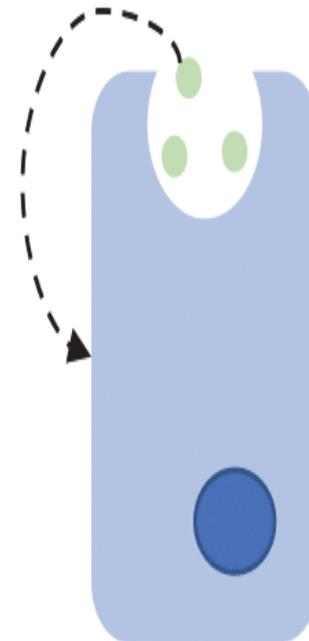
Certaines hormones peuvent parfois agir sur des cellules proches sans passage par la circulation générale.

Les différents modes de communications des hormones

D'autres hormones peuvent agir directement sur la cellule qui les a sécrétées (activité dite autocrine) et en dernier on a les hormones qui peuvent avoir une action intracrine en agissant au sein même de la cellule endocrine, sans avoir été relarguées dans le compartiment extracellulaire.



activité autocrine



activité intracrine

Les différents modes de communications des hormones

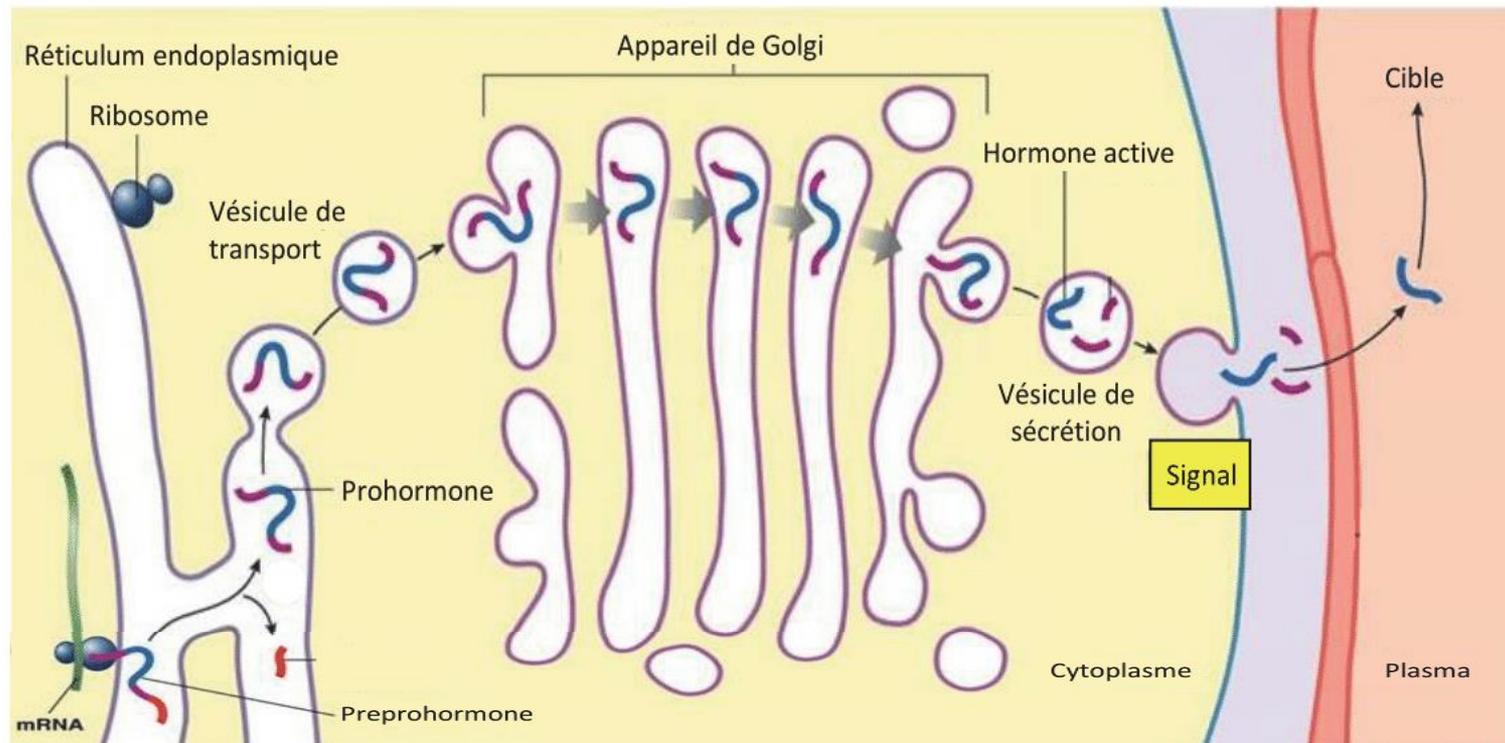
Glandes du SE (endo-exocrines) = Glandes à activité mixte = **endocrine** par la sécrétion d'hormones dans la circulation sanguine, et **exocrine**, par l'expulsion de produits de sécrétion à l'extérieur de l'organisme via un canal excréteur.

Les différents types d'hormones

Il existe 3 grands types d'hormones (trois groupes classés selon leur nature biochimique, dont dépendra aussi leur mode d'action).

Les différents types d'hormones

Hormones peptidiques

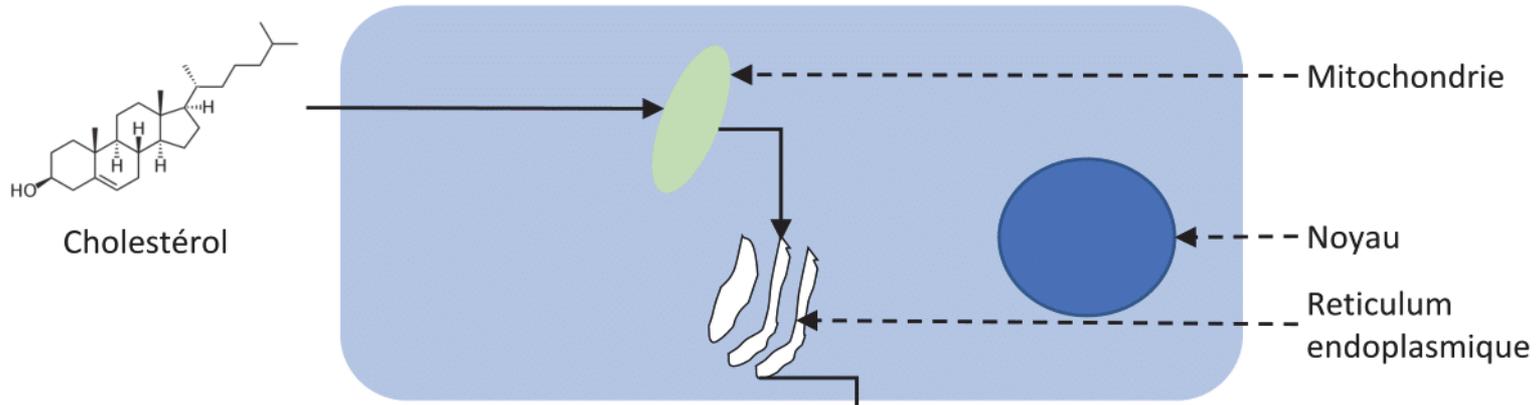


Elles subissent une maturation enzymatique dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, passant du stade de préprohormones à prohormones pour terminer en hormones actives.

Exemple : l'insuline et l'hormone de croissance.

Les différents types d'hormones

Hormones stéroïdiennes

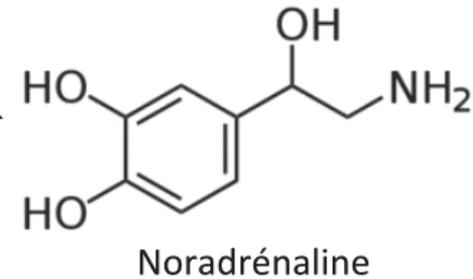
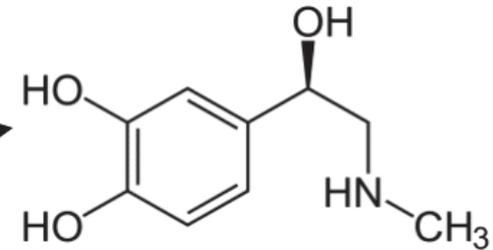
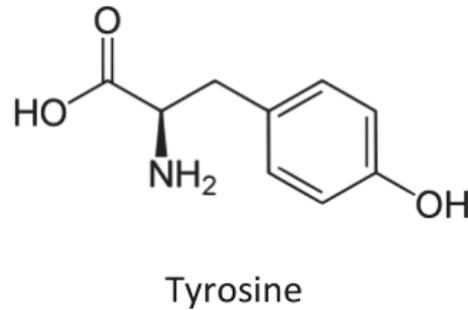


Le précurseur de ces hormones est le cholestérol. Ce dernier subit un processus de conversion enzymatique avant de devenir une hormone. Ce processus est appelé stéroïdogénèse.

Exemple : les œstrogènes, la testostérone et le cortisol.

Les différents types d'hormones

Hormones monoamines



les hormones monoamines. Ces hormones dérivent le plus souvent de la tyrosine ou de la tryptophane.

Exemples : les catécholamines et la thyroxine.

Les différentes hormones et leurs actions

Système endocrinien	Hormones secrétées	Abréviations	Effets	
Axe Hypothalamo-Hypophysaire	Hormone thyroïdienne	TRH ou PRH	Stimule la sécrétion de TSH et PRL au niveau de l'hypophyse	
	Dopamine	DA	Inhibe la sécrétion de PRL au niveau de l'hypophyse	
	Hypothalamus	Hormone de libération de l'hormone de croissance	GHRH	Stimule la sécrétion de GH au niveau de l'hypophyse
		Gonadolibérine	GnRH ou LHRH	Stimule la sécrétion de FSH et LH au niveau de l'hypophyse
		Corticolibérine	CRH	Stimule la sécrétion d'ACTH au niveau de l'hypophyse
		Hormone de croissance	GH	Stimule la croissance et la reproduction cellulaire
		Prolactine	PRL	Stimule la lactation
		Hormone folliculo-stimulante	FSH	Stimule la maturation des follicules chez la femelle et régule la spermatogénèse chez le mâle
	Anté-Hypophyse	Hormone lutéinisante	LH	Stimule la sécrétion d'œstrogènes et induit l'ovulation chez la femelle. Stimule la sécrétion de testostérone chez le mâle
		Thyréostimuline	TSH	Stimule la sécrétion d'hormones thyroïdiennes
		Hormone adrencorticotrope	ACTH	Stimule la sécrétion des glucocorticoïdes
		Mélano-stimuline	MSH	Stimule la production de mélanine
	Post-Hypophyse	Ocytocine		Stimule la contraction utérine et la lactation
		Vasopressine	ADH	Inhibe la sécrétion d'urine et maintient l'équilibre électrolytique
	Surrénales	Cortex	Cortisol	Régule le métabolisme, la croissance et la maturation des tissus de l'organisme
		Déhydroépiandrostérone	DHEA	Action contre le vieillissement
Médulla		Adrénaline		Accélère le rythme cardiaque suite à un stress ou une activité physique
	Noradrénaline		Action dans l'attention, le sommeil et l'apprentissage	
Thyroïdes	Thyroïde	Triiodothyronine	T3	Stimule la production de l'ARN polymérase I et II, la fréquence cardiaque et la force de contraction, la production de myéline, les neurotransmetteurs et la croissance axonale
		Thyroxine	T4	Régule la vitesse du métabolisme et des processus de croissance et de différenciation des tissus
		Calcitonine		Régule le métabolisme du phosphore et du calcium
	Parathyroïdes	Parathormone	PTH	Régule le métabolisme phospho-calcique du sang
Gonades	Testicules	Hormone antimüllérienne	AMH	Intervient dans la régression des canaux de Müller durant l'embryogénèse
		Inhibine		Inhibe la synthèse de la FSH hypophysaire
		Activine		Active la synthèse de la FSH hypophysaire
		Insuline like 3	INSL3	Impliqué dans la descente testiculaire et le maintien de la spermatogénèse
		Œstrogènes	E1, E2 ou E3	Stimule le développement des organes reproducteurs et des caractères secondaires féminins, régule le cycle ovarien
	Ovaires	Progestérone	P4	Prépare l'endomètre à l'implantation de l'œuf fécondé, maintient le col de l'utérus fermé, intervient dans le développement des glandes mammaires
	Androstènedione		Participe à la synthèse des œstrogènes	
	Inhibine		Inhibe la synthèse de la FSH hypophysaire	
	Glucagon		Régule la glycémie	
Pancréas	Insuline		Régule les substrats énergétiques comme le glucose, les acides gras et les corps cétoniques	
	Somatostatine		Inhibe la sécrétion de GH, de TSH, d'insuline et du glucagon	
Autres glandes endocrines	Placenta	Hormone chorionique gonadotrope	hCG	Maintien du corps jaune durant la grossesse et de la sécrétion de progestérone
		Œstriol	E3	Forme principale d'œstrogènes produite pendant la grossesse
		Progestérone	P4	Maintien de la grossesse
	Epiphyse	Mélatonine		Agit sur la reproduction, le système immunitaire et en tant qu'antioxydant
	Thymus	Thymuline		Stimule l'immuno compétence des lymphocytes T
	Thymopoïétine		Agit sur les cellules nourricières des prothymocytes	

Hormones peptidiques - Hormones stéroïdes - Hormones monoaminées

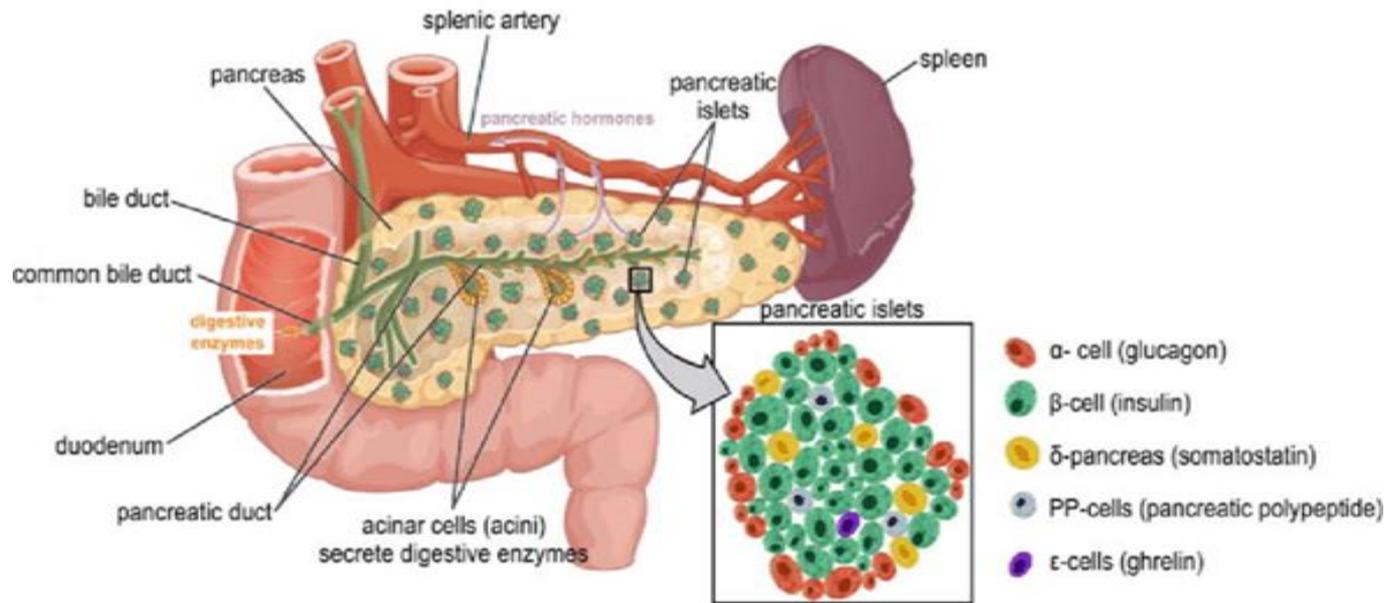
Pancréas

Le pancréas est situé à l'arrière de l'estomac et assure une fonction exocrine par la libération des sucs pancréatiques au sein du duodénum.



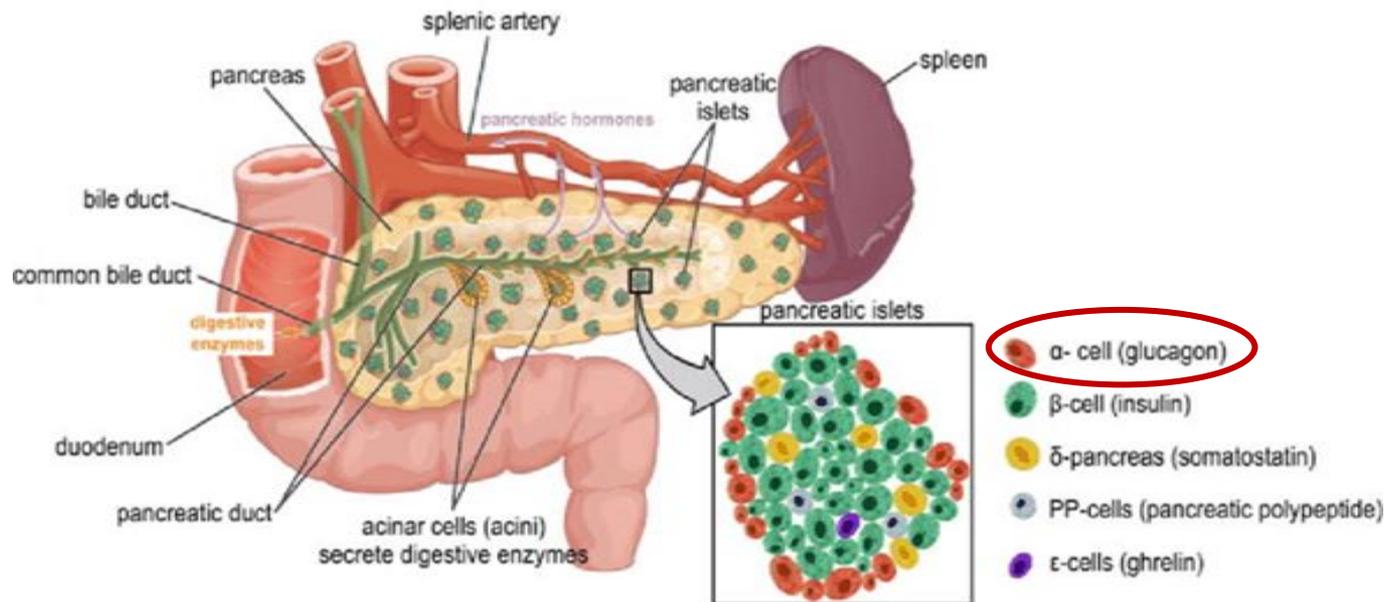
Pancréas

Répartis tout du long de cet organe, les îlots de Langerhans assurent eux sa fonction endocrine et sont composés de deux grandes populations de cellules :



Pancréas

Répartis tout du long de cet organe, les îlots de Langerhans assurent eux sa fonction endocrine et sont composés de deux grandes populations de cellules :



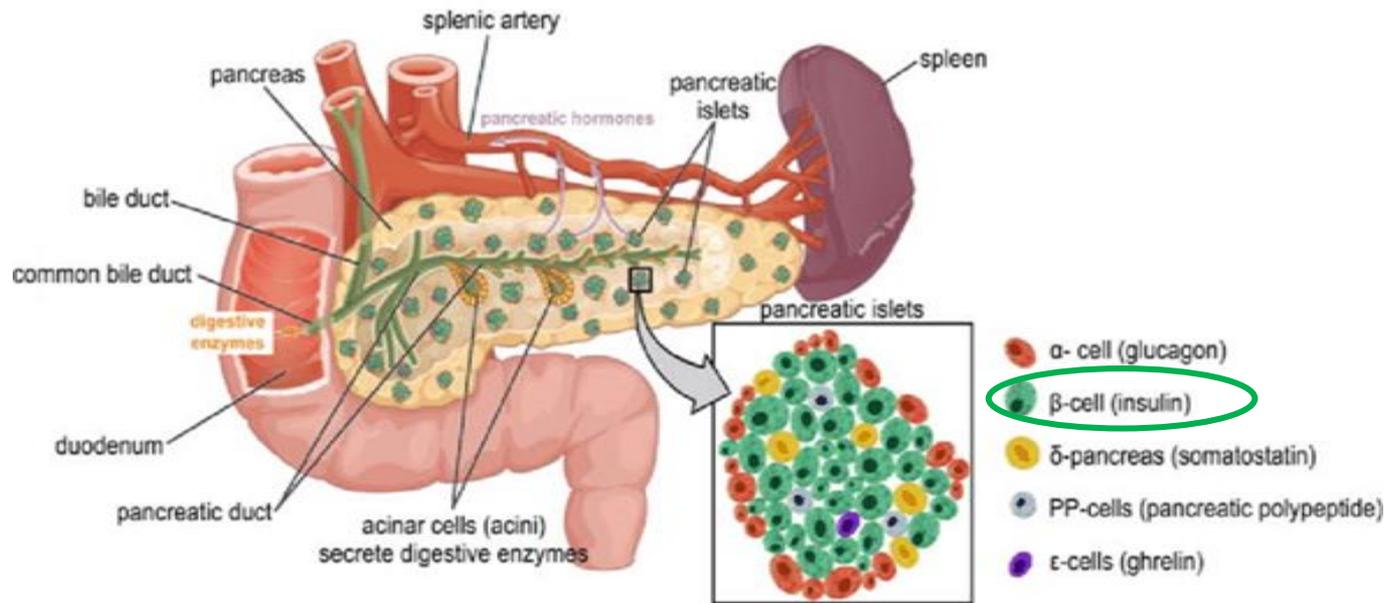
- les cellules α synthétisent le glucagon, provoquant la libération du glucose dans le foie;

Qu'est-ce que le glucagon ?

Le glucagon est une hormone hyperglycémisante (qui provoque une augmentation de la quantité de glucose dans le sang) sécrétée par les cellules des îlots de Langerhans du pancréas, et qui agit principalement sur le foie en provoquant une glycogénolyse.

Pancréas

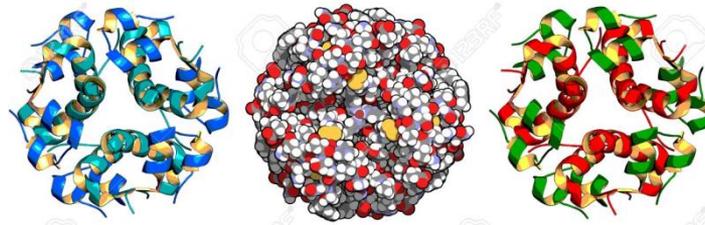
Répartis tout du long de cet organe, les îlots de Langerhans assurent eux sa fonction endocrine et sont composés de deux grandes populations de cellules :



- les cellules α synthétisent le glucagon, provoquant la libération du glucose dans le foie;
- les cellules β , plus nombreuses, produisent l'insuline, hormone agissant sur le métabolisme glucidique, protidique et lipidique.

Qu'est-ce que l'insuline ?

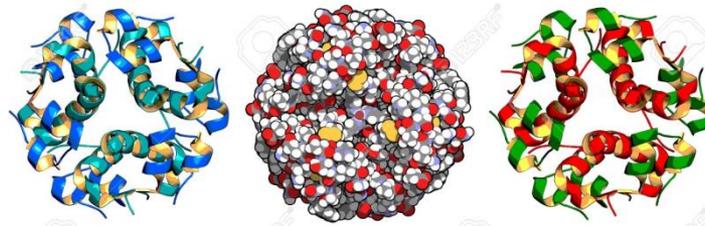
L'insuline est une hormone protéique hypoglycémisante sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans dans le pancréas.



Qu'est-ce que l'insuline ?

L'insuline est une hormone protéique hypoglycémiante sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans dans le pancréas.

Rôle : absorption du glucose/cellules adipeuses, du foie et des muscles squelettiques.

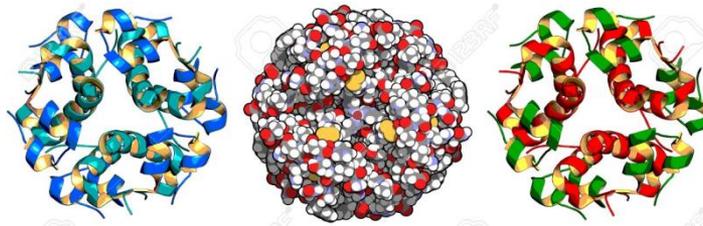


Qu'est-ce que l'insuline ?

L'insuline est une hormone protéique hypoglycémiante sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans dans le pancréas.

Rôle : absorption du glucose/cellules adipeuses, du foie et des muscles squelettiques.

Conversion du glucose en glycogène ou en triglycérides.



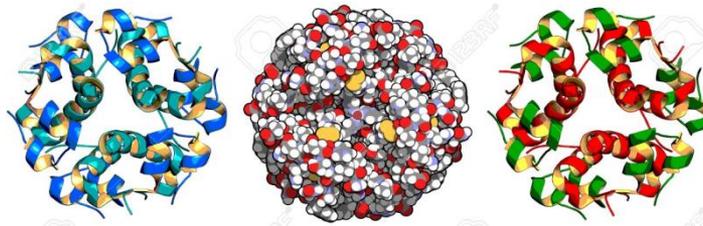
Qu'est-ce que l'insuline ?

L'insuline est une hormone protéique hypoglycémiante sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans dans le pancréas.

Rôle : absorption du glucose/cellules adipeuses, du foie et des muscles squelettiques.

Conversion du glucose en glycogène ou en triglycérides.

La libération de glucose par le foie dans le sang est limitée par un taux sanguin élevé en insuline.



Qu'est-ce que l'insuline ?

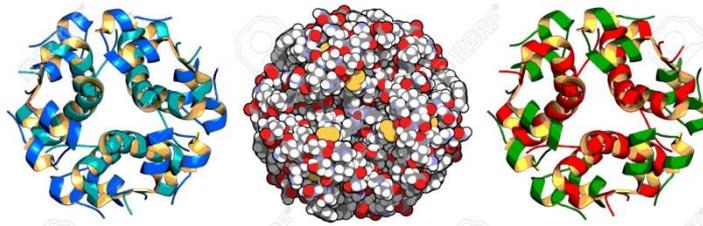
L'insuline est une hormone protéique hypoglycémiante sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans dans le pancréas,

Rôle : absorption du glucose/cellules adipeuses, du foie et des muscles squelettiques.

Conversion du glucose en glycogène ou en triglycérides.

La libération de glucose par le foie dans le sang est limitée par un taux sanguin élevé en insuline.

(Insuline/Glucagon) : un rôle majeur dans la régulation des substrats énergétiques (le glucose, les acides gras et les corps cétoniques).



Comment la glycémie est régulée ?

Comment la glycémie est régulée ?

$$[\text{Glucose}] = 0,7 - 1,10 \text{ g/L}$$

Intervention de deux hormones antagonistes : le glucagon et l'insuline.

Comment la glycémie est régulée ?

$$[\text{Glucose}] = 0,7 - 1,10 \text{ g/L}$$

Intervention de deux hormones antagonistes : le glucagon et l'insuline.

Hyperglycémie : le pancréas libère l'insuline qui favorise l'entrée du glucose sanguin dans les organes de stockage.

Hypoglycémie : le pancréas sécrète du glucagon.

Comment la glycémie est régulée ?

[Glucose] = 0,7 - 1,10 g/L

Intervention de deux hormones antagonistes : le glucagon et l'insuline.

Hyperglycémie : le pancréas libère l'insuline qui favorise l'entrée du glucose sanguin dans les organes de stockage.

Hypoglycémie : le pancréas sécrète du glucagon.

La fixation de l'insuline aboutit à la consommation du glucose par les cellules cibles.

Comment la glycémie est régulée ?

$$[\text{Glucose}] = 0,7 - 1,10 \text{ g/L}$$

Intervention de deux hormones antagonistes : le glucagon et l'insuline.

Hyperglycémie : le pancréas libère l'insuline qui favorise l'entrée du glucose sanguin dans les organes de stockage.

Hypoglycémie : le pancréas sécrète du glucagon.

La fixation de l'insuline aboutit à la consommation du glucose par les cellules cibles.

Au niveau des organes de stockage du glucose (le foie et les muscles), cette hormone stimule la synthèse de glycogène.

Comment la glycémie est régulée ?

$$[\text{Glucose}] = 0,7 - 1,10 \text{ g/L}$$

Intervention de deux hormones antagonistes : le glucagon et l'insuline.

Hyperglycémie : le pancréas libère l'insuline qui favorise l'entrée du glucose sanguin dans les organes de stockage.

Hypoglycémie : le pancréas sécrète du glucagon.

La fixation de l'insuline aboutit à la consommation du glucose par les cellules cibles.

Au niveau des organes de stockage du glucose (le foie et les muscles), cette hormone stimule la synthèse de glycogène.

Elle stimule aussi la synthèse de lipides dans les tissus adipeux.

Qu'est-ce que le diabète ?

Le diabète est une maladie liée à une défaillance des mécanismes biologiques de régulation de la glycémie menant à une hyperglycémie.



La biotechnologie au secours des diabétiques

Il faut attendre en 1921 pour assister à la découverte de l'insuline par Banting et Best, deux professeurs de l'Université de Toronto. Ils avaient isolé l'insuline à partir d'extraits pancréatiques et avaient démontré que le pancréas sécrétait dans le sang une substance qui permettait l'assimilation du sucre.



La biotechnologie au secours des diabétiques

Il faut attendre en 1921 pour assister à la découverte de l'insuline par Banting et Best, deux professeurs de l'Université de Toronto. Ils avaient isolé l'insuline à partir d'extraits pancréatiques et avaient démontré que le pancréas sécrétait dans le sang une substance qui permettait l'assimilation du sucre.

Cette découverte a rendu possible le traitement de cette maladie et a permis à de nombreux malades de mener une vie normale. L'insuline a permis d'éliminer presque complètement la mortalité directe et l'infertilité due à cette maladie.



La biotechnologie au secours des diabétiques

Il faut attendre en 1921 pour assister à la découverte de l'insuline par Banting et Best, deux professeurs de l'Université de Toronto. Ils avaient isolé l'insuline à partir d'extraits pancréatiques et avaient démontré que le pancréas sécrétait dans le sang une substance qui permettait l'assimilation du sucre.

Cette découverte a rendu possible le traitement de cette maladie et a permis à de nombreux malades de mener une vie normale. L'insuline a permis d'éliminer presque complètement la mortalité directe et l'infertilité due à cette maladie.

L'insuline employée dans le traitement de ces malades provenaient de pancréas de bœufs ou de porcs. Cette insuline animale diffère de l'insuline humaine et cause des problèmes d'allergie.



La biotechnologie au secours des diabétiques

Il faut attendre en 1921 pour assister à la découverte de l'insuline par Banting et Best, deux professeurs de l'Université de Toronto. Ils avaient isolé l'insuline à partir d'extraits pancréatiques et avaient démontré que le pancréas sécrétait dans le sang une substance qui permettait l'assimilation du sucre.

Cette découverte a rendu possible le traitement de cette maladie et a permis à de nombreux malades de mener une vie normale. L'insuline a permis d'éliminer presque complètement la mortalité directe et l'infertilité due à cette maladie.

L'insuline employée dans le traitement de ces malades provenaient de pancréas de porcs ou de bœufs. Cette insuline animale diffère de l'insuline humaine et cause des problèmes d'allergie.

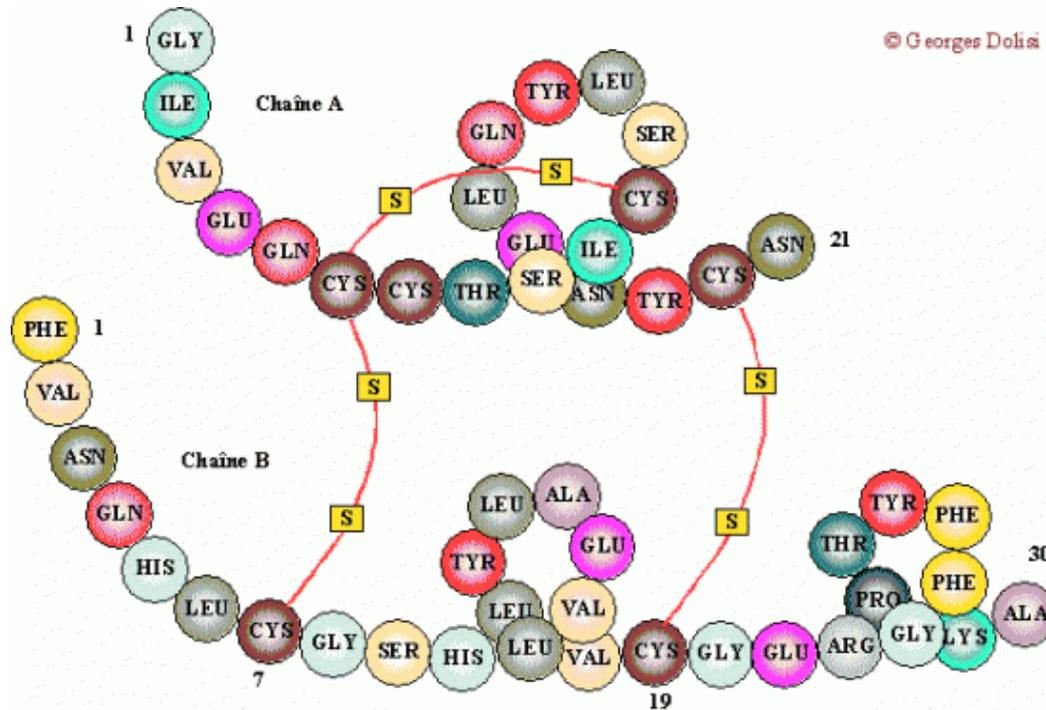
Les insulines humaines obtenues par génie génétique sont, contrairement aux anciennes insulines prélevées chez les bovins et le porcs, d'une stabilité telle que depuis 2010 beaucoup de patients insulinotraités ne sont pas des patients insulinodépendants : l'usage de l'insuline évite une fatigue à long terme des reins observée avec les médicaments chimiques genre metformine.



Structure chimique de l'insuline

Structure chimique de l'insuline

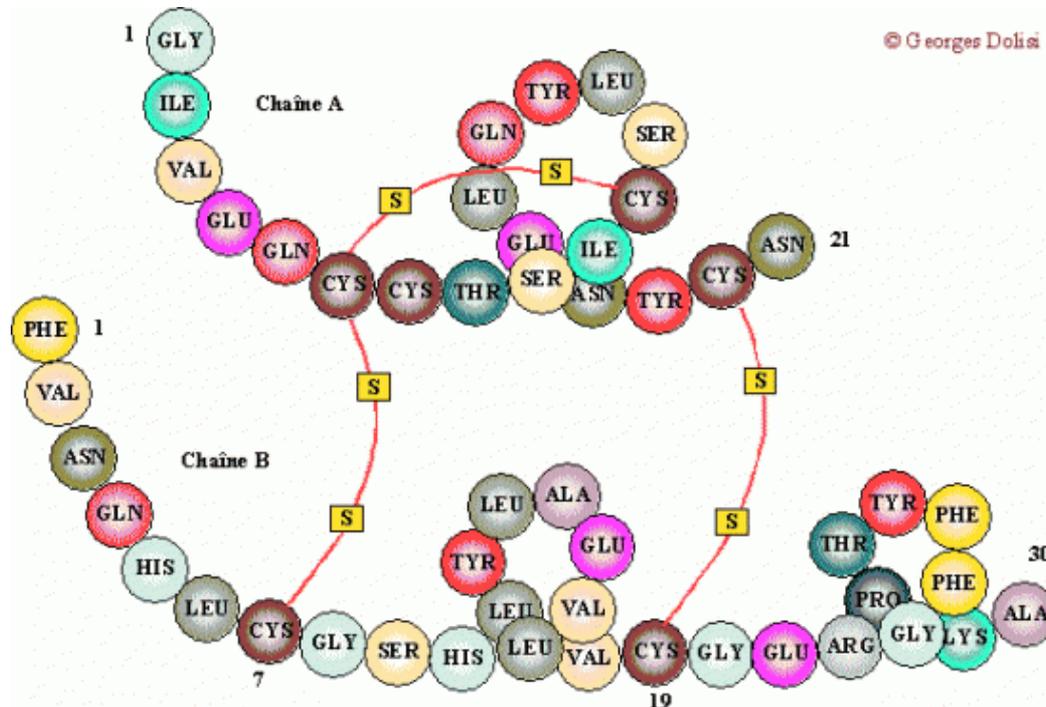
La structure a été déterminée par Frederick Sanger : ce fut en 1958 l'objet du premier de ses deux prix Nobel de Chimie.



Structure chimique de l'insuline

La structure a été déterminée par Frederick Sanger : ce fut en 1958 l'objet du premier de ses deux prix Nobel de Chimie.

L'insuline est une hormone peptidique de formule brute $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$, de poids moléculaire 5 800, cristallisée ($F = 81^{\circ}C$).

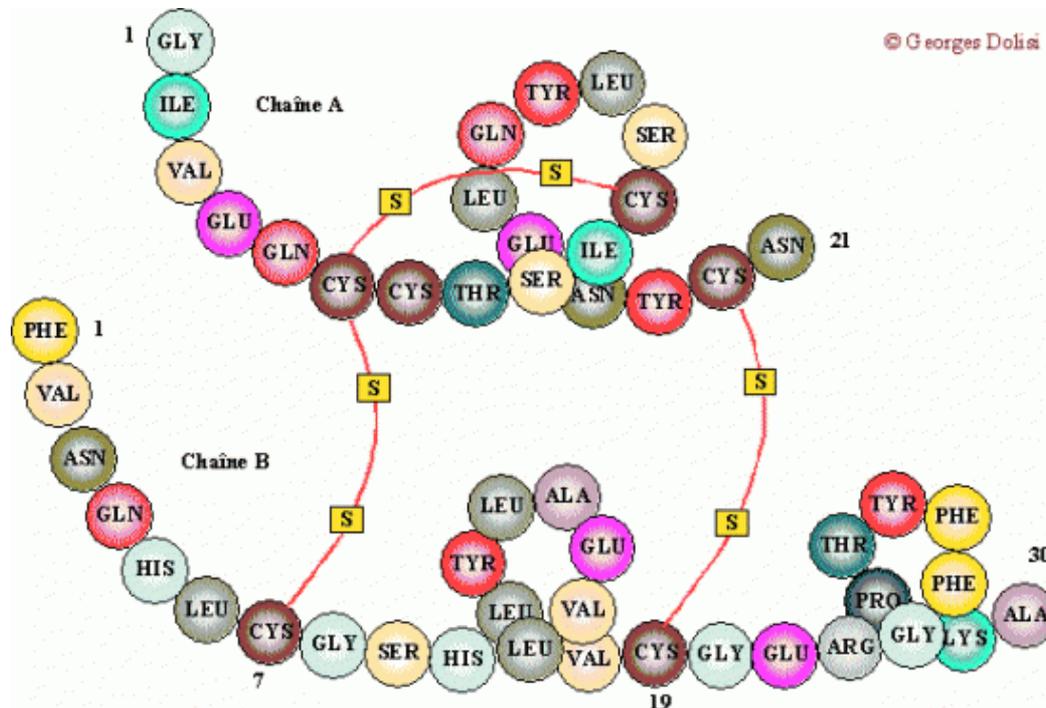


Structure chimique de l'insuline

La structure a été déterminée par Frederick Sanger : ce fut en 1958 l'objet du premier de ses deux prix Nobel de Chimie.

L'insuline est une hormone peptidique de formule brute $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$, de poids moléculaire 5 800, cristallisée ($F = 81^{\circ}C$).

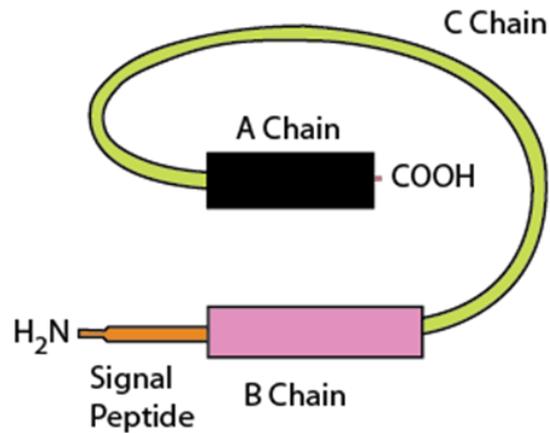
Elle est constituée de 2 chaînes, comportant l'une (chaîne A) 21 et l'autre (chaîne B) 30 acides aminés, réunies par deux ponts disulfure, avec un troisième pont interne sur la chaîne courte.



Synthèse de l'insuline

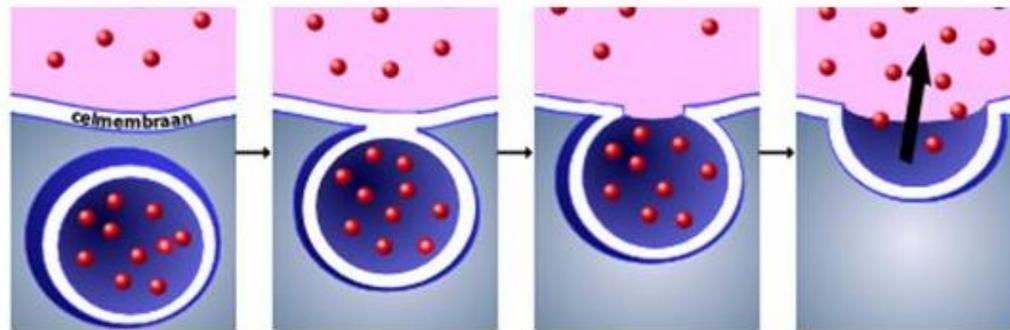
Synthèse de l'insuline

L'insuline est produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas sous la forme d'une préproinsuline constituée d'une seule chaîne peptidique, dont deux fragments :



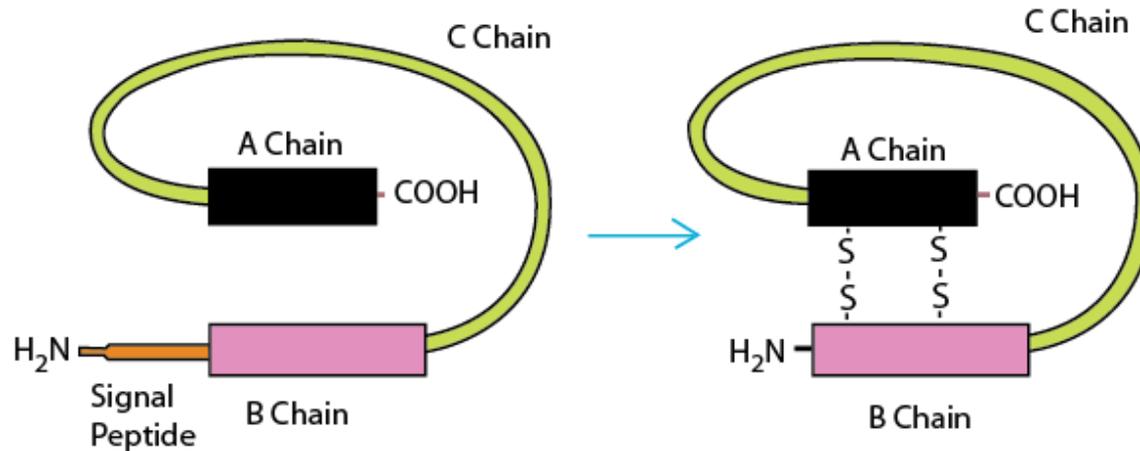
Qu'est ce que l'exocytose ?

L'**exocytose** est un mécanisme par lequel une cellule libère des molécules contenues dans la vacuole qui **fusionne** avec la **membrane** plasmique et sortent de la cellule



Synthèse de l'insuline

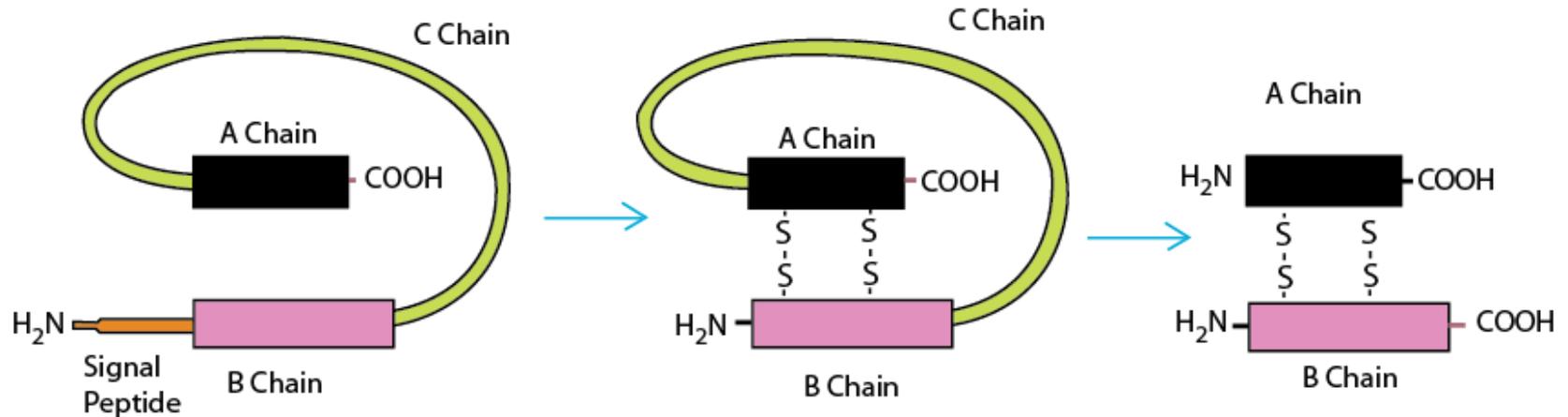
L'insuline est produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas sous la forme d'une préproinsuline constituée d'une seule chaîne peptidique, dont deux fragments :



- **Le peptide signal (24AA)** est éliminé par l'action d'une enzyme, **la signal peptidase** qui va cliver le peptide signal entraînant la création des trois ponts disulfures (**proinsuline**) ;

Synthèse de l'insuline

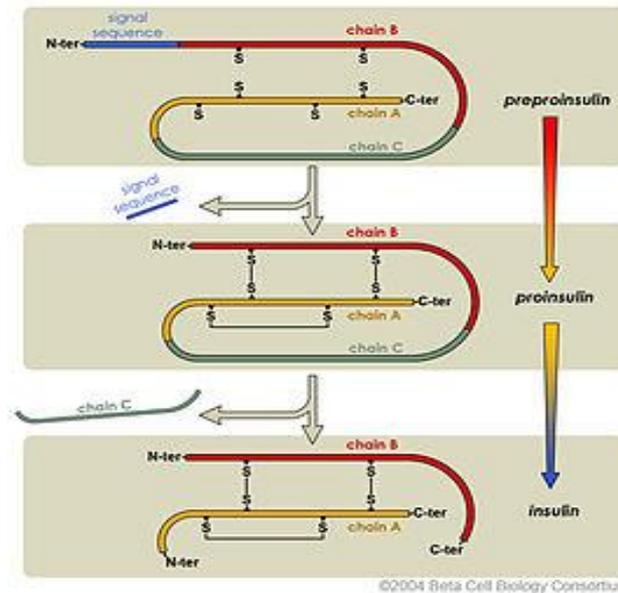
L'insuline est produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas sous la forme d'une préproinsuline constituée d'une seule chaîne peptidique, dont deux fragments :



- **Le peptide signal (24AA)** est éliminé par l'action d'une enzyme, **la signal peptidase** qui va cliver le peptide signal entraînant la création des trois ponts disulfures (**proinsuline**) ;
- **La proinsuline** obtenue subira l'élimination du **peptide C** par une autre enzyme, **la PC1**, ce qui va libérer un fragment central, tandis que les deux chaînes néoformées vont rester associées grâce aux ponts disulfures ;

Synthèse de l'insuline

L'insuline est produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas sous la forme d'une préproinsuline constituée d'une seule chaîne peptidique, dont deux fragments :



- **Le peptide signal (24AA)** est éliminé par l'action d'une enzyme, **la signal peptidase** qui va cliver le peptide signal entraînant la création des trois ponts disulfures (**proinsuline**) ;
- **La proinsuline** obtenue subira l'élimination du **peptide C** par une autre enzyme, **la PC1**, ce qui va libérer un fragment central, tandis que les deux chaînes néoformées vont rester associées grâce aux ponts disulfures ;
 - L'extrémité C-Terminale d'une des chaînes va être clivée par l'action d'**une carboxypeptidase E (CPE)** pour devenir l'**insuline** sous sa forme **mature**, et donc **active**

Production d'insuline

Insuline humaine recombinante : forme d'insuline (nom commercial **Humulin**)
fabriquée à partir d'ADN recombinant qui est l'insuline humaine.



Production d'insuline par génie génétique

Les hôtes les plus utilisés à l'heure actuelle sont incontestablement la bactérie *Escherichia coli* et la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

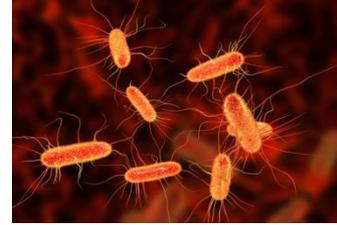
The logo for Eli Lilly, featuring the word "Lilly" in a red, cursive script font.

Eli Lilly
(Bacterial host)



Novo Nordisk
(Yeast host)

Escherichia coli





Escherichia coli



Une génétique simple et bien comprise;





Escherichia coli



Une génétique simple et bien comprise;

Facilité de manipulation génétique;





Escherichia coli



Une génétique simple et bien comprise;

Facilité de manipulation génétique;

Coût de culture minimal;





Escherichia coli



Une génétique simple et bien comprise;

Facilité de manipulation génétique;

Coût de culture minimal;

Expression rapide (le temps de doublement est seulement de 20 à 30 minutes);





Escherichia coli



Une génétique simple et bien comprise;

Facilité de manipulation génétique;

Coût de culture minimal;

Expression rapide (le temps de doublement est seulement de 20 à 30 minutes);

Fermentation : cas de passage à grande échelle;





Escherichia coli



Une génétique simple et bien comprise;

Facilité de manipulation génétique;

Coût de culture minimal;

Expression rapide (le temps de doublement est seulement de 20 à 30 minutes);

Fermentation : cas de passage à grande échelle;

Facilité de purification des corps d'inclusion.





Escherichia coli



Perte de propriété plasmidique et antibiotique;



Escherichia coli



Perte de propriété plasmidique et antibiotique;

Inducteurs non sollicités pour l'expression génique;





Escherichia coli



Perte de propriété plasmidique et antibiotique;

Inducteurs non sollicités pour l'expression génique;

Accumulation intracellulaire de protéines hétérologues en tant que corps d'inclusion;





Escherichia coli



Perte de propriété plasmidique et antibiotique;

Inducteurs non sollicités pour l'expression génique;

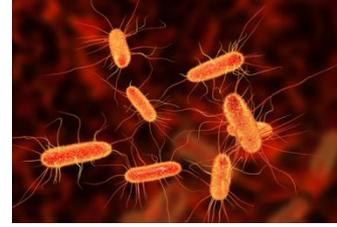
Accumulation intracellulaire de protéines hétérologues en tant que corps d'inclusion;

Repliement incorrect des protéines;





Escherichia coli



Perte de propriété plasmidique et antibiotique;

Inducteurs non sollicités pour l'expression génique;

Accumulation intracellulaire de protéines hétérologues en tant que corps d'inclusion;

Repliement incorrect des protéines;

Absence de modifications post-traductionnelles (notamment incapables de former des liaisons disulfures);





Escherichia coli



Perte de propriété plasmidique et antibiotique;

Inducteurs non sollicités pour l'expression génique;

Accumulation intracellulaire de protéines hétérologues en tant que corps d'inclusion;

Repliement incorrect des protéines;

Absence de modifications post-traductionnelles (notamment incapables de former des liaisons disulfures);

Charge métabolique et stress induits par les protéines;





Escherichia coli



Perte de propriété plasmidique et antibiotique;

Inducteurs non sollicités pour l'expression génique;

Accumulation intracellulaire de protéines hétérologues en tant que corps d'inclusion;

Repliement incorrect des protéines;

Absence de modifications post-traductionnelles (notamment incapables de former des liaisons disulfures);

Charge métabolique et stress induits par les protéines;

Contamination par les endotoxines;





Escherichia coli



Perte de propriété plasmidique et antibiotique;

Inducteurs non sollicités pour l'expression génique;

Accumulation intracellulaire de protéines hétérologues en tant que corps d'inclusion;

Repliement incorrect des protéines;

Absence de modifications post-traductionnelles (notamment incapables de former des liaisons disulfures);

Charge métabolique et stress induits par les protéines;

Contamination par les endotoxines;

Mauvaise sécrétion;





Escherichia coli



Perte de propriété plasmidique et antibiotique;

Inducteurs non sollicités pour l'expression génique;

Accumulation intracellulaire de protéines hétérologues en tant que corps d'inclusion;

Repliement incorrect des protéines;

Absence de modifications post-traductionnelles (notamment incapables de former des liaisons disulfures);

Charge métabolique et stress induits par les protéines;

Contamination par les endotoxines;

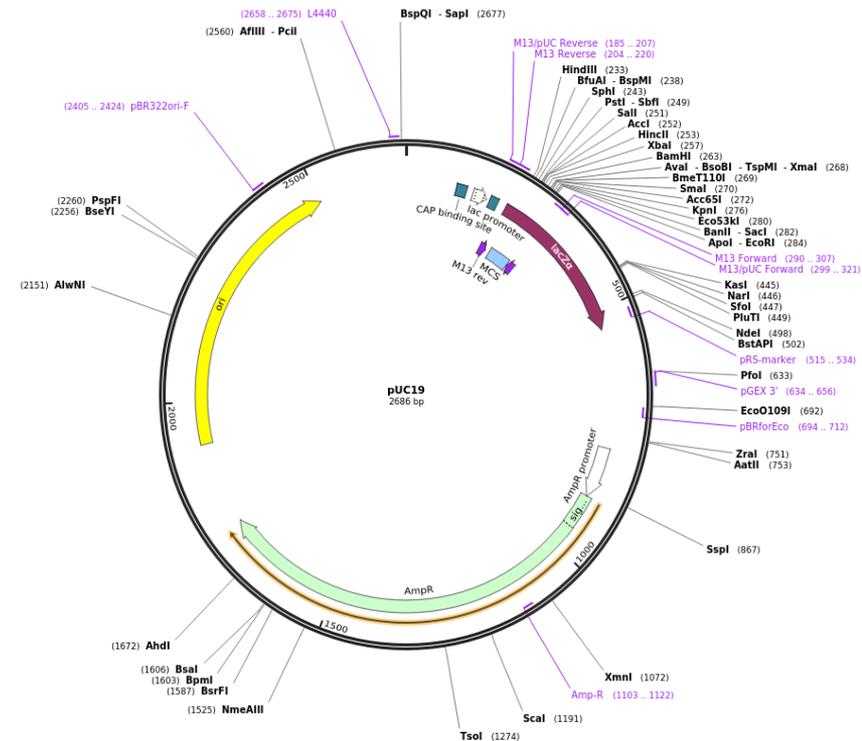
Mauvaise sécrétion;

Complexité de la digestion protéolytique dans le traitement en aval.



Vecteur d'expression : les plasmides

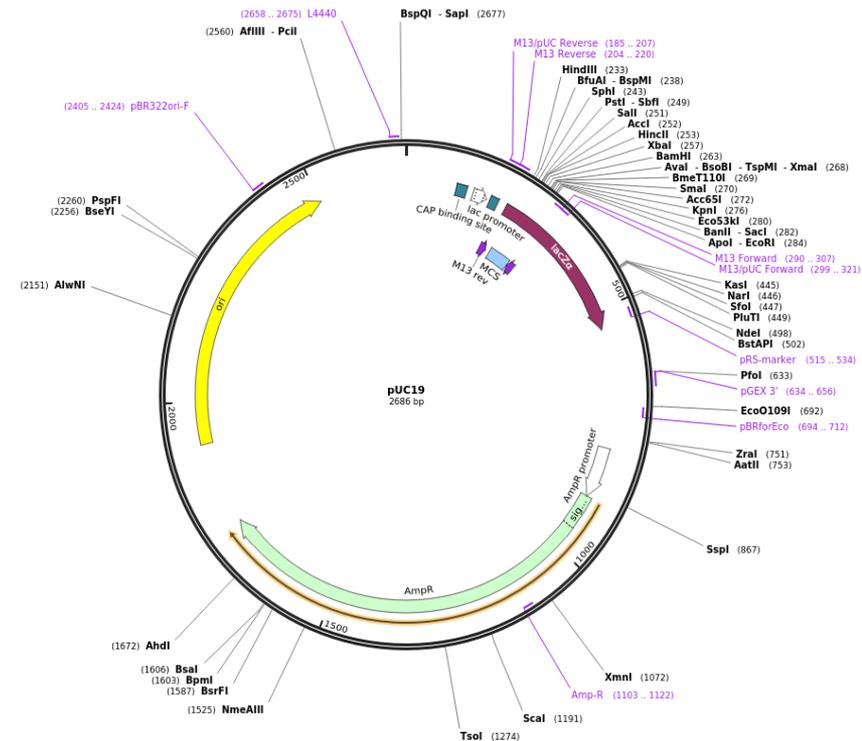
Molécules d'ADN double brin libres le plus souvent circulaire, à localisation extrachromosomique, à capacité de réplication autonome et procure un avantage sélectif.



Vecteur d'expression : les plasmides

Molécules d'ADN double brin libres le plus souvent circulaire, à localisation extrachromosomique, à capacité de réplication autonome et procure un avantage sélectif.

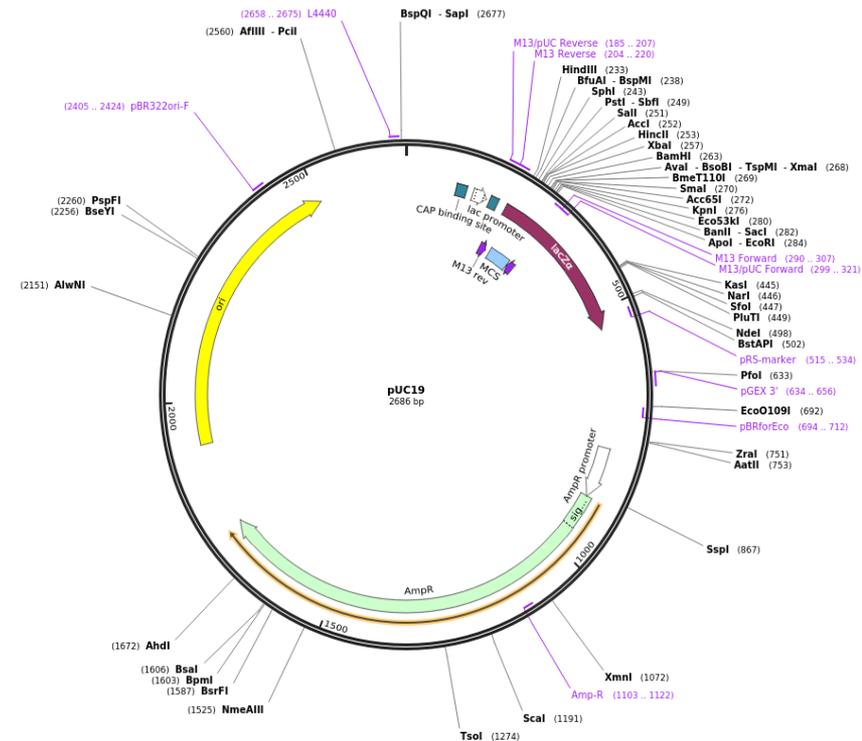
- Présents chez la plupart des espèces bactériennes;



Vecteur d'expression : les plasmides

Molécules d'ADN double brin libres le plus souvent circulaire, à localisation extrachromosomique, à capacité de réplication autonome et procure un avantage sélectif.

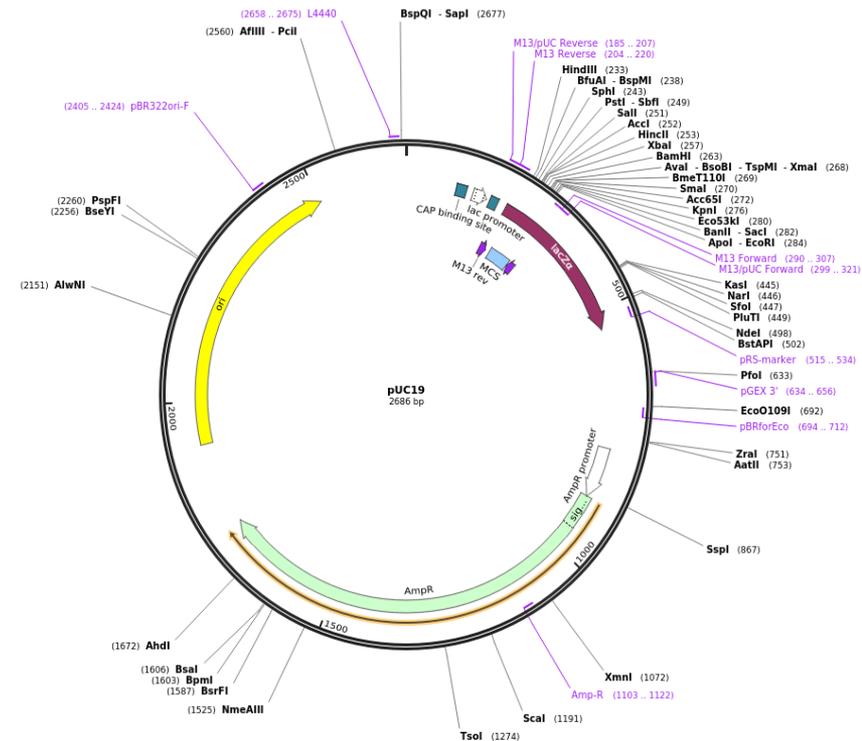
- Présents chez la plupart des espèces bactériennes;
- Tailles très variables entre 1Kb à 1 mégabase;



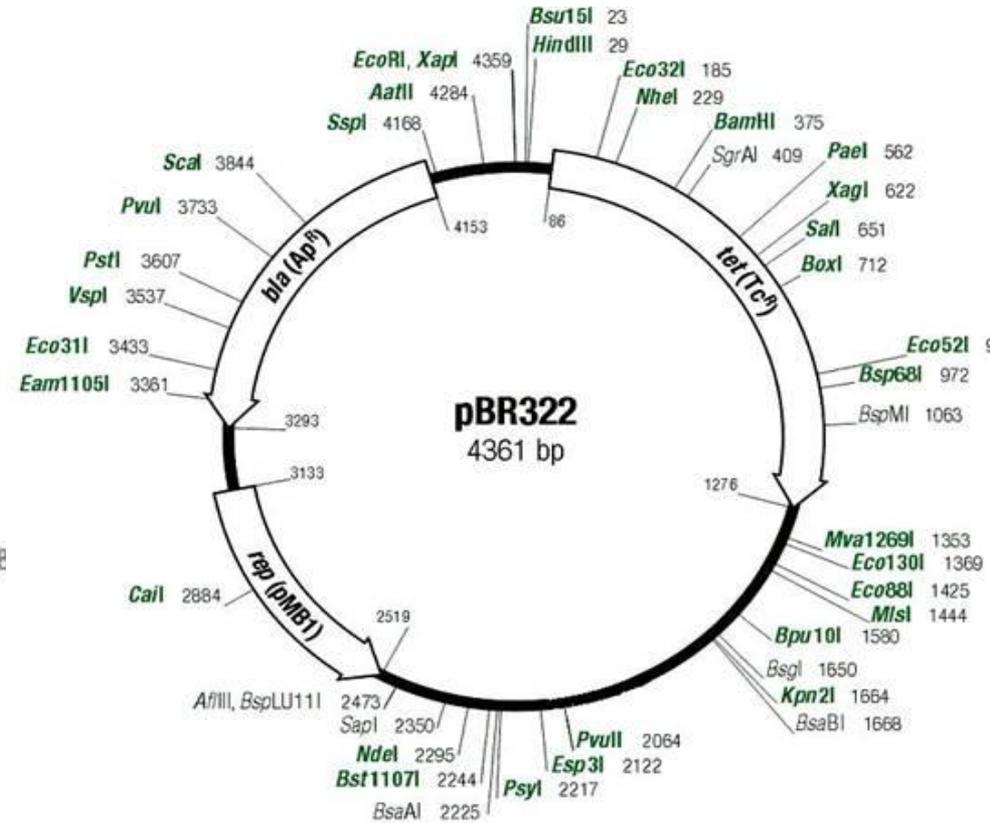
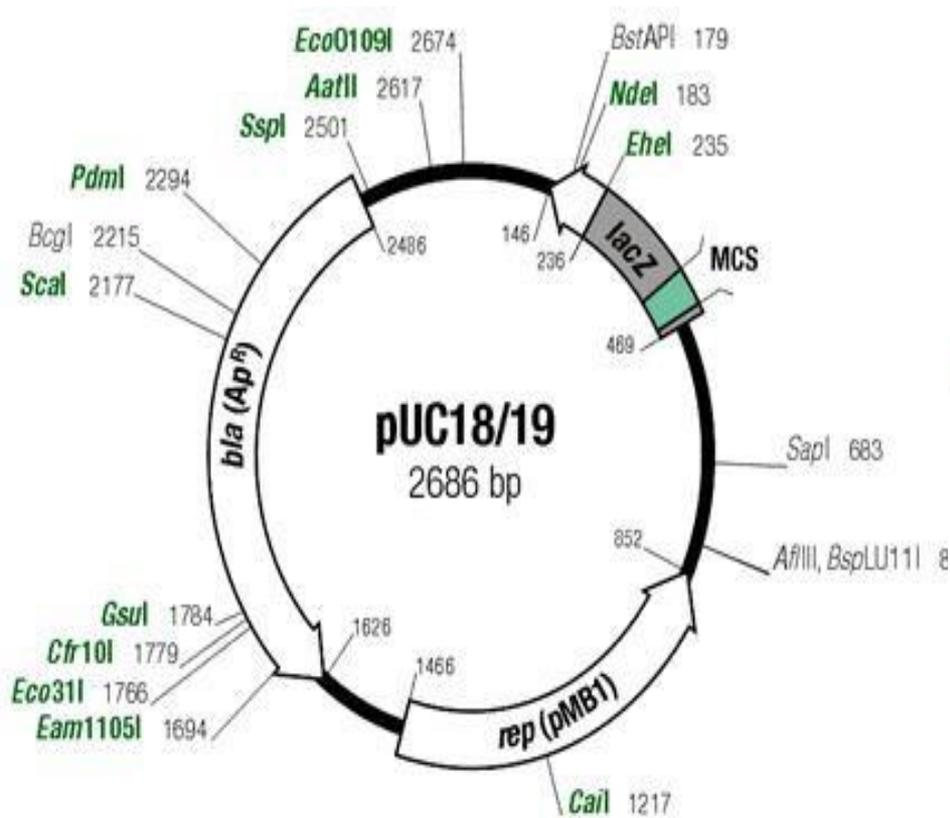
Vecteur d'expression : les plasmides

Molécules d'ADN double brin libres le plus souvent circulaire, à localisation extrachromosomique, à capacité de réplication autonome et procure un avantage sélectif.

- Présents chez la plupart des espèces bactériennes;
- Tailles très variables entre 1Kb à 1 mégabase;
- Confèrent à la bactérie-hôte une grande souplesse génétique (en augmentant son patrimoine génétique).



Vecteur d'expression : les plasmides



Les plasmides bactériens

Petits et faciles à manipuler;



Les plasmides bactériens

Petits et faciles à manipuler;

Stratégies de sélection simples;



Les plasmides bactériens

Petits et faciles à manipuler;

Stratégies de sélection simples;

Utiles pour le clonage de petits fragments d'ADN;



Les plasmides bactériens

Petits et faciles à manipuler;

Stratégies de sélection simples;

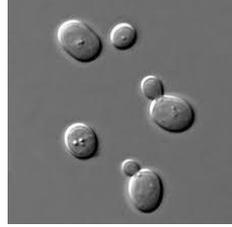
Utiles pour le clonage de petits fragments d'ADN;

Ne peuvent pas assimiler de larges molécules d'ADN.





Saccharomyces cerevisiae

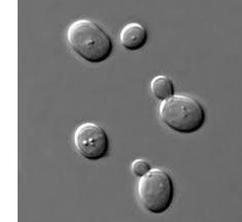


***S. cerevisiae* est un système microbien eucaryote utilisé pour l'expression de protéines nécessitant une modification post-traductionnelle.**





Saccharomyces cerevisiae



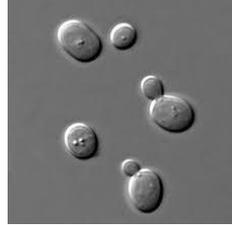
S. cerevisiae est un système microbien eucaryote utilisé pour l'expression de protéines nécessitant une modification post-traductionnelle.

Non pathogène;





Saccharomyces cerevisiae



S. cerevisiae est un système microbien eucaryote utilisé pour l'expression de protéines nécessitant une modification post-traductionnelle.

Non pathogène;

Croissance rapide;





Saccharomyces cerevisiae



S. cerevisiae est un système microbien eucaryote utilisé pour l'expression de protéines nécessitant une modification post-traductionnelle.

Non pathogène;

Croissance rapide;

Cellules dispersées;





Saccharomyces cerevisiae



S. cerevisiae est un système microbien eucaryote utilisé pour l'expression de protéines nécessitant une modification post-traductionnelle.

Non pathogène;

Croissance rapide;

Cellules dispersées;

Facilité de réplication et d'isolement des mutants;





Saccharomyces cerevisiae



S. cerevisiae est un système microbien eucaryote utilisé pour l'expression de protéines nécessitant une modification post-traductionnelle.

Non pathogène;

Croissance rapide;

Cellules dispersées;

Facilité de réplication et d'isolement des mutants;

Elle peut être cultivée sur un milieu défini en donnant à l'enquêteur un contrôle complet sur les paramètres environnementaux;





Saccharomyces cerevisiae



S. cerevisiae est un système microbien eucaryote utilisé pour l'expression de protéines nécessitant une modification post-traductionnelle.

Non pathogène;

Croissance rapide;

Cellules dispersées;

Facilité de réplication et d'isolement des mutants;

Elle peut être cultivée sur un milieu défini en donnant à l'enquêteur un contrôle complet sur les paramètres environnementaux;

Système génétique bien défini;





Saccharomyces cerevisiae



S. cerevisiae est un système microbien eucaryote utilisé pour l'expression de protéines nécessitant une modification post-traductionnelle.

Non pathogène;

Croissance rapide;

Cellules dispersées;

Facilité de réplication et d'isolement des mutants;

Elle peut être cultivée sur un milieu défini en donnant à l'enquêteur un contrôle complet sur les paramètres environnementaux;

Système génétique bien défini;

Système de transformation de l'ADN hautement polyvalent.





Saccharomyces cerevisiae



S. cerevisiae est un système microbien eucaryote utilisé pour l'expression de protéines nécessitant une modification post-traductionnelle.

Elle n'est pas aussi productive comme *E. coli*.



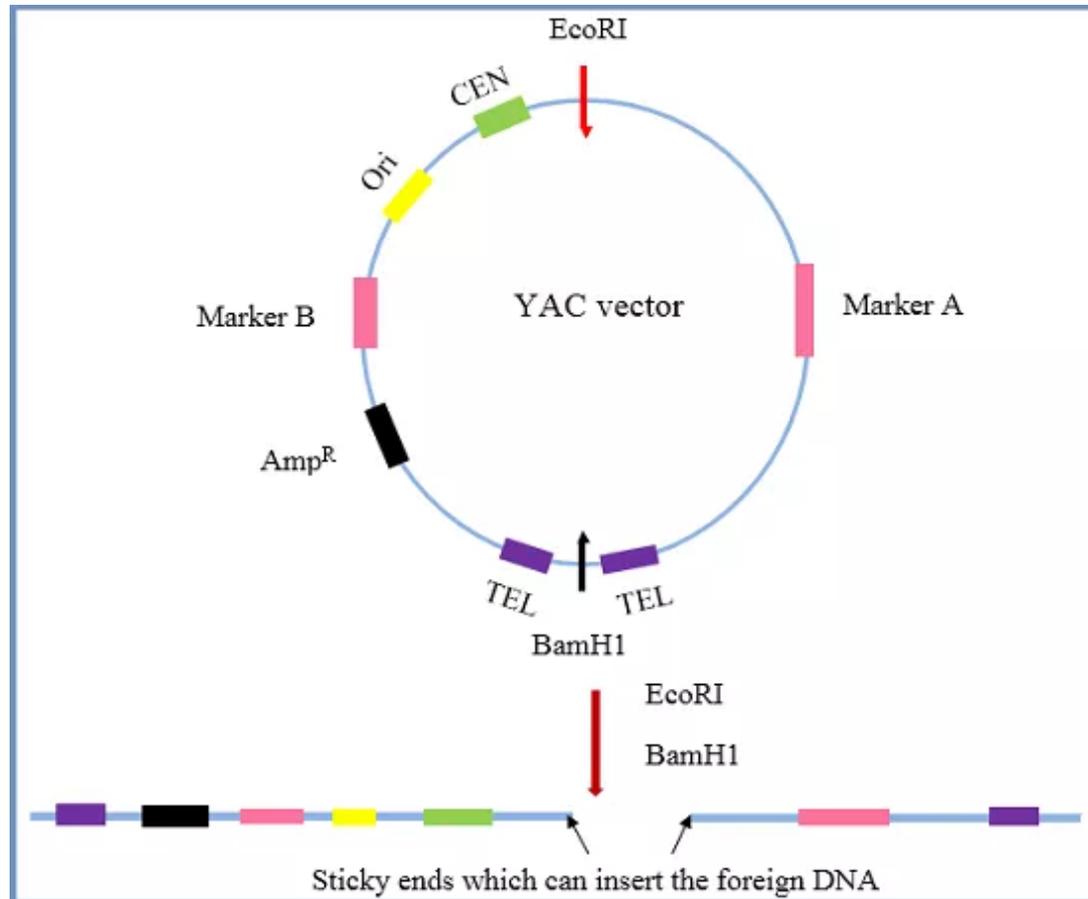
Vecteur d'expression : les YAC

Les chromosomes artificiels de levure (YAC, en anglais : yeast artificial chromosomes) sont très utilisés dans les techniques de biologie moléculaire. Ils contiennent au moins une origine de réplication, un centromère et des télomères provenant de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. De plus ils contiennent habituellement des gènes permettant leur sélection dans une population de levures.

Les YAC sont des molécule d'ADN modifiée par l'homme utilisée pour cloner des séquences d'ADN dans des cellules bactériennes et de levures.

Les YAC permettent de cloner des fragments d'ADN de très grande taille (100 à 3 000 kb)
A établir la première carte physique du génome humain.

Vecteur d'expression : les YAC



Vecteur d'expression : les YAC

ADVANTAGES OF YAC

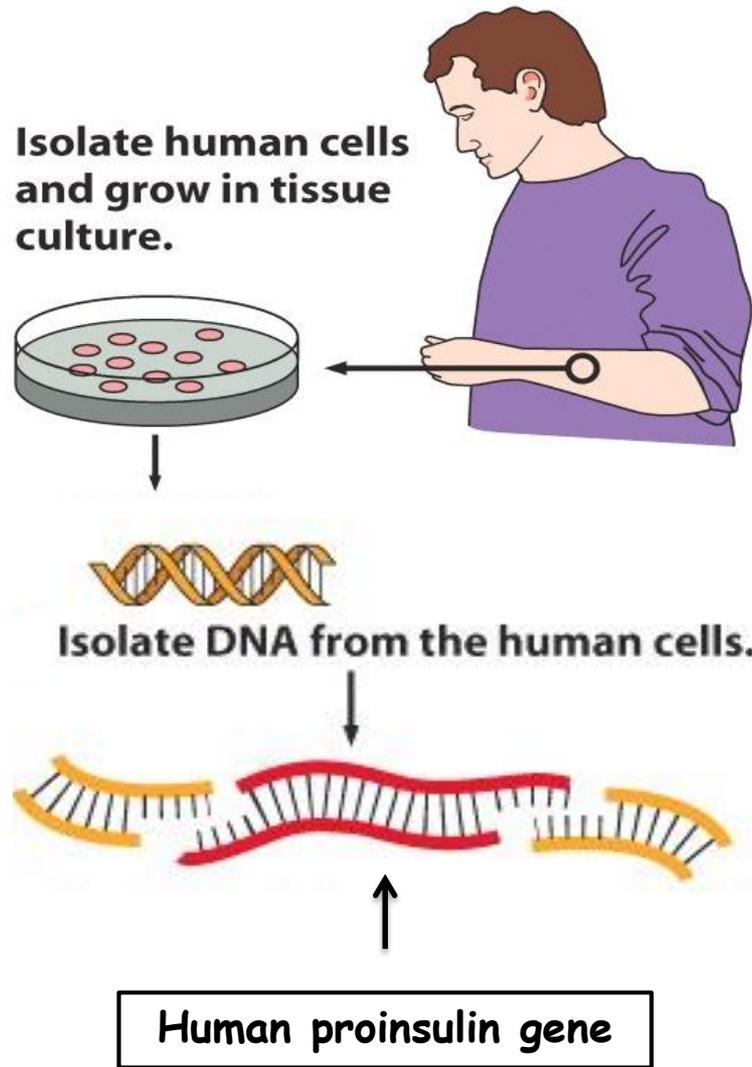
- **Extremely large DNA molecules** (up to more than 1 Mb) can be introduced and propagated in the form of yeast artificial chromosomes (YACs) in *S. cerevisiae*.
- It can be used to express **eukaryotic proteins that require posttranslational modification**.
- **Screening and selection** properties.
- YACs can be utilized to clone and assemble the entire genomes of an organism.
- Physical mapping.

Vecteur d'expression : les YAC

DISADVANTAGES OF YAC

- Low transformation efficiencies.
- YACs are very difficult to manipulate.
- Approximately 40 % of the YACs from most libraries are deleted.
- Approximately 40-60% of the YACs from most libraries are chimeric.

Insuline produite par la technologie de l'ADN recombinant

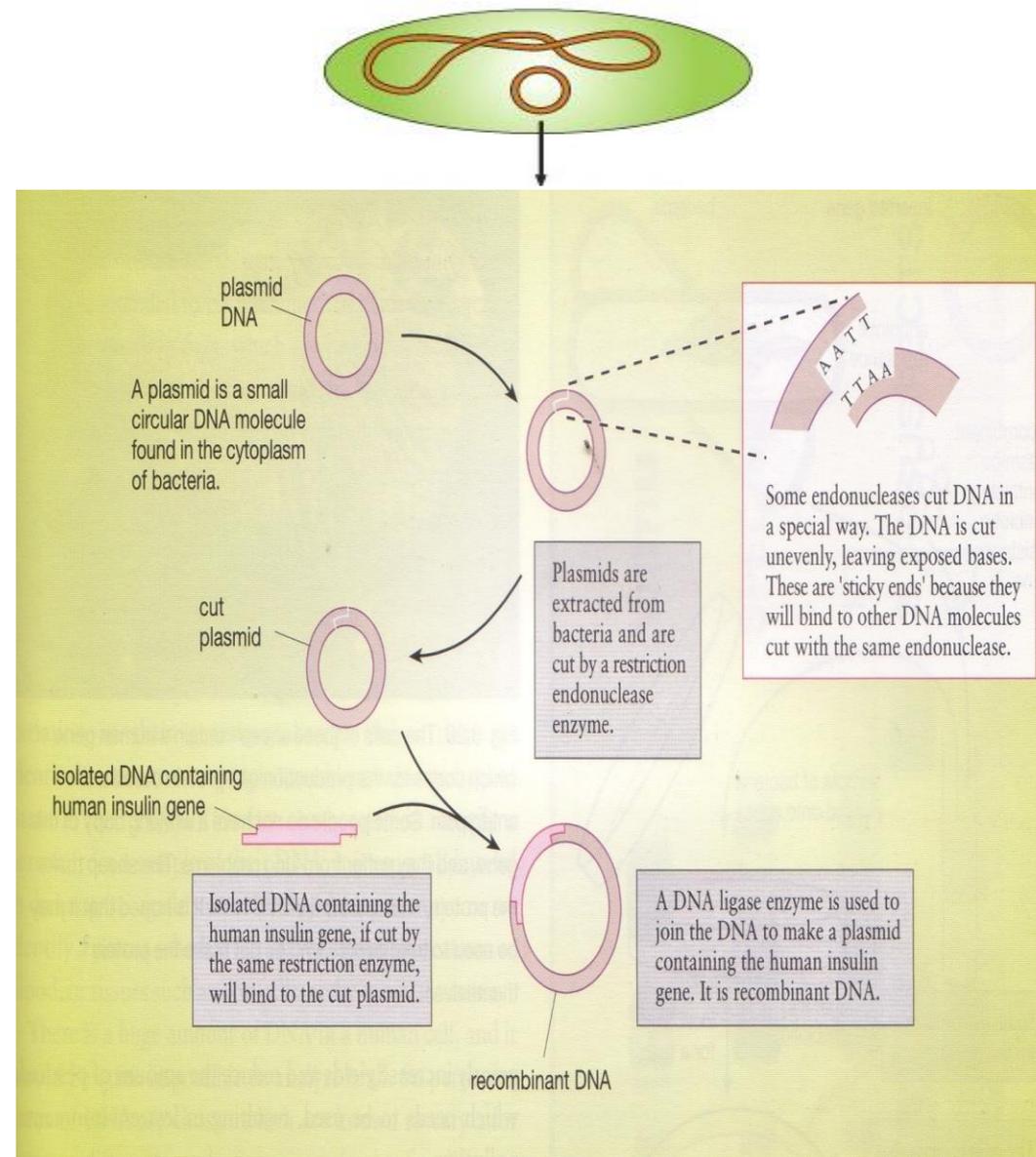


Insuline produite par la technologie de l'ADN recombinant

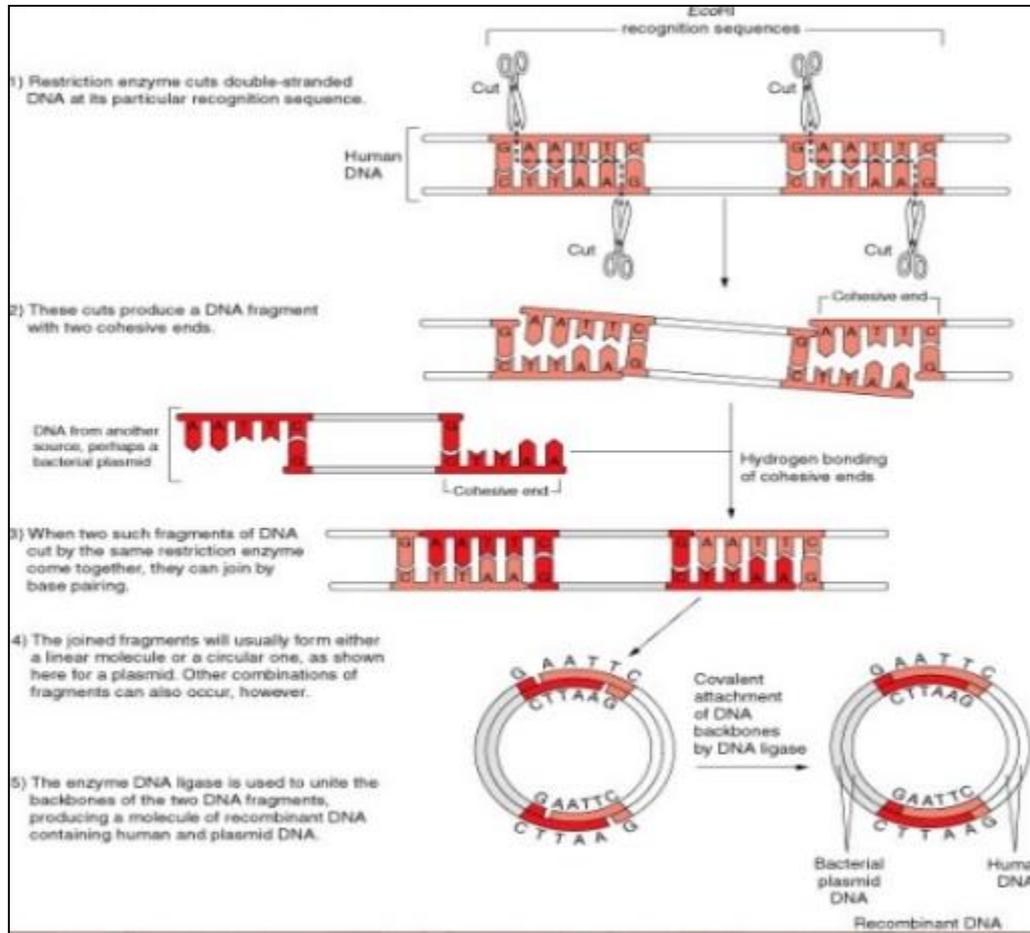
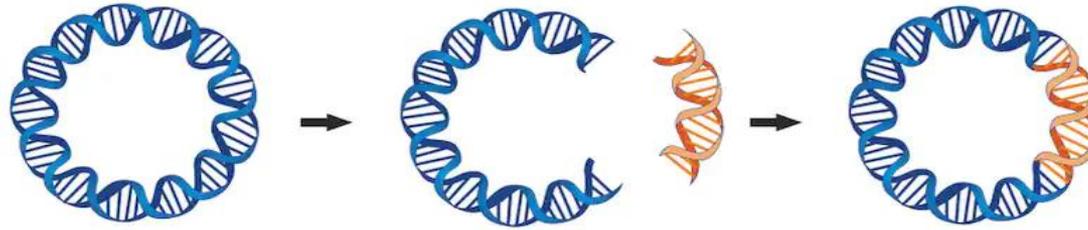
Tout d'abord, le vecteur approprié (plasmide) est isolé de *E. coli* puis il est coupé par une enzyme de l'endonucléase de restriction.

Le gène d'intérêt (c'est-à-dire le gène codant pour l'insuline) est isolé de la cellule β et inséré dans un plasmide ouvert.

Le plasmide et le gène d'intérêt sont recombinés ensemble par l'enzyme ADN ligase.



Insuline produite par la technologie de l'ADN recombinant

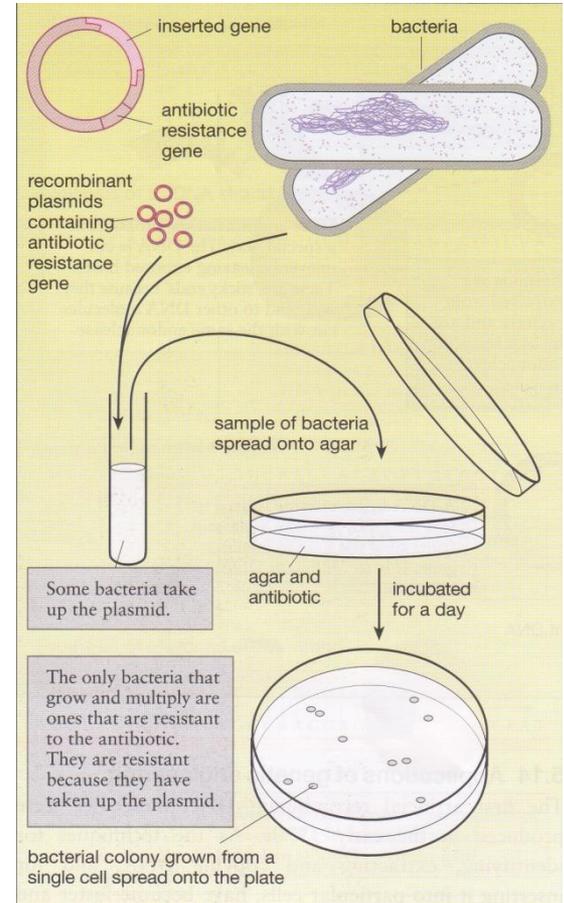


Insuline produite par la technologie de l'ADN recombinant

Ce plasmide recombiné va être insérer dans une cellule hôte appropriée (c'est-à-dire *E. coli*).

Le plasmide recombinant est inséré dans *E. coli* par le processus de transformation (électrique et/ou chimique par choc thermique).

Les bactéries recombinantes sont triées en les cultivant en présence d'un antibiotique. Les bactéries qui survivent sont celles qui ont absorbé le plasmide. Elles sont dites transformés.



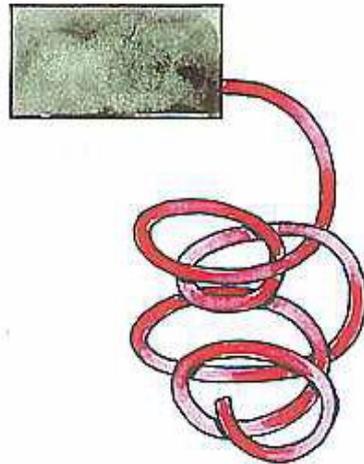
Insuline produite par la technologie de l'ADN recombinant

Hakura et al (1977) ont synthétisés chimiquement la séquence d'ADN des deux chaînes d'insuline et ces dernières ont été insérées séparément dans deux vecteurs plasmidiques PBR322.

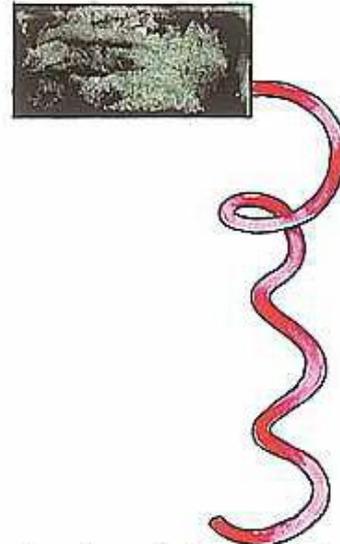
Ces gènes sont insérés à côté du gène de la β -galactosidase du plasmide.

Les plasmides recombinants sont ensuite transformés séparément dans l'hôte *E. coli*.

Les hôtes recombinantes produisent des chaînes de pro-insuline : les protéines formées consistent en partie en β -galactosidase, jointif à la chaîne A ou B de l'insuline.



β - gal protein fused with A chain insulin protein.



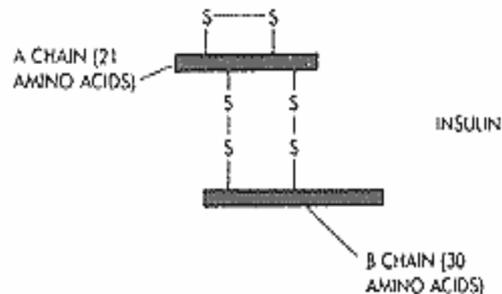
β - gal protein fused with B chain insulin protein.

Insuline produite par la technologie de l'ADN recombinant

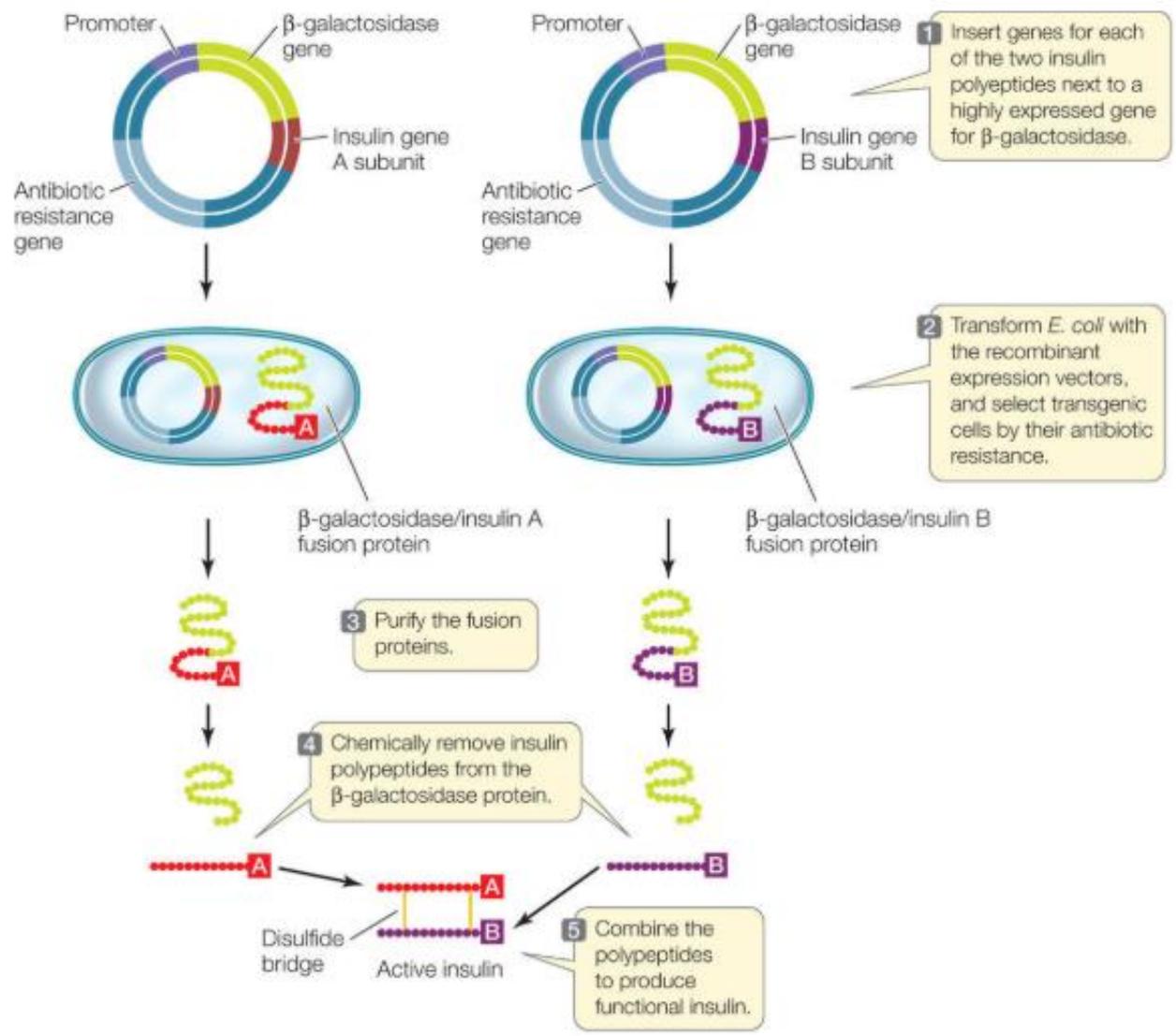
Les chaînes A et B sont alors extraites à partir du fragment β -galactosidase et purifiées.

Ces chaînes pro-insuline A et B ont été séparées de la β -galactosidase par traitement au **bromure de cyanogène**. Le détachement des chaînes pro-insuline de la β -galactosidase est possible car **une méthionine** sous forme de codon supplémentaire a été ajoutée à l'extrémité N-terminale de chaque gène pour les chaînes A et B.

Après le détachement, les chaînes A et B sont jointes *in vitro* pour reconstituer l'insuline native en sulfonant les chaînes peptidiques avec du disulfonate de sodium ($C_8H_7SO_3Na$) et du sulfite de sodium (Na_2SO_3).



Insuline produite par la technologie de l'ADN recombinant



Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé dans cette méthode est composé de :

Biotine ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$);

Chlorure de calcium déshydraté ($CaCl_2$);

Dihydrogénosulfate de potassium (KH_2SO_4);

Glycérol ($C_3H_8O_3$);

Sulfate d'ammonium ($(NH_4)_2SO_4$);

Sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$);

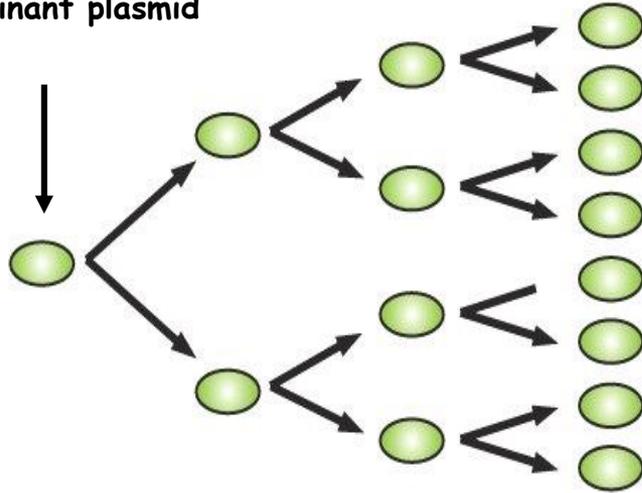
Trace d'extrait de levure;

Oligo-éléments (acide borique (H_3BO_3), acide sulfurique (H_2SO_4), sulfate de manganèse ($MnSO_4$), chlorure ferrique hexahydraté ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), sulfate de zinc ($ZnSO_4$), etc.).



Mise en culture des bactéries recombinantes

One cell with the recombinant plasmid



etc.

8 Grow trillions of new insulin-producing bacteria.



A fermentor used to grow recombinant bacteria.

C'est l'étape du clonage du gène.

Chaque plasmide recombinant se réplique dans une cellule.

Ensuite, chaque cellule contenant de nombreux plasmides recombinants produit des milliards de cellules similaires contenant le plasmide recombinant et le gène de l'insuline humaine.

Mise en culture des bactéries recombinantes



Les étapes finales consistent à collecter les bactéries, à lyser les cellules et à purifier la protéine insuline exprimée à partir du gène de l'insuline humaine recombinante.

Phases impliquées dans la production d'insuline

Processus en amont

Processus en aval

Phase de traitement en amont

Bioréacteur à agitation

Avantages:

Dépyrogénéation facile, visible et économique.

Désavantages:

Mauvaise aération;

Nécessite nettoyage et stérilisation;

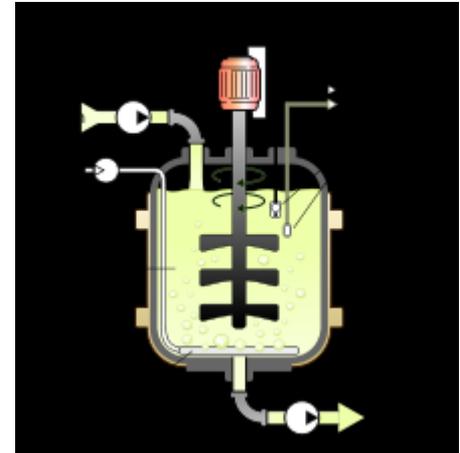
Encombrement dans l'incubateur.



Phase de traitement en amont

Bioréacteur à réservoir d'agitation

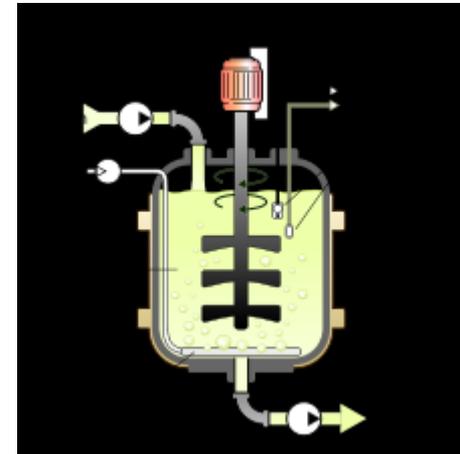
les processus continus des bioréacteurs sont en permanence alimentés en milieu de culture (éléments nutritifs) tout en recueillant en permanence les matières contenues dans les bioréacteurs.



Phase de traitement en amont

Bioréacteur à réservoir d'agitation

- L'agitateur est introduit pour disperser soigneusement les réactifs dans le mélange réactionnel dès qu'ils entrent dans le réacteur.
- Le produit est continuellement étiré et c'est pourquoi il est connu pour son mélange parfait.
- Les compositions à la sortie et à l'intérieur du réacteur sont les mêmes



Phase de traitement en amont

Avantages :

Contrôle multiples (gaz , température et pH);
Grande capacité (de 5L à 500 L);
Versatilité.

Désavantages:

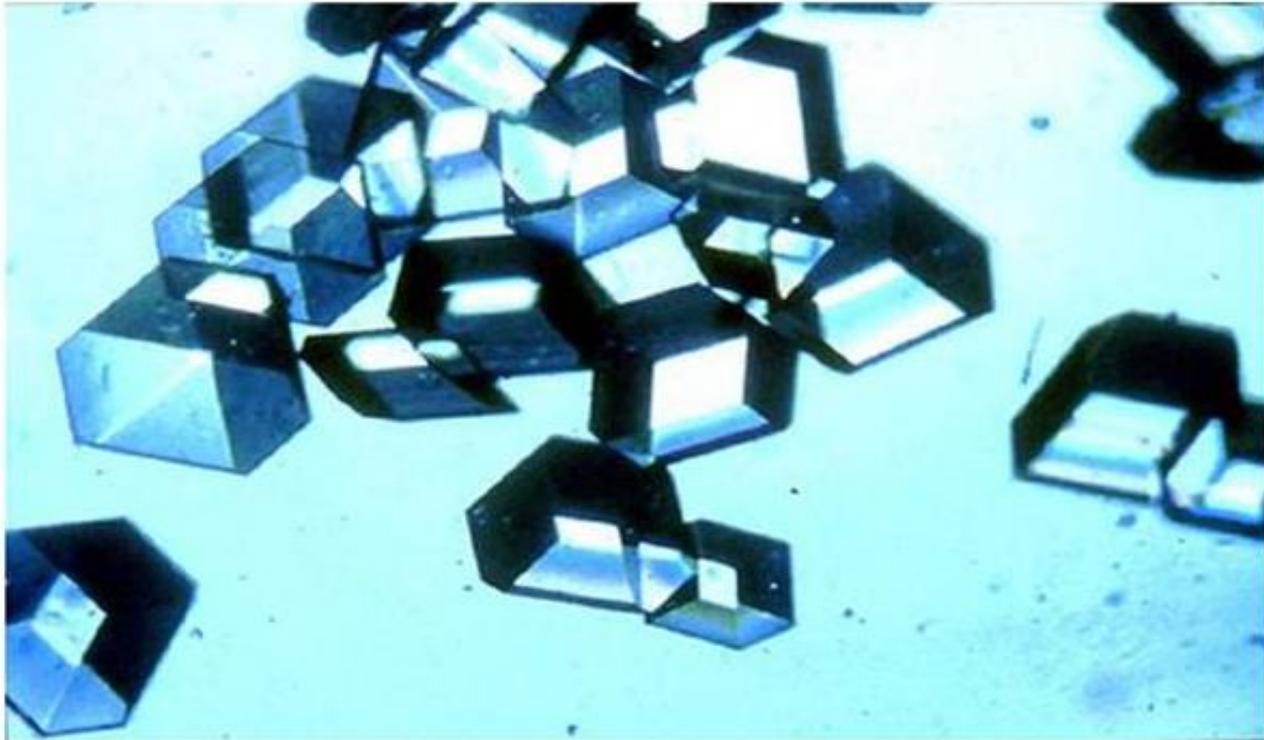
Coût;
Forte puissance due à la présence de pompes mécaniques;
Nécessite de la siliconisation;
Nécessite un nettoyage, une stérilisation et une dépyrogénéation constants;
Nécessite un entretien élevé (du refroidisseur, pièces, etc.)

Phase de traitement en amont

Conditions de culture en Bioréacteur

- Volume de travail total de 10L.
- Phase de croissance de 31 heures.
 - $T = 37^{\circ}\text{C}$.
 - $\text{pH} = 7$.

Insulin crystals from the purification process



Nouveau développement : Stylos à insuline



Insulines du futur :

Injecteurs de jet

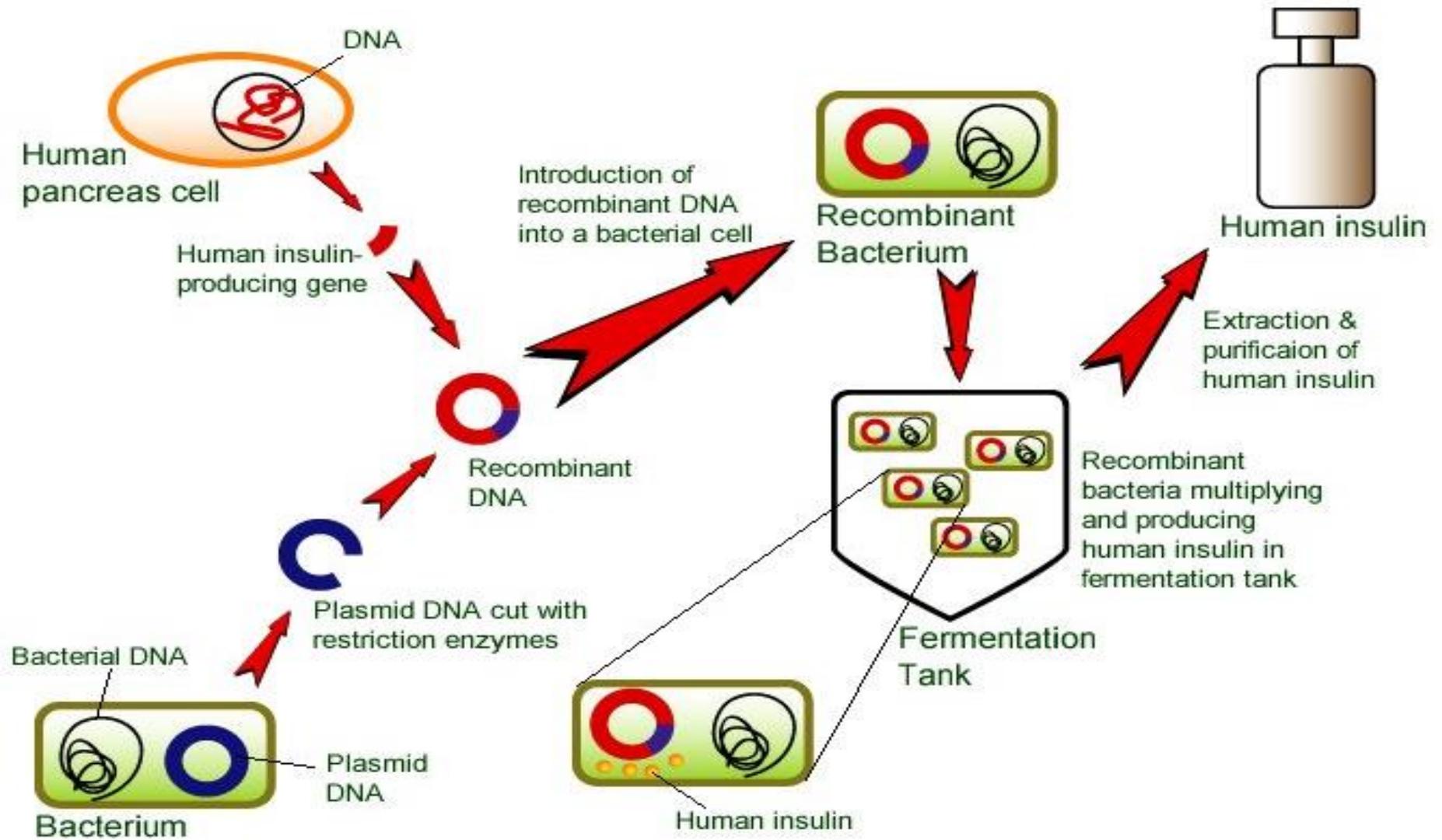
Pompes à insuline contrôlées

Pilules d'insuline orale

Inhalateur d'insuline

Patches d'insuline

Production d'insuline par génie génétique



Production d'insuline par génie génétique

