

Chapitre III :

Application de la BM en

industrie pharmaceutique

Chapitre III :

Application de la BM en industrie pharmaceutique

Plan du cour

I- La pharmaco- génétique

- 1- Variabilité de la réponse aux médicaments
- 2- Les phénotypes métaboliques
- 3- Application de la pharmacogénétique en thérapeutique

II- Production des protéines a intérêt pharmaceutique

- 1-protéine recombinante/hétérologue
- 2- Méthodes de production des protéines recombinantes
- 3- Production des protéines recombinantes dans une bactérie

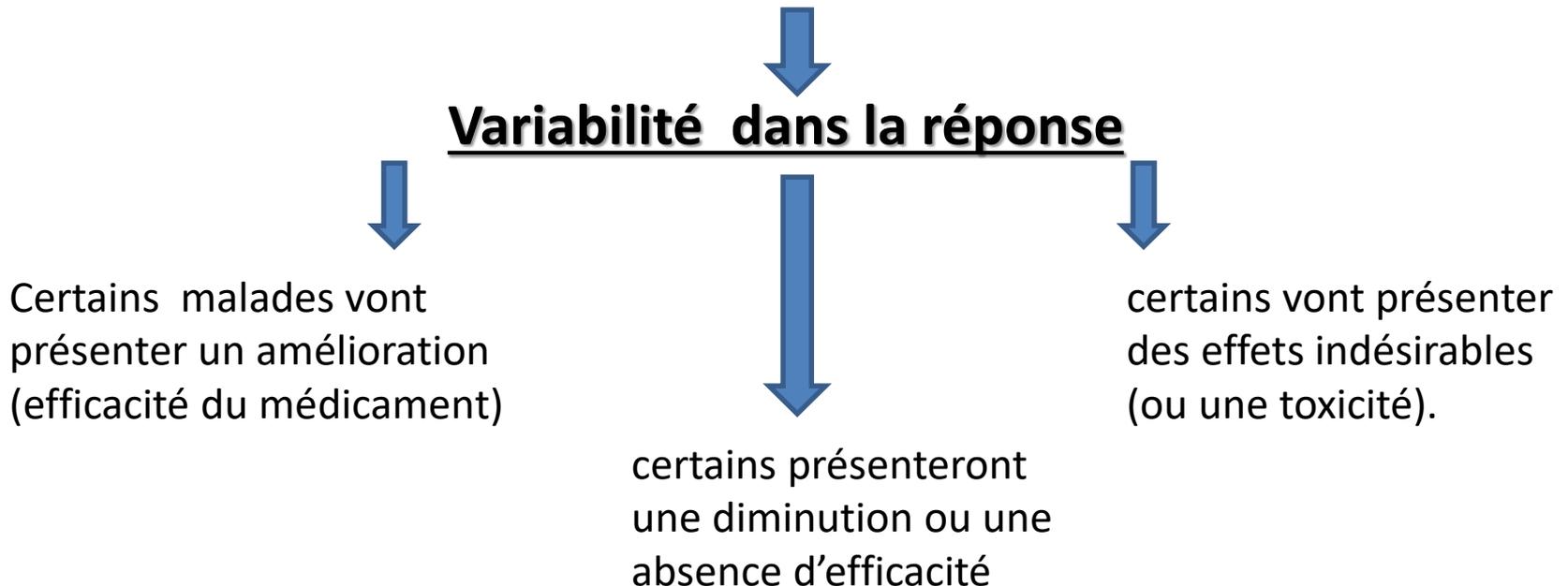
I- La pharmaco- génétique

I- La pharmaco- génétique



une division de la pharmacologie qui s'intéresse à l'étude de l'influence du génotype sur la variabilité de la réponse à un traitement médicamenteux donné.

Exemple : soit une dose standard d'un médicament qu'on donne à 10 individus présentant la même pathologie.



I- La pharmaco- génétique

L'objectif de la pharmaco génétique



étudier les mécanismes d'origine génétiques intervenant dans la variabilité de réponse aux médicaments



Développement des tests simples permettant d'identifier à risque pour telles anomalies de réponses



Adapter des traitements thérapeutiques selon les nouveaux critères mesurés directement a partir du génome de l'individu (ADN ou ARNm)

NB : pharmacogénétique → l'étude des effets des médicaments sur le génome humain,
la pharmaco génomique → l'étude de l'influence du génotype sur la réponse aux médicaments.

Pendant les deux termes des deux disciplines sont utilisés indistinctement.

1- Variabilité de la réponse aux médicaments



une limitation importante pour l'utilisation d'un médicament donné.

(Par exemple en Europe, on estime à 10%, la proportion des malades hospitalisés à la suite d'un accident d'origine médicamenteuse).

Erreurs d'indications, de posologie ou d'utilisation **+**

La variabilité de la réponse a un médicament donné



Efficacité et toxicité du médicament.

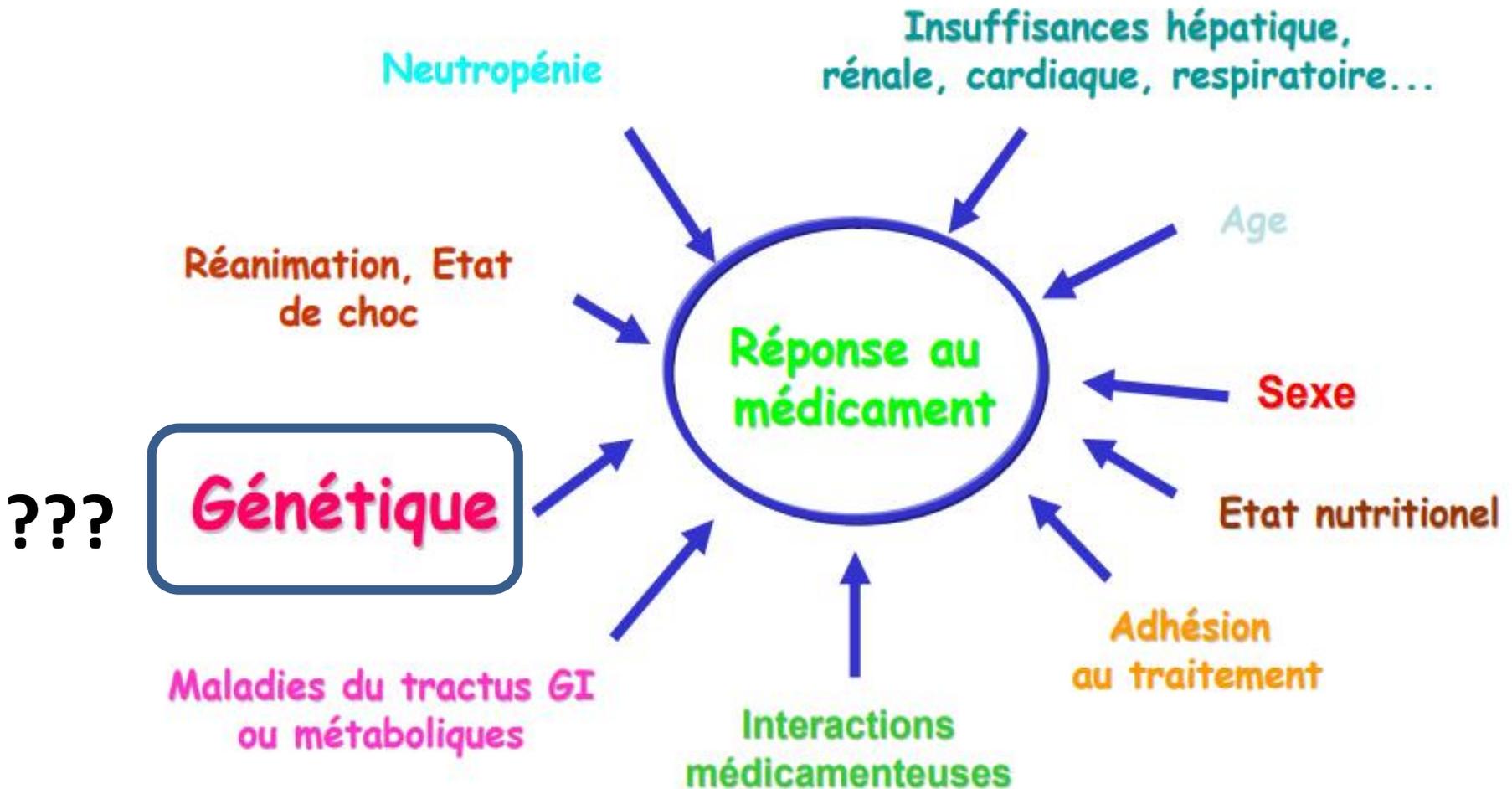


???????

- Pourquoi cette variabilité entre les individus ??????
- Quelles sont les causes ??????

Causes de la variabilité de la réponse aux médicaments

Etat physiologique ou pathologique du malade (avancement de la maladie), Etat pathologique associé (Insuffisance rénale, hépatique, age, femme enceinte...), Facteurs environnementaux (tabagisme, alimentation...), Facteurs génétiques (variations génétiques dans différentes étapes du métabolisme du médicament)



Influence de facteurs génétiques sur la variabilité de la réponse aux médicaments (influence génotypique)

➔ Il existe plusieurs types de polymorphismes génétiques touchant les gènes contribuant dans la réponse au médicament (selon chaque étape de la transformation du médicament dans l'organisme)

Exemples des polymorphismes

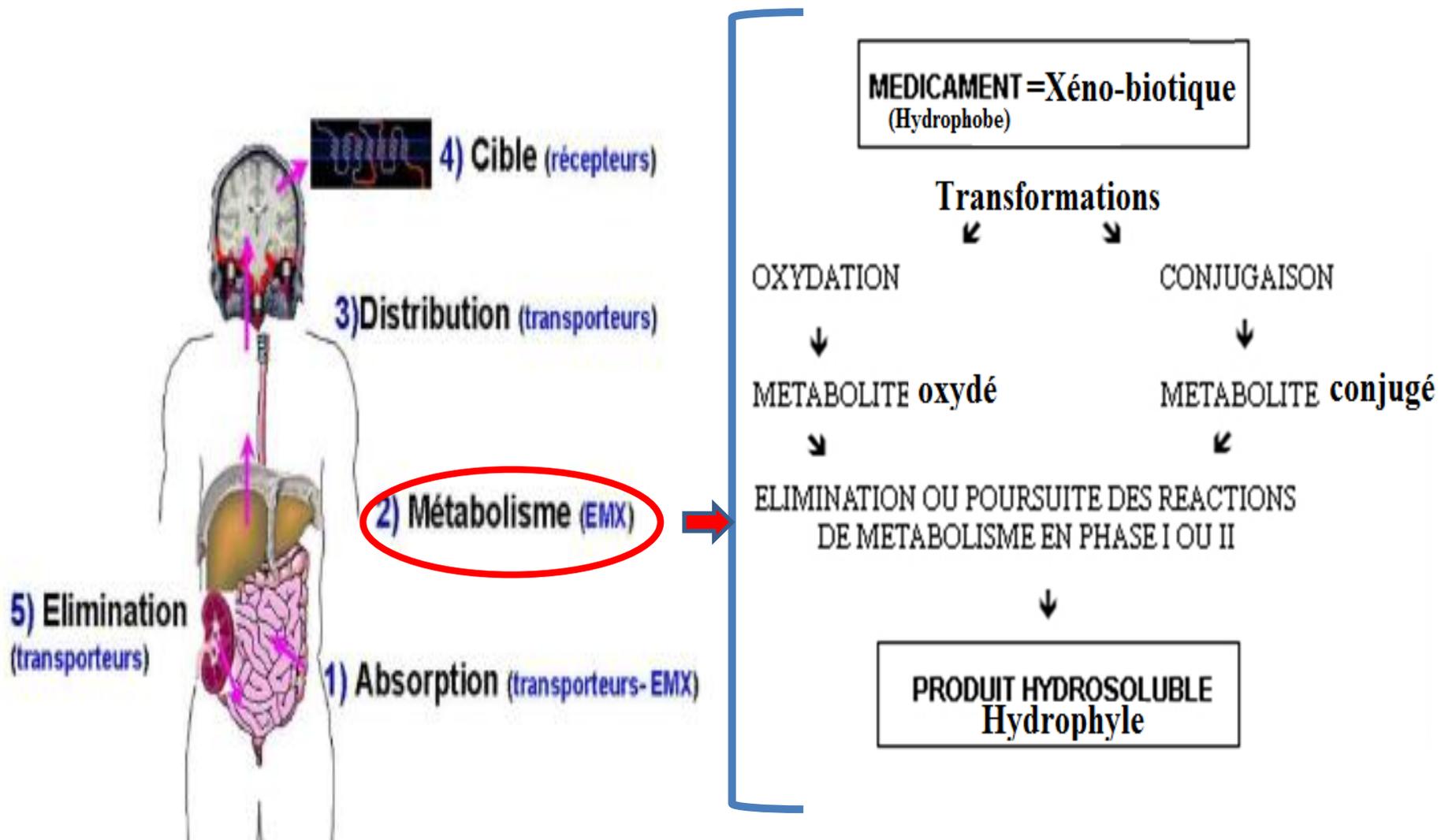
Le gène cytochrome P450 et le gène glucuronyl- transférase (étape du métabolisme du médicament)

les gènes codant pour les p-glycoprotéines (transport)

le gène de la vitamine K-époxyde réductase (récepteur du médicament)

Connaitre les différentes étapes du métabolisme du médicament et connaitre les gènes contribuant dans chacune de ces étapes avec leurs polymorphismes

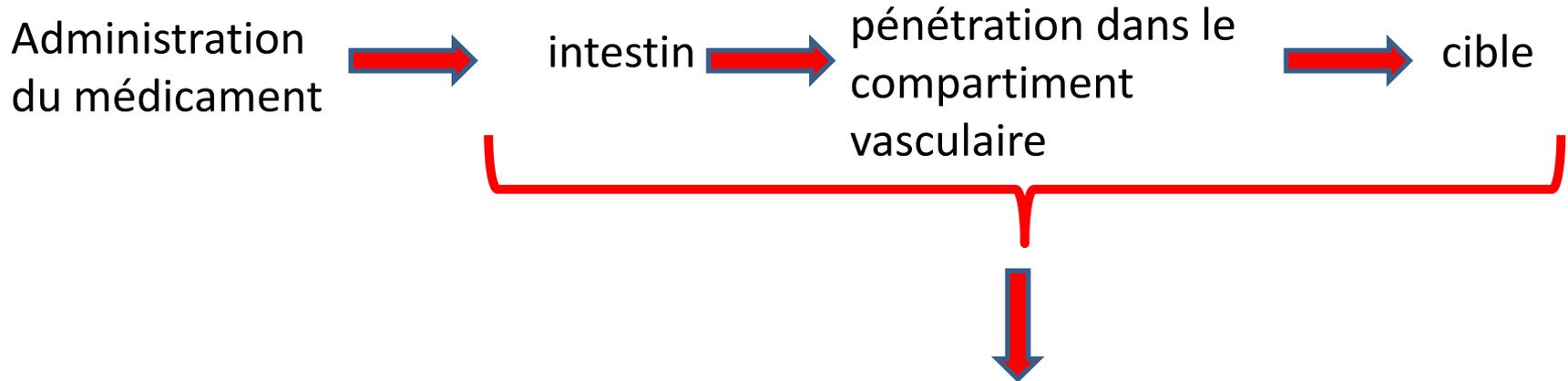
Métabolisme et transport du médicament



Métabolisme et transport du médicament

Etapes du métabolisme et transport du médicament

Au niveau intestinale (phase 0 du métabolisme)



Franchissement de la barrière intestinale au niveau de laquelle existent des transporteurs qui sont destinés à expulser ce médicament:

-exemple d'enzymes: La p- glycoprotéine (p-gp), produit par le gène MDRI ou ABCBI

Métabolisme et transport du médicament

Etapas du métabolisme et transport du médicament

Au niveau hépatique (trois phases du métabolisme)



Les enzymes de la phase I

rendent les molécules médicamenteuses plus polaires par hydroxylation ou dés alkylation (exemple : oxygénases, oxydoréductases, hydrolases....).
-en general il s'agit des enzymes de la superfamille des **cytochromes p450**.



Les enzymes de la phase II

Ce sont des enzymes de glucoroconjugaison (**UGT**). En General, il s'agit des transférases qui catalysent les réactions de conjugaison et rendent les métabolites encore plus hydrophiles et ceci par greffage d'un radical (acétyle $\text{CH}_3\text{-COOH}$, sulfate, glucuronate, méthyle...)



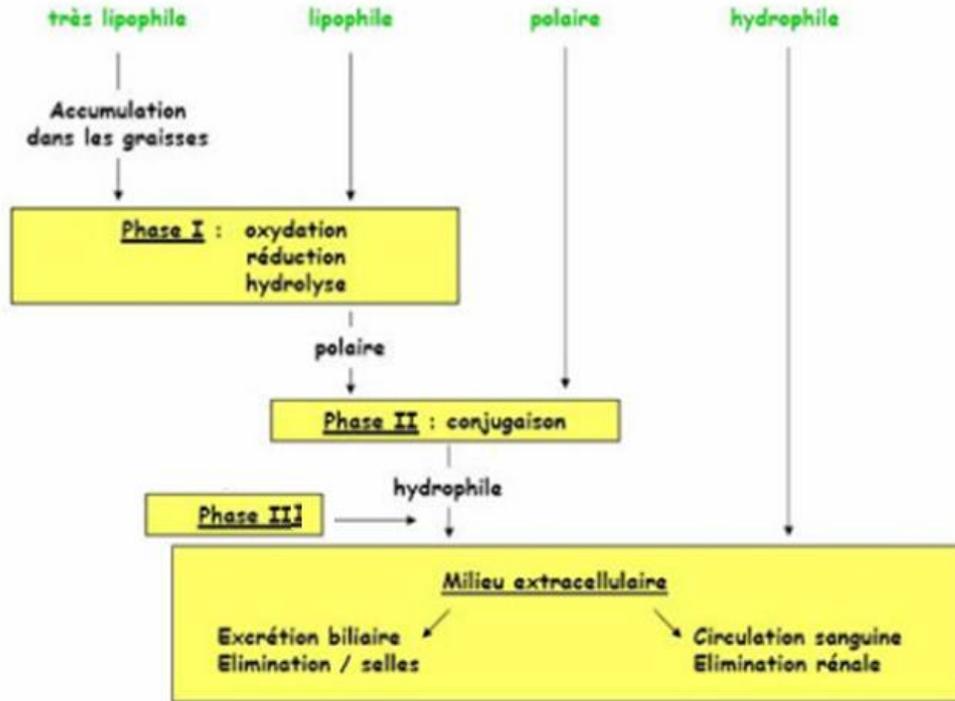
Les enzymes de la phase III

Pour être éliminé hors de la cellule, ces métabolites conjugués doivent être transportés à travers la membrane par ces types d'enzymes qui en général, appartiennent a la même famille que la p-gp. exemple : **les protéines ABC (ATP-Binding- Cassette) telles que : ABCC1 ou ABCC2 (appelés actuellement MRP1)**

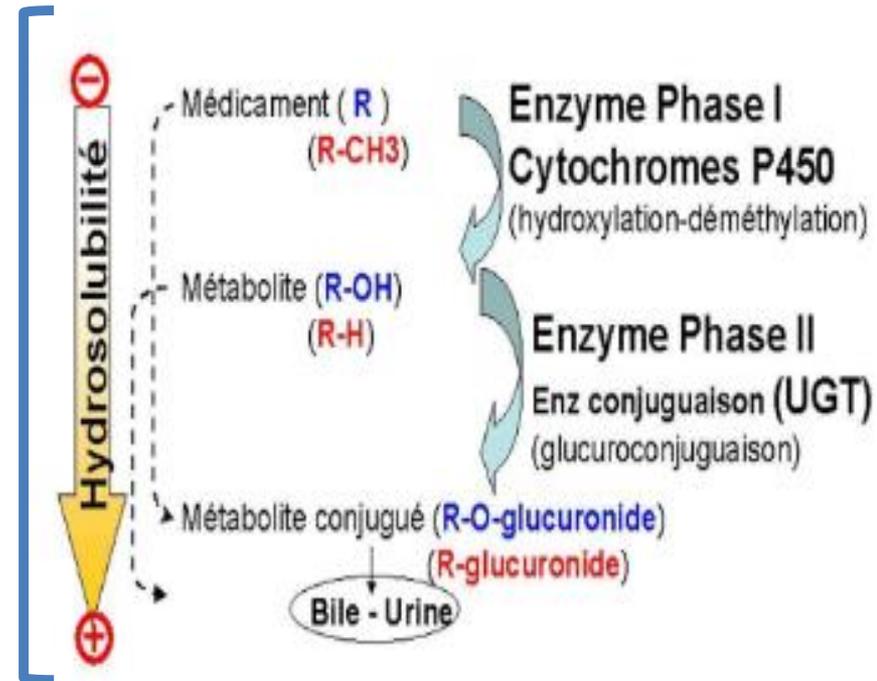
I- La pharmaco- génétique: 1- Variabilité de la réponse aux médicaments

Métabolisme et transport du médicament

Un xénobiotique :



Métabolisme des médicaments



Remarques : les différents enzymes du métabolisme des médicaments et leur transport partagent plusieurs propriétés telles que :

- Appartiennent à des superfamilles comprenant plusieurs iso formes (présentent des fortes homologues dans leurs séquences en AA)
- Leur expression, voir leur activité est très variable en fonction des facteurs physiologiques, pathologiques, environnementaux et génétiques (donc elles constituent un polymorphisme génétique)

2- Les phénotypes métaboliques

Le polymorphisme génétique des enzymes du métabolisme des médicaments



Trois différents types de phénotypes métaboliques dans la population générale



Trois types d'individus selon le type de phénotype pour le métabolisme d'u médicament donné (lent, rapide ou ultrarapide)

Types de métaboliseurs



Metaboliseurs limités ou lents

-déficit d'activité enzymatique, (le plus souvent ceux de la phase une ou 2 du métabolisme).

-Soit des individus homozygotes (mutés ou non fonctionnels dans les deux allèles en général récessif)

-Soit des individus hétérozygotes (un allèle non fonctionnel et dominant du gène)

--Exemple le cas du polymorphisme du gène de cytochrome P450 206 ou (CYP2D6)



Metaboliseurs extensifs ou rapides

l'activité enzymatique est normale

-avec ce phénotype, l'individu peut répondre à l'efficacité du médicament.



Metaboliseurs ultrarapides

-l'activité enzymatique est augmenté.

-Exemple le cas du polymorphisme du gène cytochrome p4502D6 ou (CYP2D6)

Déterminations du type de métaboliseur des individus



Déterminer la capacité métabolique d'un individu vis avis d'une enzyme donnée



Méthodes phénotypiques

-reposent sur une mesure directe de l'activité enzymatique des enzymes intervenant dans le métabolisme et le transport du médicament.



Méthodes génotypiques

-basées sur l'identification des anomalies génétiques qui sont à l'origine de la variabilité de l'expression et de l'activité de l'enzyme étudié.

Déterminations du type de métaboliseur des individus

Méthodes phénotypiques

Administration d'un substrat-test (médicament)



mesurer les quantités des substrats résiduelles et/ou de leurs métabolites dans un échantillon biologique urinaire ou sanguin (chromatographie)



Détermination du rapport entre la quantité de la substance retrouvée sous forme inchangée et celles de métabolites obtenus



Ce rapport reflète l'activité enzymatique et permet ainsi de classer les individus en métaboliseurs par comparaison des résultats de référence

NB: les résultats de référence sont déterminés par distribution au préalable de façon statistique sur une grande population d'individus.

Déterminations du type de métaboliseur des individus

Méthodes génotypiques



Méthodes de la biologie moléculaire qui se basent sur la PCR (réaction de polymérisation en chaîne).

- Le gène le plus suivi est le P450 206 ou (CYP2D6)
- Actuellement il existe plus de 70 variantes alléliques pour le gène 4502D6 dont une vingtaine est non fonctionnelle (effets de mutation).
- En plus des microlésions, on peut trouver le cas de microlésions comme la délétion complète du gène et donc une déficience de 100% de l'activité du gène CYP2D6.
- On peut aussi trouver des amplifications qui vont de 2 à 13 copies de ce gène, ce cas est associé à des phénomènes ultrarapides.

Remarque: En générale, en pharmacogénétique, le génotype est plus utilisé que le phénotype

3- Application de la pharmacogénétique en thérapeutique

Exemple 1: Cas de douleurs et de la codéine

Pour être efficace la codéine doit être transformée en morphine par la p4502D6



Les individus à activité enzymatique réduite ou nulle, ne ressentent aucune algésie (métaboliseurs lents)



Les individus métaboliseurs excessifs présentent des effets indésirables (dépendants de la codéine et avoir ainsi des overdoses)

Il est recommandé de déterminer le type de phénotype métaboliseur, avant de prescrire la codéine comme traitement

Exemple 2 : cas des dépressions avec les antidépresseurs et cas des psychotiques avec les antipsychotiques

Les antidépresseurs et les antipsychotiques sont métabolisés par le p4502D6



Plus l'individu est lent dans le métabolisme de ces médicaments plus la proportion de manifester leur effets secondaires sera forte et aboutit a un état indésirable comme le cas de diabète (le cas peut être un cas transitoire et /ou définitive)



Il est recommandé de déterminer le type de phénotype métaboliseur , avant de prescrire ce type de medeicaments comme traitement

Exemple 3 : cas de coagulation du sang et les anticoagulants oraux (AVK)

Chez les individus traités avec les AVK

un risque hémorragique majeur

une résistance nécessitant des posologies en AVK très élevés.

Les conséquences sont dépendantes du polymorphisme du gène récepteur CY2C9 ou (P4502C9), responsable de l'élimination des AVK ou leur dérivés (en particuliers les dérivés coumariques).

chez une population caucasiennes le gène CY2C9 présente deux allèles: (CY2C9^{*2} et CY2C9^{*3}), -chacun d'eux est responsable de la réduction de l'activité de l'enzyme produit

Risque hémorragique chez les patients traités par les AVK

avant de prescrire les AVK, il faudrait enquêter sur le gène CYP2C9 afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique et avoir une meilleur prédiction en évitant le risque hémorragique.

II- Production des protéines a intérêt pharmaceutique

1-protéine recombinante/hétérologue



Protéine non synthétisée naturellement par l'organisme qui la produit

(exemples les vaccins, les anticorps thérapeutiques, les interférons, les facteurs sanguins, les facteurs de croissance hématopoïétiques, les hormones de croissance, les interleukines.....)

NB: -L'organisme lui-même est recombinant, il est obtenu par les voies de la biologie moléculaire et de génie génétique.

-doit être le plus proche possible de la protéine naturelle dans tous les cotés (structurale, physiologique, catalytique et immunologique)



Multiples objectifs dans la synthèse de la protéine recombinante

- La synthèse biologique est plus simple et moins couteuse que la synthèse chimique
- La purification des protéines taguées (marquées) est beaucoup plus simple que la purification des protéines naturelles qui sont extraites à partir d'un liquide biologique
- Le risque de contamination par un agent pathogène est très limité (par exemple le cas de la synthèse des hormones de croissance)

Protéines recombinantes (Médicaments) et pathologie

s'adressent à deux types de pathologies



Déficits hormonaux ou enzymatiques

Dans ce cas les doses utilisées se rapprochent le plus possible des doses physiologiques, (car leur emploi est parfaitement spécifique)



Les pathologies de cancer, maladies cardiovasculaires ou maladies infectieuses

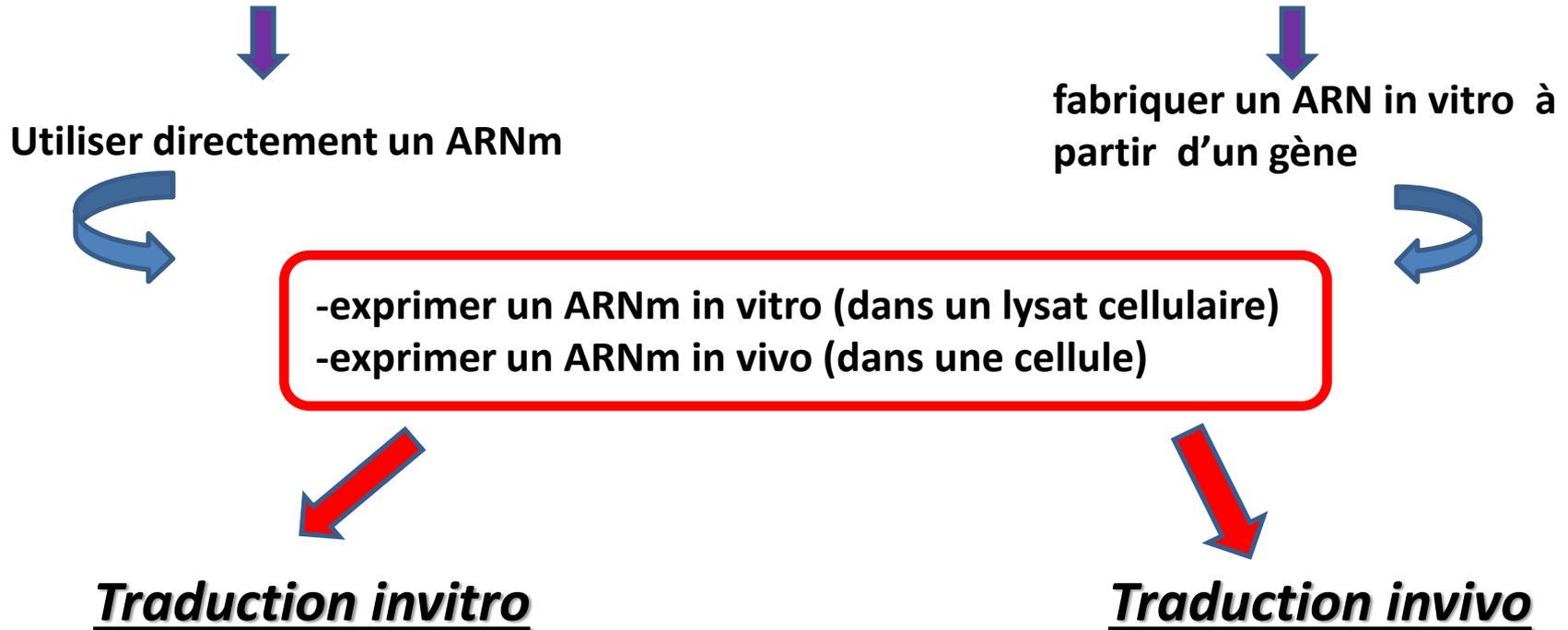
le traitement sera assuré par des molécules à dose relativement élevées.

Remarque:

Beaucoup de médicaments comme les immuno-modulateurs (interferons, interleukines), ont une activité multiple et leurs indications sont de ce fait nombreuses mais d'usage souvent difficile.

2- Méthodes de production des protéines recombinantes

Grace aux méthodes de biologie moléculaire, il est actuellement possible d'exprimer ou de traduire un acide nucléique de différents façons

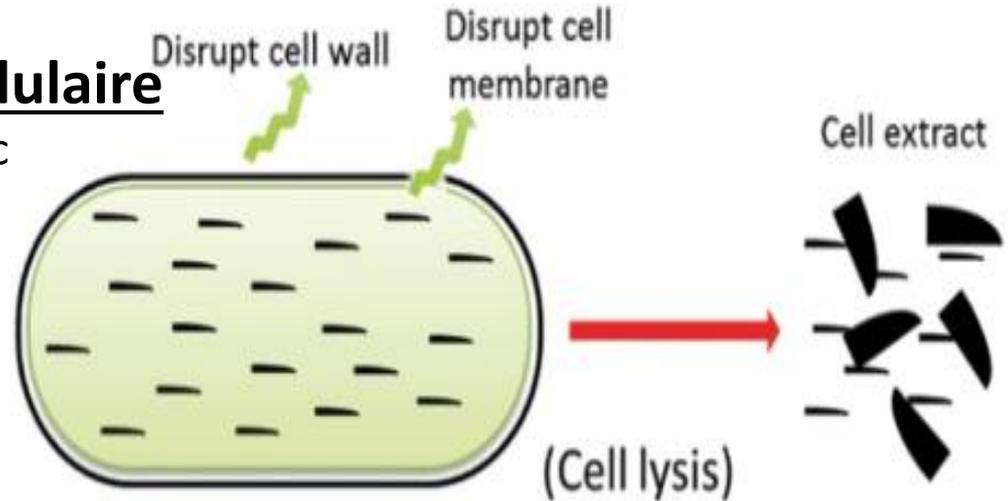


A: Traduction in vitro

A-1-Etapes du Protocole générale

Etape1: préparation du lysat cellulaire

- le plus souvent à lyser les cellules par choc osmotique
- retirer les choses dont on a besoin par centrifugation
- rajouter les outils pour la traduction ou l'expression attendue.



Remarque

- Des extraits de nombreuses cellules peuvent être utilisés
- Présence de tous les éléments de la machinerie nécessaire pour la traduction, (Ribosome, ARNt, AA, aminoacyl-t ARNA synthétase, facteurs d'initiation, facteurs d'élongation, facteurs de terminaison)
- Absence de tous les inhibiteurs de traduction (noyau, les polysomes et autres inhibiteurs)
- l'extrait doit contenir peu d'activité RNAsique

A: Traduction in vitro

A-1-Etapes du Protocole générale

Etape1: préparation du lysat cellulaire

Les différents lysats utilisés

Exemple de lysat utilisé

Système Eucaryote	Système Procaryote
Lysat de reticulocyte (très utilisé et très disponible)	<i>Lysat de E.coli S30</i> (très commercialisé, l'avantage c'est que on peut coupler la transcription a la traduction)
Extrait de germe de blé (très utilisé et très disponible)	
Lysat des ascites (cellules a partir de la peau abdominale de souris)	
Lysat de levure	

A: Traduction in vitro

A-1-Etapes du Protocole générale

Etape 2 : Traduction

- En général, la traduction in vitro est réalisée pendant environ 30mn à température ambiante dans un système non continu (Actuellement des systèmes en flux continu ont été développés)
- Les composants de la traduction sont maintenus dans un boudin de dialyse dans lequel, on injecte **les AA marqués.**
- Les protéines synthétisées sortent du boudin de dialyse (les composants de la traduction formant des complexes ARN-Proteines sont trop gros pour franchir la membrane de dialyse),
- de tels systèmes peuvent fonctionner jusqu'à 45h.

A: Traduction in vitro

A-1-Etapes du Protocole générale

Etape 2 : Traduction

Marquage des acides aminés



Marquage radioactif

- Le plus général, on utilise un AA radioactif en sa méthionine par l'isotope (35S).
- en l'absence de ce dernier on peut utiliser le (35S) Cystéine, (14S) leucine ou le (3H) Leucine.

Marquage froid



Utilisation d'un fluorophore,

- la lysine sera marqué par un fluor éphore
- sa révélation se fait par fluorescence.

Utilisation de la Lysinyl-tRNA,

- lysine marqué a la position epsilon par de la biotine.
- La révélation est réalisée par d la Streptavadine conjugué a une enzyme (peroxydase ou la phosphatase alcaline)

A: Traduction in vitro

A-2-Evaluation de la méthode: (Traduction in-vitro)



Avantages

- Permet l'expression des protéines très toxiques pour la cellule
- Permet l'obtention d'une protéine marquée (pas besoin de faire une purification)
- Permet de vérifier si un ARNm X est bien présent dans un lysat
- Permet d'incorporer des AA modifiés



Inconvénients

- Les protéines exprimées ne sont généralement pas actives.
- Les cas minimes d'obtention de protéines actives sont ceux où les protéines sont exprimées dans le cytosol.
- L'expression au niveau des autres organites comme le réticulum endoplasmique, appareil de Golgi par exemples donne des protéines non actives.

B: Traduction in vivo

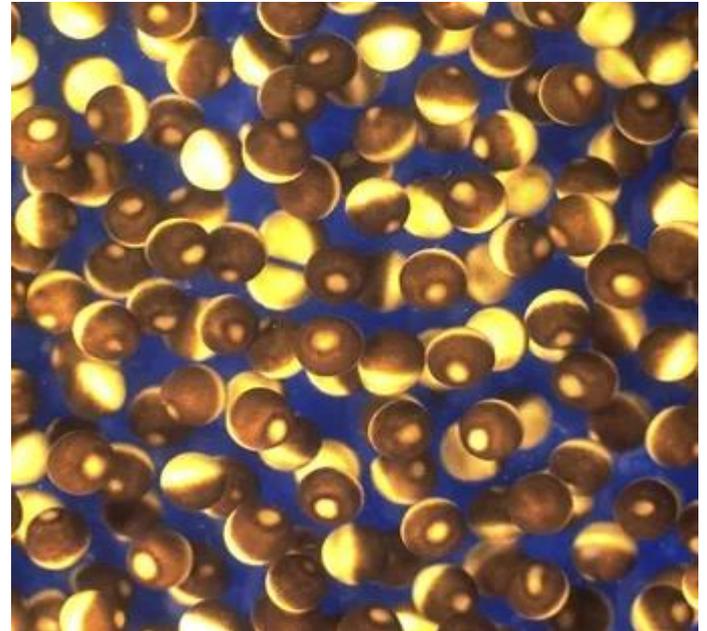
(eucaryotes, procaryotes)

B-1-Traduction dans l'ovocyte du Xénope

Généralités sur le xénope



- Le xénope est un batracien aquatique vivant en Afrique du Sud et qui se maintient aisément en aquarium.
- Il est très robuste



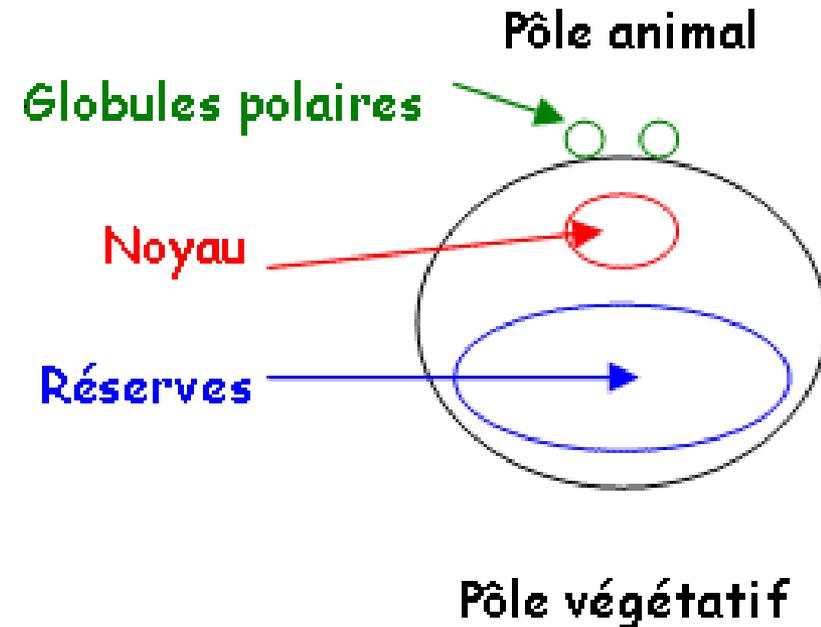
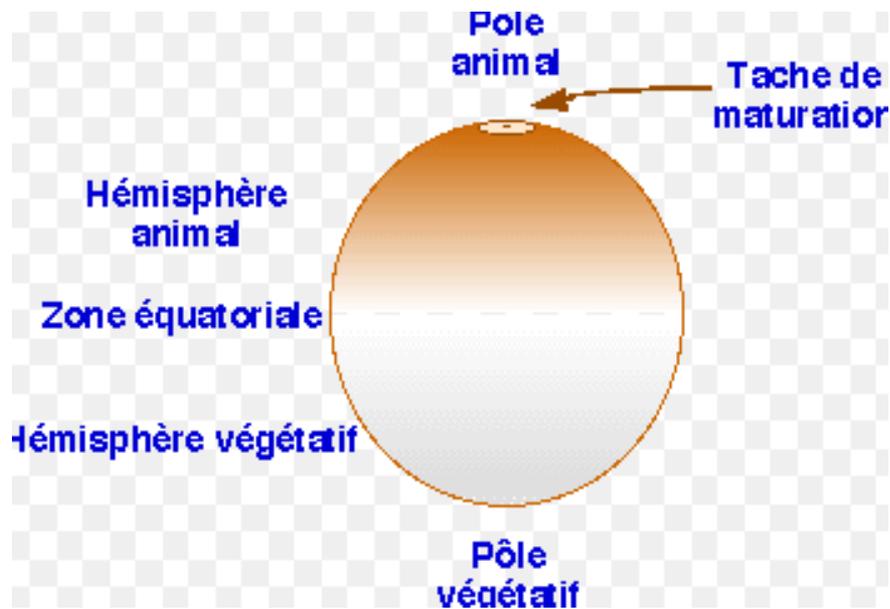
- Il est capable de pondre plusieurs centaines d'œufs

-

B: Traduction in vivo

B-1-Traduction dans l'ovocyte du Xénope

L'ovocyte du xénope



- Les ovocytes du xénope sont des grosses cellules
- facilités de l'injection la solution d'ARNm dans la cellule

B: Traduction in vivo

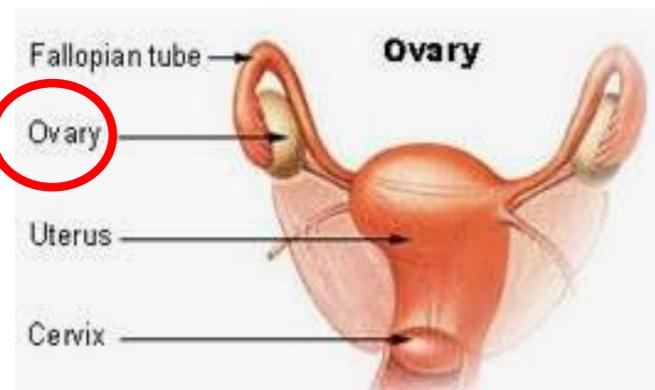
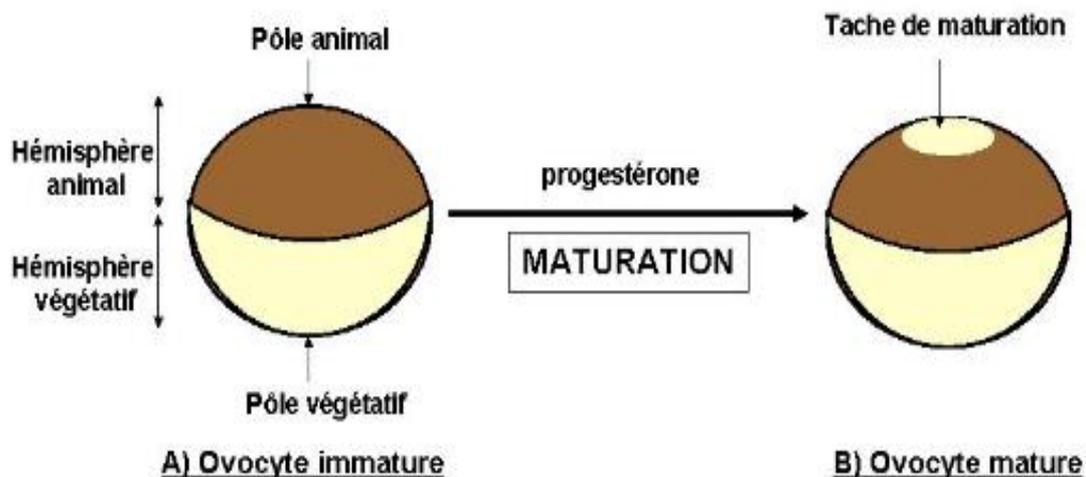
B-1-Traduction dans l'ovocyte du Xénope

Protocole générale

1- synchronisation de la maturation des ovocytes
(Traitement hormone de la femelle du xénope)

Après deux mois

2- prélèvement des ovaires (anesthésie à la glace)



B: Traduction in vivo

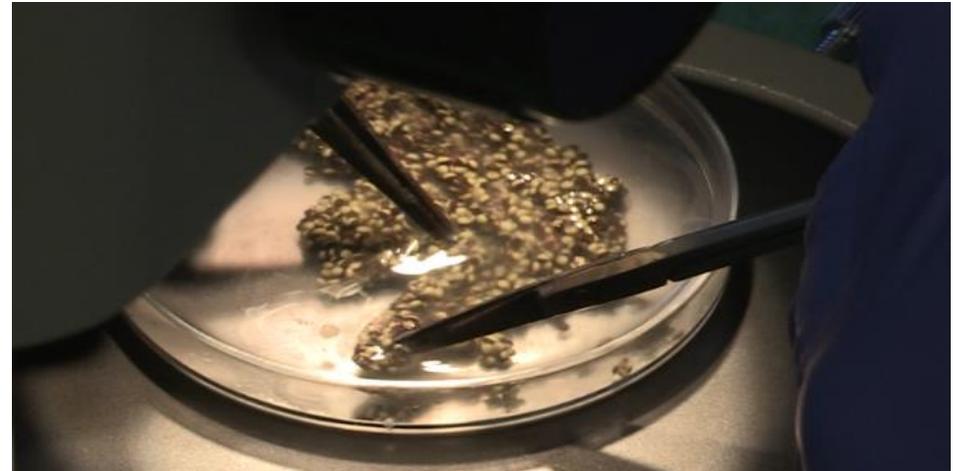
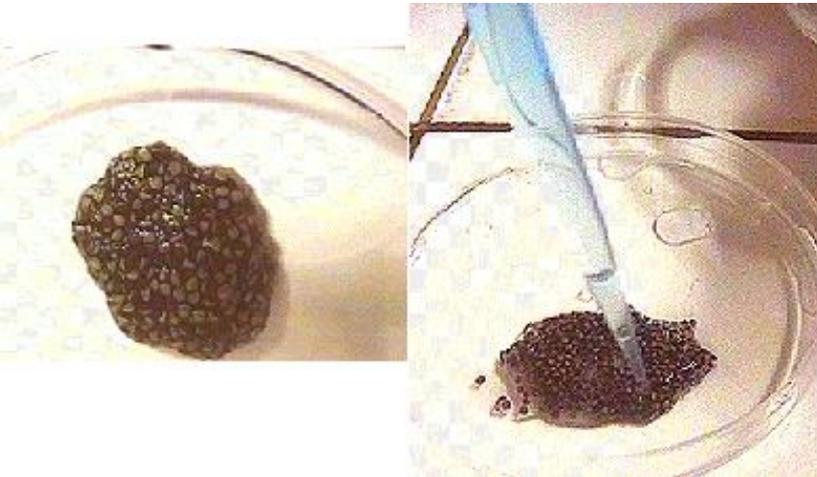
B-1-Traduction dans l'ovocyte du Xénope

Protocole générale

3- Traitement des fragments d'ovaires par la collagénase



4- Retirement des cellules folliculaires et obtention des ovocytes qui font quelques millimètres de diamètre.



B: Traduction in vivo

B-1-Traduction dans l'ovocyte du Xénope

Protocole générale

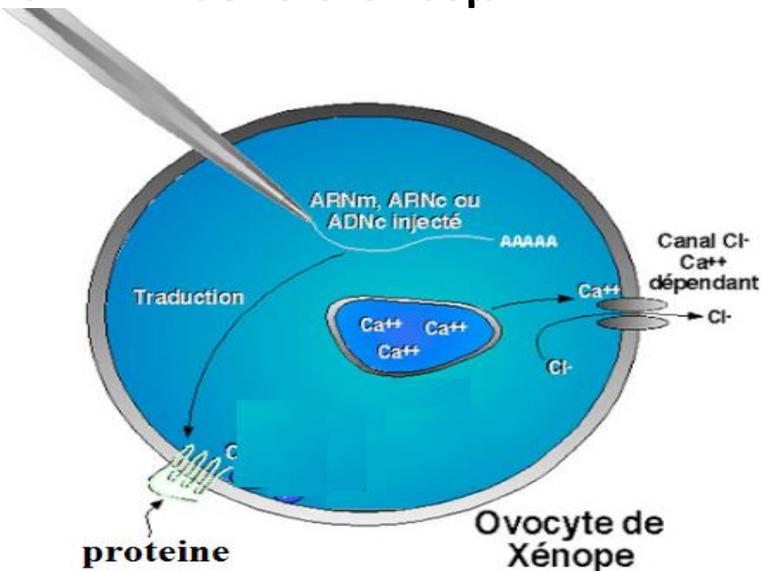
6- injection dans le cytoplasme de la cellule d'une solution d'ARNm de l'ordre 100µl.



7-incubation dans un tampon contenant au besoin au moins un AA marqué



8- La protéine attendue est synthétisée.



milieu de culture (au moins un AA est marqué)

Après deux jours

NB: -l'ovocyte du xenope ne secrète pas les protéines (xenope représente un système très utile pour étudier les protéines secrétées)

-L'inconvénient dans ce système c'est l'obtention d'une petite quantité de protéines.

B: Traduction in vivo

B-2-Traduction dans *Escherichia coli*

Le gène codant la protéine considérée doit être inséré dans un vecteur qui sera lui même introduit dans la cellule hôte.

Présence de tous les outils d'un clonage moléculaire

Le gène codant pour la protéine (insert)

Des enzymes de restriction et des ligases (pour couper et insérer)

La cellule hôte (bactérie)

Un vecteur (un vecteur d'expression dans ce cas)

3- Production des protéines recombinantes dans une bactérie

Les propriétés d'un vecteur d'expression procaryote

- une origine de réplication
- Un promoteur fort et contrôlable (inductible), dont l'induction pourra produire une grande quantité d'ARNm à partir du gène cloné
- séquences responsables de la transcription (initiation et terminaison) et de la traduction (initiation et terminaison), une séquence de liaison au ribosome (RBS), ces séquences doivent être bien positionnées.
- un marqueur de sélection (résistance a un antibiotique)
- un polylinker

3- Production des protéines recombinantes dans une bactérie

3-1-Construction d'un vecteur d'expression

procarlyote

Le principe est d'insérer le gène complet codant de la protéine désirée sur un vecteur d'expression qui doit contenir toutes les propriétés cités.

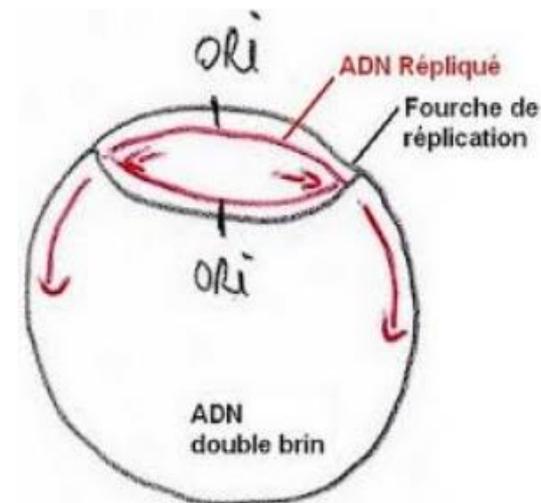
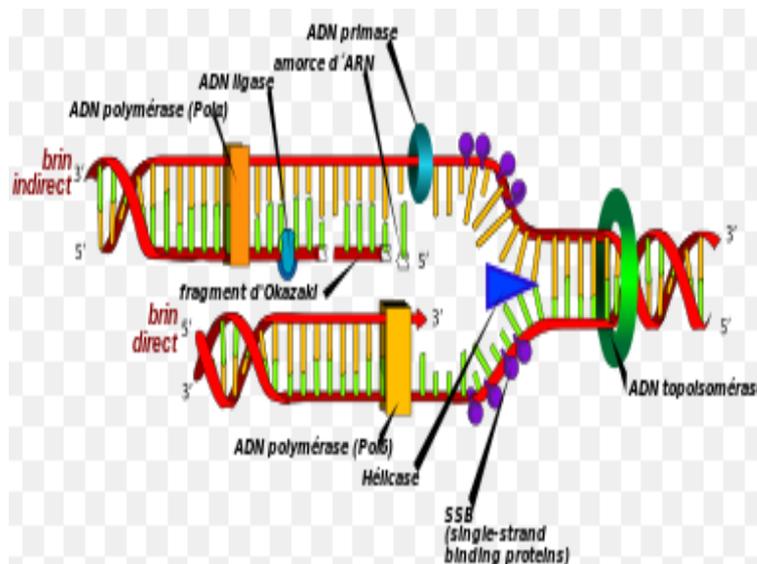
-Chacune de ces propriétés peut être réalisable selon sa disponibilité au marché et la possibilité de sa création par les techniques de biologie moléculaire.

-- L'essentiel est que le gène est inséré en aval d'un promoteur fort et contrôlable.

A- Origine de réplication

-plusieurs types d'origine de réplication (Ori), sont disponibles actuellement au niveau industriel.

- ce sont des séquences retrouvés sur les chromosomes en plusieurs exemplaires, chaque copie pourra donner une séquence de la protéine désirée.



Construction d'un vecteur d'expression procaryote

A- origine de réplication

Quelques exemples d'origine de réplication

Origine de réplication	Nombre de copies par chromosome
Blue script	500 jusqu'à 700
PBR322	15-20
p15A	10-12
M15	10-15
coIE1	12-20

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

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

Remarques

- Si le gène est non toxique, la traduction sera simultanée a la transcription et a la croissance bactérienne (la fourche de la réplication aura le même sens que la transcription)
- Si le gène est toxique, l'expression de la protéine désirée commencera en phase stationnaire. (la fourche de réplication doit progresser en sens inverse de la transcription)
- L'origine la plus utilisée est : **CoIE1, ou M15**, ou on peut les utiliser tout les deux pour produire deux types de protéines simultanément dans la même bactérie.

Construction d'un vecteur d'expression procaryote

B-Le promoteur

Critères et Domaines importants dans le promoteur d'expression

Critères importants

- doit avoir une grande force dans sa transcription
- Inductible
- facilement contrôlable ((l'induire et le stopper facilement)

Domaines importants

deux séquences qui se trouvent en amont du site d'initiation de la transcription :

- Domaine à -10 (pribnow box, 5'-TA-TA-A-3')
 - Domaine à -35 (5'-T-T-GA-C-A-3')
- (se trouvent en contact avec l'ADN polymérase lors de l'initiation de la transcription).

Remarques :

- les bactéries possèdent des promoteurs faibles et donc on doit les améliorer pour les rendre fort, pa plusieurs manières.
- Si le gène est toxique, le promoteur inductible est le meilleur à être utilisé. Il permet d'inhiber la production au début de la phase de croissance de la bactérie puis à l'approche de la phase stationnaire, on induira le promoteur pour commencer la production

Construction d'un vecteur d'expression procaryote

B-Le promoteur

Augmentation de la force du promoteur



Par mutations du promoteur

-Effectuer des modifications ou changements au niveau des séquences du promoteur



Par utilisation de l'ARN polymérase T7

-très efficace dans la transcription et dans la traduction de la protéine désirée et elle est 5 fois plus rapide ue les polymérases bactériennes.

Construction d'un vecteur d'expression procaryote

B-Le promoteur

**Augmentation de la force du promoteur
par mutations du promoteur**



Exemple1 : le promoteur Plac

Actuellement le promoteur LacZ (dégradation du lactose) est muté afin que la répression catabolique ne puisse pas s'exercer.

Avec ce résultat, on peut avoir l'enzyme qui dégrade le lactose même en présence du glucose.



Exemple 2 : le promoteur PTLac

promoteur hybride entre le promoteur Tryptophane et le promoteur Lac (remplacement des séquences du promoteur Lac Z en amont de -20, par des séquences du promoteur de l'opéron Tryptophane.

Cette construction donne une augmentation de la transcription 10 plus que le promoteur normale.

Construction d'un vecteur d'expression procaryote

B-Le promoteur

Augmentation de la force du promoteur par utilisation de l'ARN polymérase T7

- La polymérase T7 est obtenue a partir du phage T7
- possède plusieurs qualités permettant d'augmenter la force du promoteur et réussir la traduction telles que :
 - utilise la plus part des nucléotides de la bactérie ce qui inhibe la transcription des gènes spécifiques de la bactérie
 - spécifique au promoteur inséré (donc elle ne connaît pas les promoteurs de la bactérie)
 - non sensible aux inhibiteurs des ARN polymérases bactériennes (telle que la rifampicine)
 - reste la plupart du temps liée a l'ADN (la transcription et la traduction persiste pendant beaucoup de temps)

Construction d'un vecteur d'expression procaryote

B-Le promoteur

Augmentation de la force du promoteur

installation de l'ARN polymérase T7 dans la cellule

(n'est pas ajouté directement a la cellule hôte)



Utilisation d'un autre vecteur



insertion du gène virale dans un autre vecteur, sera introduit dans la cellule hôte



Infection de la cellule par le virus



avant la production de la protéine désirée, la bactérie devrait être infectée par le phage (le virus), pour produire la polymérase T7

Construction d'un vecteur d'expression procaryote

B-Le promoteur

Inductibilité du promoteur

(utiliser des dé- répresseurs ou bien détruire carrément le répresseur)

1-Utilisation d'u dé répresseur

Exemple 1 : Dé répression par utilisation d'un analogue de substrat inducteur

-l'Isopropyl- β -Thiogalagtoside (IPTG) est un analogue du lactose, on peut l'utiliser comme un inducteur du promoteur Lac du gène LacZ, pour produire l'enzyme (β galactosidase) qui dégrade le lactose même en absence du lactose.

Exemple 2 : Dé répression par désactivation thermique du répresseur

-la protéine LacI,(répresseur du gène LacZ) est active à 30°C, mais elle est désactivée entre 37 et 42°C, (produire de β galactosidase à ces températures)

Construction d'un vecteur d'expression procaryote

B-Le promoteur

Inductibilité du promoteur

Dégradation du répresseur

(se fait en général)

-soit en introduisant une protéase dans la cellule

soit en induisant sa production par induction de son gène spécifique (lésion d'ADN)

-le plus souvent on préfère travailler avec la RecA protéase (produite lors d'une correction de lésion d'ADN par le système SOS). Le travail est réalisé par différentes étapes:

- 1-produire des lésions d'ADN en ajoutant au milieu de culture de nalidixique qui inhibe la DNA gyrase et mène à des lésions très importantes ce qui conduit au déclenchement du système SOS induisant la synthèse de la RecA protéase.
- 2- la RecA protéase va s'attaquer au répresseur et va l'inhiber ou carrément le dégrader
- 3- le gène d'intérêt peut être exprimé.

Construction d'un vecteur d'expression procaryote

C- Contrôle de l'initiation et de la terminaison dans la synthèse d'une protéine.

(on se base sur les événements naturels de la cellule hôte (comme la bactérie))

C-1- Le contrôle de de la transcription

L'initiation

est dépendante de la capacité et de la force du promoteur ainsi que de la séquence de l'origine de réplication sélectionné pour la synthèse d'une protéine donné.

Terminaison

????????

Exploitation des
mécanismes
d'une bactérie
normale

Exploitation des
mécanismes
d'une bactérie
lysogène

Construction d'un vecteur d'expression procaryote

C- Contrôle de l'initiation et de la terminaison dans la synthèse d'une protéine.

C-1- Le contrôle de de la transcription

Contrôle de terminaison par exploitation des mécanismes d'une bactérie normale

Invivo

chez E.coli, existe 2 types de terminaisons



Invitro

La transcription du gène d'intérêt est arrêté des 2 façons, soit :

- Soit, ajouter a son extrémité 3' une séquence riche en Cet G et une séquence riche en T
- Soit ajouter a l'extrémité 3' du gène d'intérêt une séquence de reconnaissance pour la protéine Q qui va arrêter la transcription

Terminaison intrinsèque

après la transcription du fragment d'intérêt, l'ARN polymérase synthétise une séquence très riche en G et en C (boucle), puis une série de résidu U (U-U-U...) et après cette série, l'ARN polymérase s'arrête.

Terminaison Q dépendante

Il existe une protéine appelé la protéine Q, qui connait une séquence spécifique sur l'ARNm neosynthétisé, elle se fixe dessus, ce qui va desactiver la polymérase et la transcription s'arrête

Construction d'un vecteur d'expression procaryote

C- Contrôle de l'initiation et de la terminaison dans la synthèse d'une protéine.

C-1- Le contrôle de de la transcription

Contrôle de terminaison par exploitation des mécanismes d'une bactérie lysogène

Invivo

Chez le virus λ , il existe une protéine appelée la protéine N qui a une fonction d'anti terminaison de transcription en évitant l'arrêt de l'ARN polymérase
-c'est seulement sur un site d'ADN appelé site Nut que la protéine N ne peut pas travailler et ainsi l'ARN polymérase s'arrête de travailler et la transcription s'arrête.

Invitro

des bactéries lysogènes produisant la protéine N sont utilisées dans la synthèse pour éviter toute terminaison précoce de la transcription
- on ajoutera une séquence Nut (terminateur), à la fin du gène d'interet (extrémité 3') cloné pour arrêter la transcription au bon endroit.

Construction d'un vecteur d'expression procaryote

C- Contrôle de l'initiation et de la terminaison dans la synthèse d'une protéine.

C2- Le contrôle de la traduction

Initiation

Invivo :

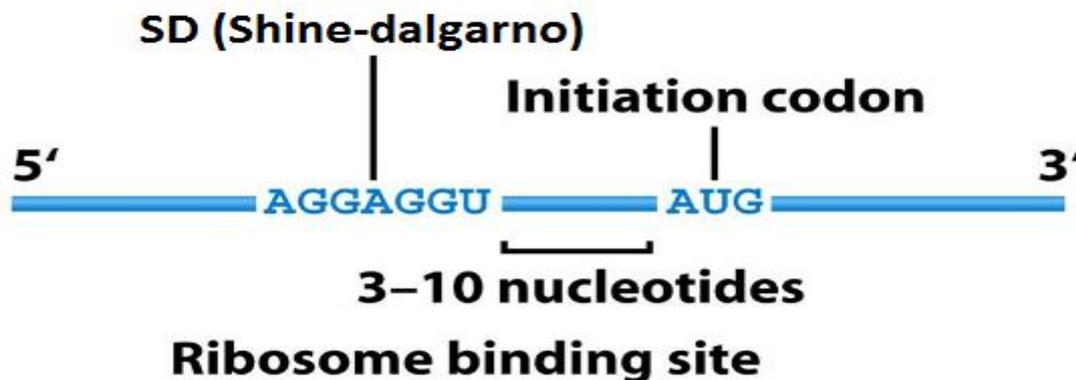


Invitro :

-contrôler la présence ou incorporer la séquence RBS contenant le codon d'initiation (ATG) en amont du gène d'intérêt qui sera cloné

chez les procaryotes, l'initiation de la traduction s'effectue par sur l'ARNm, de la, séquence ou région RBS (Ribosome- Binding- Site).

La région RBS est composée d'une séquence riche en purines (en général composée de 6 bases : AGGAGG), appelée séquence SD (Shine-dalgarno) et du codon d'initiation (ATG).



Construction d'un vecteur d'expression procaryote

C- Contrôle de l'initiation et de la terminaison dans la synthèse d'une protéine.

C2- Le contrôle de la traduction

Terminaison

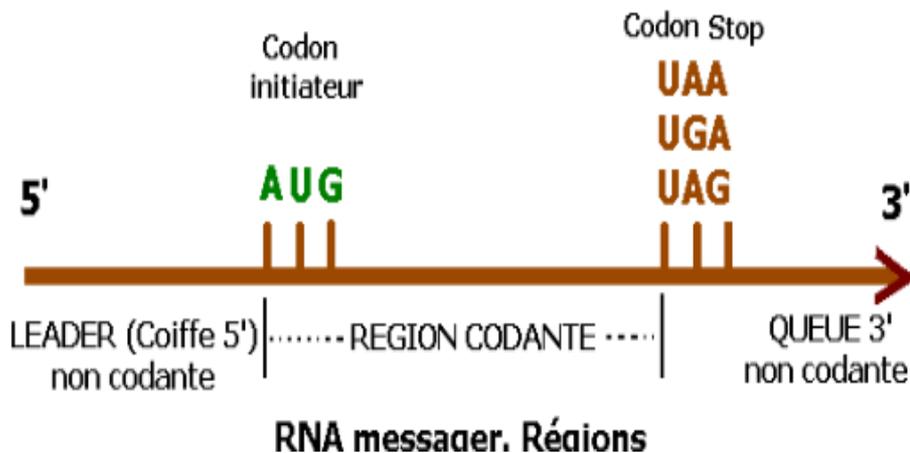
Invivo :

la présence du codon stop est indispensable pour assurer la terminaison de la traduction (UAA, UAG, UGA)

Invitro :

le plus souvent on met plusieurs codons stop à la fin de la séquence codante pour éviter les dérapages et les protéines les plus longues.

Chez *E.coli*, la séquence la plus utilisée est : UAAU,



NB:

la dernière base joue un rôle important dans la terminaison, (par exemple si on utilise la séquence UGAG, la terminaison de la traduction est réduite à 7%).

3-2- Choix de localisation de la protéine exprimée

A- Obtention des protéines dans le cytoplasme

A1- Cas des protéines insolubles (corps d'inclusion)

Ces formations sont favorisées par la précipitation de la protéine exprimée, cette précipitation est obtenue soit :

- par la quasi-absence des protéines chaperonnes
- par modification post- traductionnels
- par un environnement réducteur du cytoplasme

Protocole générale d'extraction:

-lyse bactérienne, - centrifugation à basse vitesse (500-1000tr/mn), - une purification (surnagent) par une dialyse ou une filtration, - renaturation de la protéine obtenue



Avantages

- pas de protéolyse de la protéine exprimée
- pas de toxicité vis-à-vis de la cellule productrice.
- Purification très simple et non couteuse.
- Des grandes quantités sont accumulées par cette production



Inconvénients

- La protéine obtenue est inactive
- sa renaturation invitro est accompagné d'une baisse de rendement

3-2- Choix de localisation de la protéine exprimée

A- Obtention des protéines dans le cytoplasme

A2- Cas des protéines solubles

- Dans ce cas, il est indispensable d'utiliser des vecteurs comportant des promoteurs thermo- régulés (exemple le cas du promoteur CSPA)
- plusieurs phases thermiques sont respectées au cour de la culture et la production bactérienne de ce type de protéines par exemple :
 - La phase d'expansion de la bactérie est réalisée à 37°C
 - La phase d'induction de la production est réalisée entre 15-25°C

Remarque :

- la solubilisation des protéines est favorisée par la présence importante des protéines chaperonnes, ainsi il faut penser à une sur- expression des protéines chaperonnes en ajoutant sur le gène d'intérêt un autre promoteur spécifique (exemple un promoteur appartenant a la famille GroE).

3-2- Choix de localisation de la protéine exprimée

B- Obtention des protéines dans le périplasme

- Dans ce cas, il faut ajouter une séquence signal procaryote (pho A, Omp A) dans l'extrémité 5' du gène de la protéine exprimée.

Avantages

- L'avantage principal est que dans le périplasme, l'environnement est oxydant, ce qui favorise la formation des ponts disulfure

Inconvénients

- rendements faibles
- les mécanismes de translocations réalisés dans cet endroit sont mal connus.

Remarque:

Ces protéines représentent 4% des protéines bactériennes.

Fin du chapitre 3

Merci

S.Dekkiche