

Les systèmes d'expression

Les systèmes d'expression

- Le choix de la cellule hôte dont la machinerie de synthèse protéique produira la précieuse protéine initiera les grandes lignes de l'ensemble du processus.
- Il définit la technologie nécessaire pour le projet, qu'il s'agisse d'une variété d'outils moléculaires, d'équipements ou de réactifs d'intérêt.

Les systèmes d'expression

- Différents systèmes eucaryotes et procaryotes sont utilisés pour la production des protéines d'intérêt thérapeutiques et biotechnologiques (bactéries, levures, champignons, plantes, cellules d'insectes, cellules de mammifères, animaux transgéniques, etc...)
- Le choix d'un système adéquat dépend de la nature, de l'origine et de l'utilisation de la protéine désirée, ainsi de sa quantité et de son cout de fabrication.

Les systèmes d'expression

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

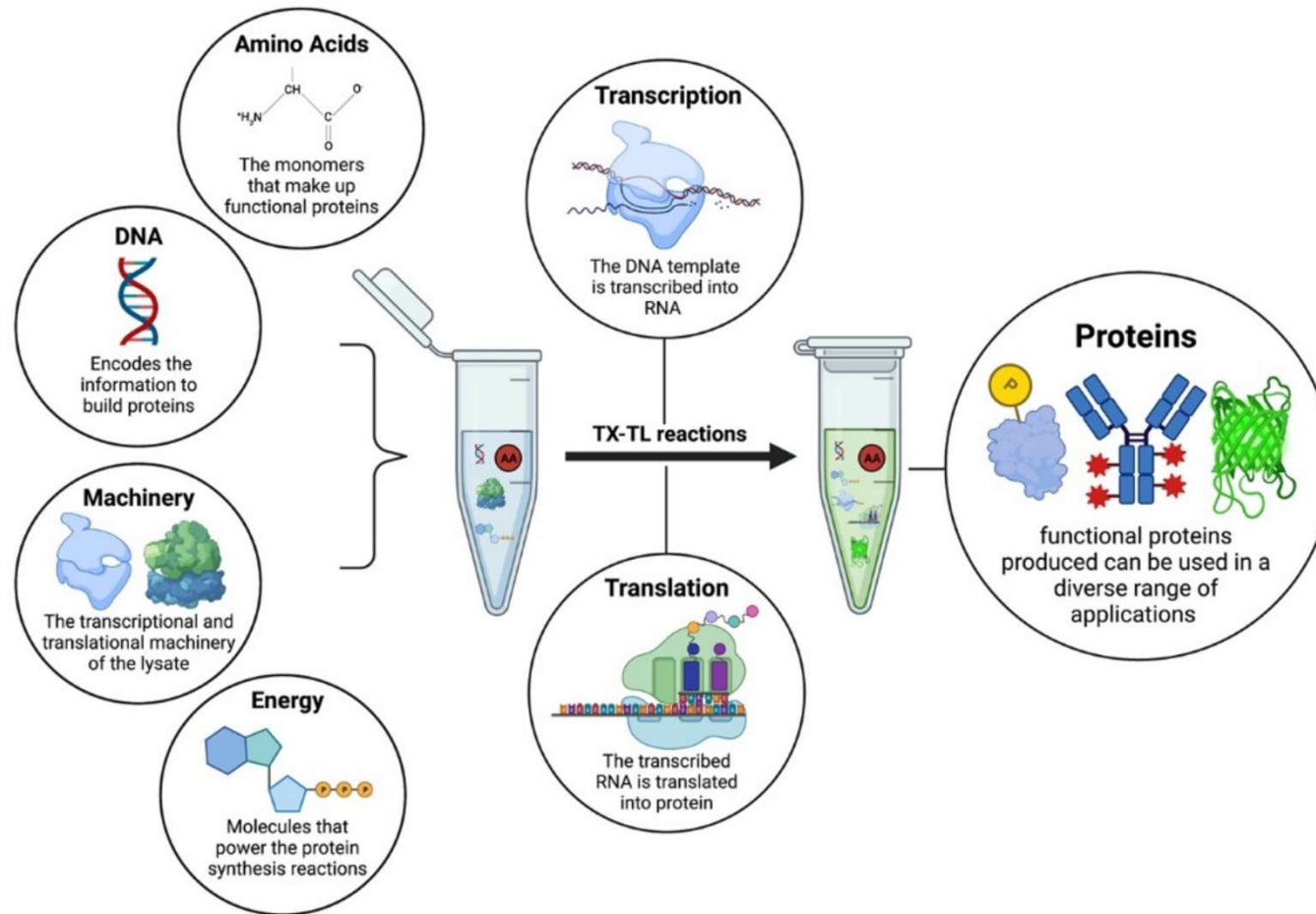
Les systèmes d'expression

Système d'expression	Délais	Coût	Modifications post-traductionnelles	Faible niveau d'endotoxine	Simplicité du passage à grande échelle	Sécrétion
<i>E. coli</i>	+++	+++	+	+	+++	+
Cellules de mammifère	++	+++	+++	+++	+++	+++
Cell Free	++	+	+	+++	+	

1. Systèmes d'expression sans cellules (Cell-Free Expression)

- Une méthode d'expression de protéines recombinantes très efficace et rapide a été rendue possible par le développement d'un système de production de protéines sans cellules.
- Dans cette procédure *in vitro*, un lysat cellulaire d'*E. coli* comprenant les composants cellulaires essentiels pour la transcription et la traduction est nécessaire à la production de la protéine cible.
- Cette méthode contourne la longue étape de culture cellulaire, accélérant ainsi considérablement l'expression et la production de protéines recombinantes.
- Des vecteurs plasmidiques réguliers ainsi que des vecteurs spécialement conçus sont utilisés dans ce système.

1. Systèmes d'expression sans cellules (Cell-Free Expression)



1. Systèmes d'expression sans cellules (Cell-Free Expression)

- **Avantages:**
- **Le CFPS est économique**, car il élimine le besoin d'installations spécialisées pour les cultures bactériennes ou cellulaires. Il est également rapide, **réalisant la synthèse des protéines en seulement 3 heures**, et offre un contrôle facile. De plus, les systèmes CFPS permettent un suivi et une modification en temps réel des réactions de synthèse des protéines.
- En tant que système ouvert, **le CFPS permet un contrôle précis des conditions de réaction et une évolutivité de la production**. Par exemple, l'ajout d'ions métalliques (tels que Fe^{2+} , Mn^{2+} et Cu^{2+}) peut améliorer la synthèse précise des protéines. Les systèmes CFPS peuvent également servir de **plateforme pour la production de toxines**, telles que des peptides antimicrobiens.
- La nature ouverte du CFPS est particulièrement avantageuse pour le prototypage de nouvelles voies métaboliques et circuits génétiques, offrant **des réactions enzymatiques chimiques contrôlables entre substances actives**.

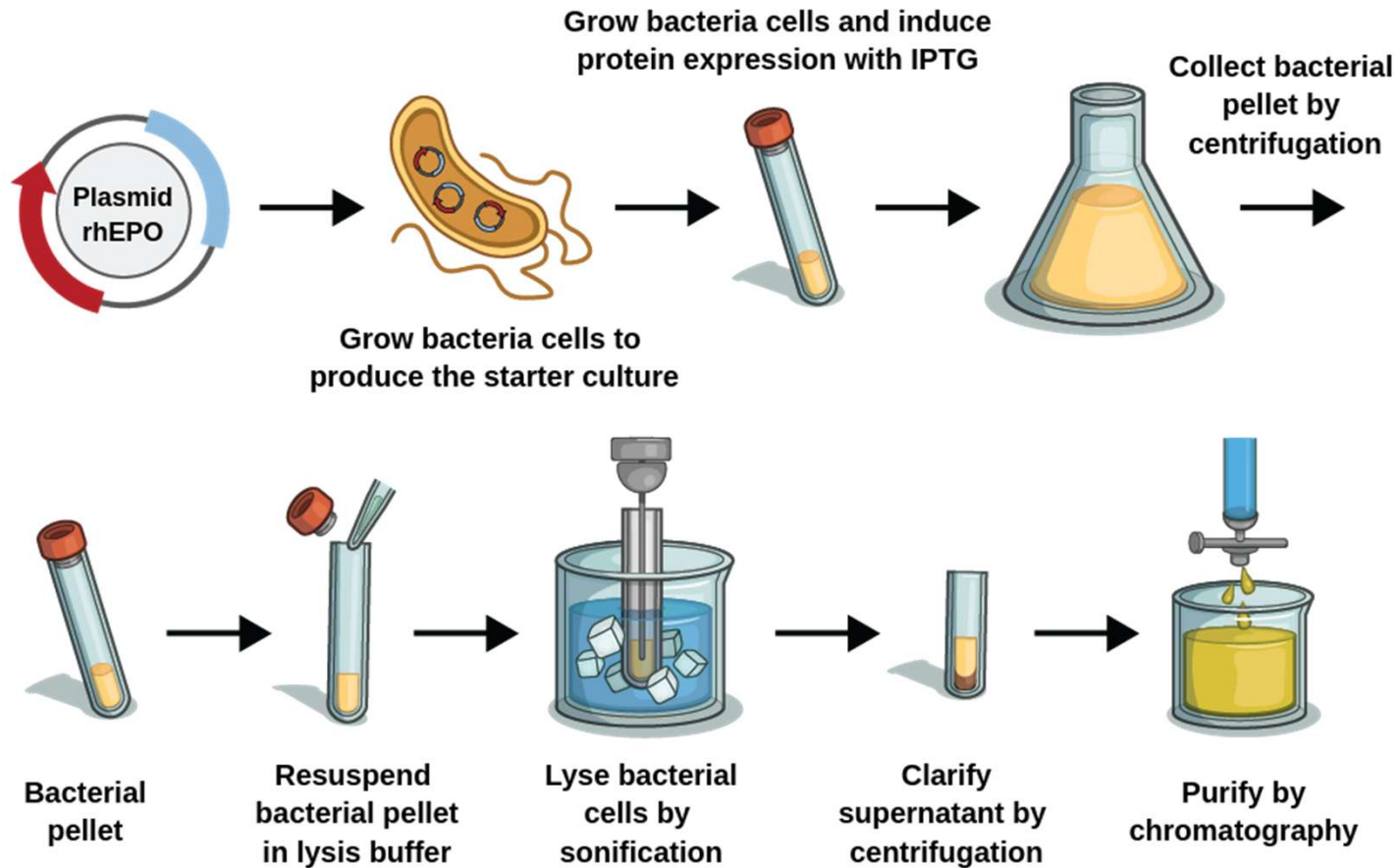
2. Systèmes d'expression bactérien

- Parmi les micro-organismes, les systèmes hôtes disponibles comprennent les bactéries, les levures, les champignons filamenteux et les algues unicellulaires.
- Tous ont des forces et des faiblesses et leur choix peut être soumis à la protéine.
- L'importance de la robustesse des systèmes bactériens qui aide à la production d'un grand nombre de vecteurs plasmidiques est multiple.
- L'une des utilisations les plus courantes des systèmes **d'expression bactérien** est la surexpression et la production de protéines d'intérêt qui ont révolutionné la recherche biomédicale et les industries.

2. Systèmes d'expression bactérien

- les systèmes bactériens sont appelés à juste titre des « usines à protéines ou bioréacteurs bactériens ».
- Par conséquent, il devient impératif de purifier la protéine recombinante (> 95 % de pureté) avant sa commercialisation à grande échelle ou pour étudier ses caractérisations structurelles et fonctionnelles dans un laboratoire de recherche.
- Plusieurs techniques de purification de protéines (échange d'ions, filtration sur gel et chromatographie d'affinité....etc) qui utilisent différentes propriétés inhérentes aux protéines ont été développées au cours des dernières décennies pour répondre au besoin croissant de protéines recombinantes dans l'industrie et dans la recherche biomédicale.

2. Systèmes d'expression bactérien



2. Systèmes d'expression bactérien

- Escherichia coli est l'un des organismes de choix pour la production de protéines recombinantes.
- Son utilisation en tant qu'usine de cellules est bien établie et elle est devenue la plate-forme d'expression la plus populaire.
- Pour cette raison, il existe de nombreux outils et protocoles moléculaires à portée de main pour la production de à grande échelle de protéines hétérologues, mais aussi l'existence d'un vaste catalogue de plasmides d'expression, un grand nombre de souches modifiées et de nombreuses stratégies de culture.

2. Systèmes d'expression bactérien

- Les avantages de l'utilisation d'E. coli comme hôte sont bien connus :
- (i) elle a une cinétique de croissance rapide. En milieu glucose-sels et compte tenu des conditions environnementales optimales, son temps de doublement est d'environ 20 min. Cela signifie qu'une culture inoculée avec une dilution au 1/100 d'une culture de départ saturée peut atteindre la phase stationnaire en quelques heures. Cependant, il convient de noter que l'expression d'une protéine recombinante peut conférer une charge métabolique au microorganisme, entraînant une diminution considérable du temps de génération.

2. Systèmes d'expression bactérien

- Les avantages de l'utilisation d'E. coli comme hôte sont bien connus :
- (ii) Des cultures à haute densité cellulaire sont facilement réalisées. La limite de densité théorique d'une culture liquide d'E. coli est estimée à environ 200 g de cellules sèches/l ou environ 1×10^{13} bactéries viables/ml. Cependant, la croissance exponentielle des milieux complexes conduit à des densités loin de ce nombre. Pour cette raison, des méthodes de culture à haute densité cellulaire ont été conçues pour stimuler la croissance d'E. coli, même lors de la production d'une protéine recombinante.

2. Systèmes d'expression bactérien

- Les avantages de l'utilisation d'E. coli comme hôte sont bien connus :
- . (iii) Des milieux riches et complexes peuvent être fabriqués à partir de composants facilement disponibles et peu coûteux.
- (iv) La transformation avec de l'ADN exogène est rapide et facile.

2. Systèmes d'expression bactérien

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

2. Systèmes d'expression bactérien

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

3. Systèmes d'expression de levure

- La levure *Saccharomyces cerevisiae* a été l'eucaryote microbien privilégié dans le développement de la technologie de l'ADN recombinant.
- Alors que *S. cerevisiae* est toujours utile pour les études d'expression génique et la production de protéines, d'autres levures peuvent offrir des avantages en termes de caractéristiques de croissance, de rendement en protéines hétérologues et de caractéristiques de fermentation à grande échelle.

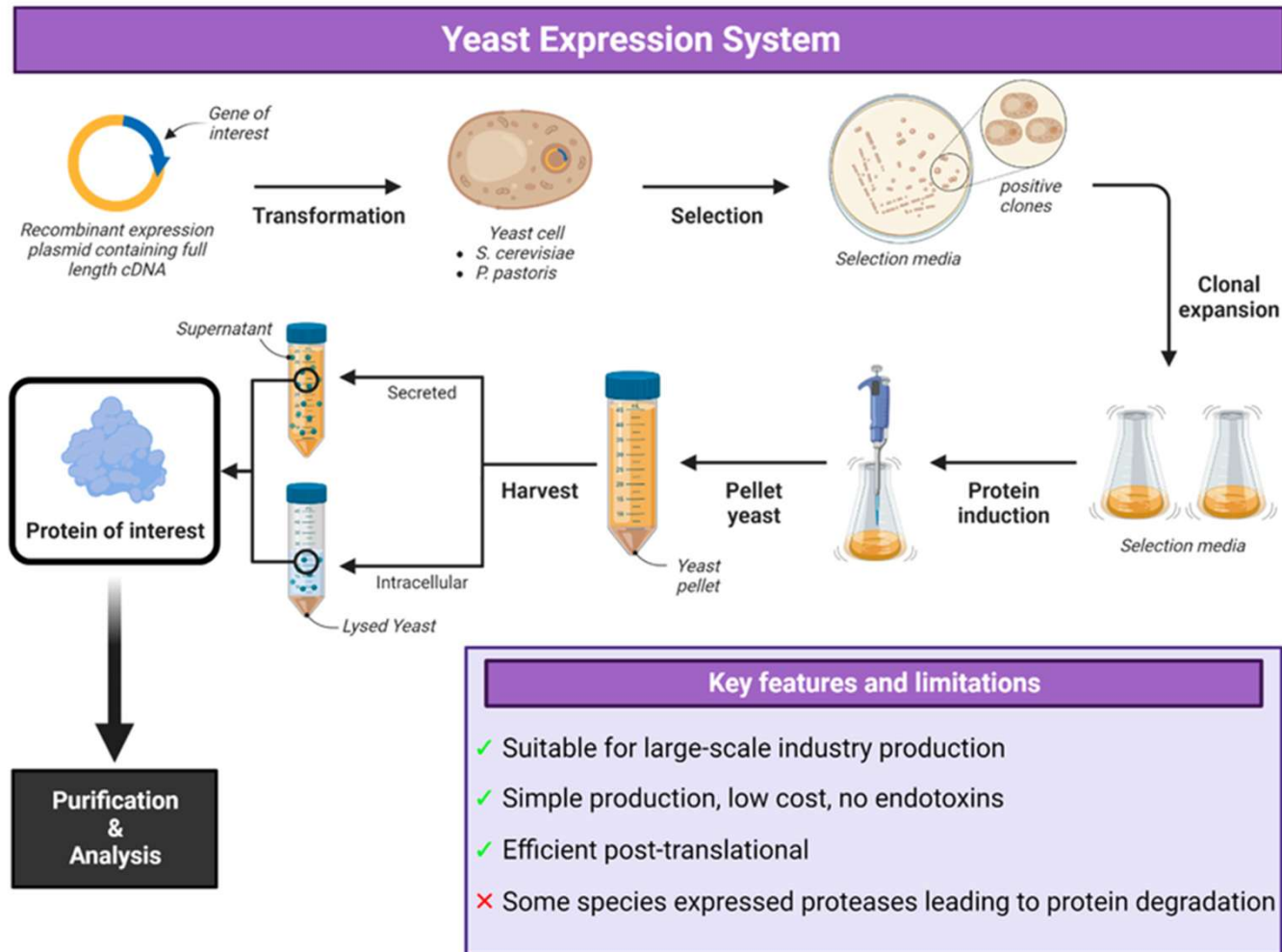
3. Systèmes d'expression de levure

- Les espèces utilisées comprennent *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Hansela polymorpha*, *Kluyveromyces lactis* et *Yarrowia lipolytica*.
- Celles-ci présentent bon nombre des caractéristiques des bactéries en ce qui concerne la facilité d'utilisation - elles se développent rapidement sur des milieux relativement peu coûteux et une gamme de souches et de vecteurs mutants différents est disponible pour diverses applications.
- Dans certains cas, les fermentations à grande échelle présentent certaines difficultés par rapport aux bactéries, mais celles-ci peuvent généralement être surmontées par une conception et une surveillance minutieuse du processus.

3. Systèmes d'expression de levure

- Des rendements en protéines hétérologues d'environ 12 g L⁻¹ (10 à 100 fois plus que chez *S. cerevisiae*) ont été obtenus en utilisant *P. pastoris*, qui peut être cultivé sur du méthanol comme seule source de carbone.
- Dans cette situation, la croissance est régulée par l'enzyme alcool oxydase, qui a une faible activité spécifique et est par conséquent surproduite dans ces cellules, constituant environ 30 % des protéines solubles totales. En plaçant des gènes hétérologues en aval du promoteur de l'alcool oxydase (AOX1), des niveaux élevés d'expression sont atteints.

3. Systèmes d'expression de levure



3. Systèmes d'expression de levure

- **Avantages:**
- L'un des avantages de l'utilisation de la levure par opposition aux hôtes bactériens est que les protéines sont soumises à des modifications post traductionnelles telles que la glycosylation.
- De plus, il existe généralement un degré plus élevé d' « authenticité » en ce qui concerne la conformation tridimensionnelle et les propriétés immunogènes de la protéine. Ainsi, dans une situation où les propriétés biologiques de la protéine sont critiques, les levures peuvent fournir un meilleur produit que les hôtes procaryotes.

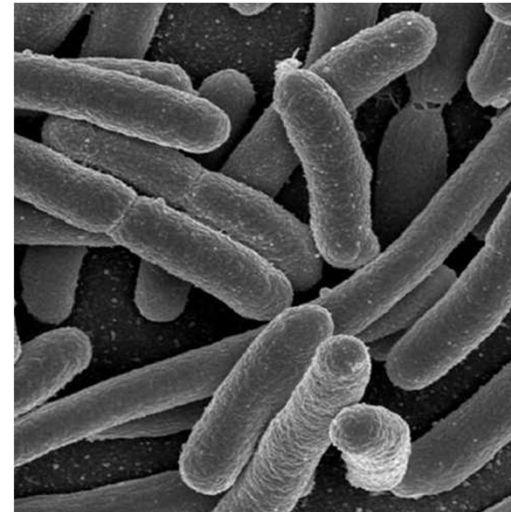
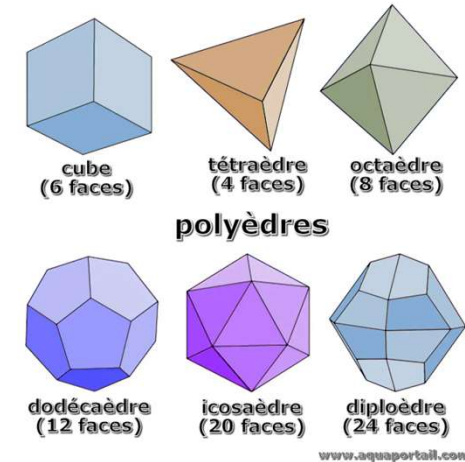
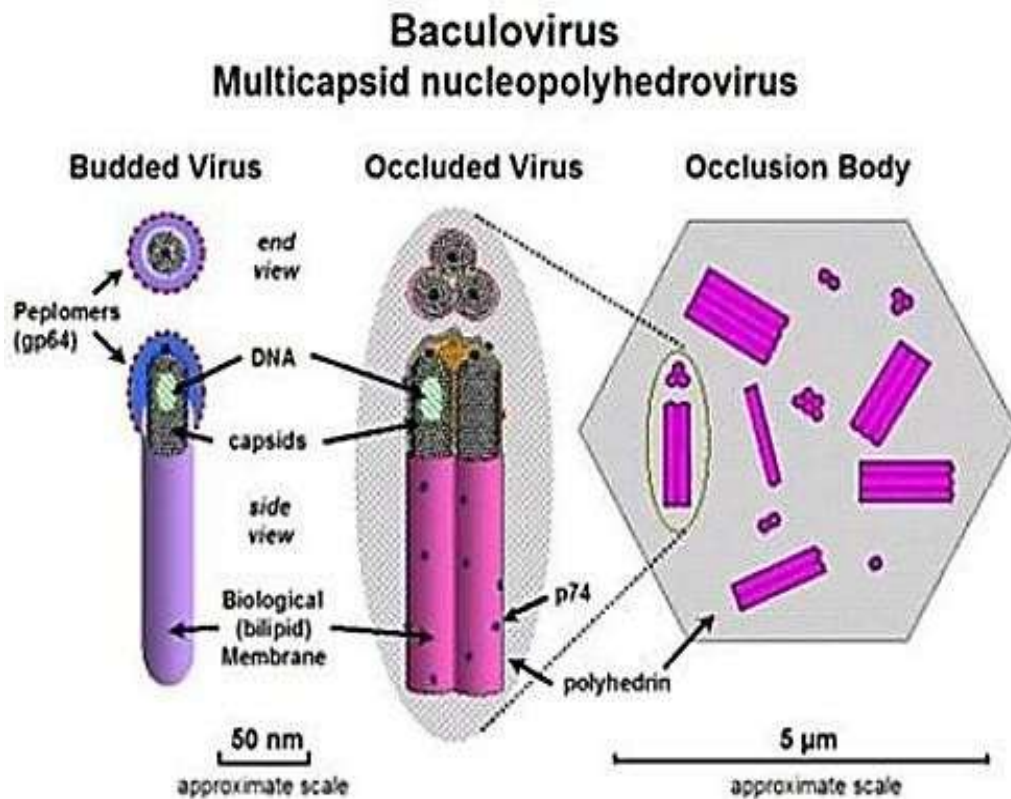
4. Systèmes d'expression Baculovirus-cellules d'insectes

- Les baculovirus infectent les insectes et ne semblent pas infecter les cellules de mammifères.
- Ainsi, tout système basé sur de tels virus présente l'attrait immédiat d'un faible risque d'infection humaine.
- Au cours de l'infection normale des cellules d'insectes, les particules virales sont emballées dans des polyèdres, qui sont des corps d'inclusion nucléaires composés principalement de la protéine polyédrine

4. Systèmes d'expression Baculovirus-cellules d'insectes

- Les baculovirus sont des virus en forme de bâtonnets d'environ 350 nm de longueur et 35 nm de diamètre.
- Ils font partie d'un groupe de virus très vaste, qui peut infecter plus de 600 espèces d'insectes mais aussi certains crustacés.
- Le génome viral est généralement constitué d'une molécule d'ADN circulaire, bicaténaire et surenroulée dont la taille varie entre 90 et 150 kpb environ.
- *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) est le baculovirus le plus utilisé comme vecteur pour la production de protéines, il a été isolé à partir de larves d'*Autographa californica*.

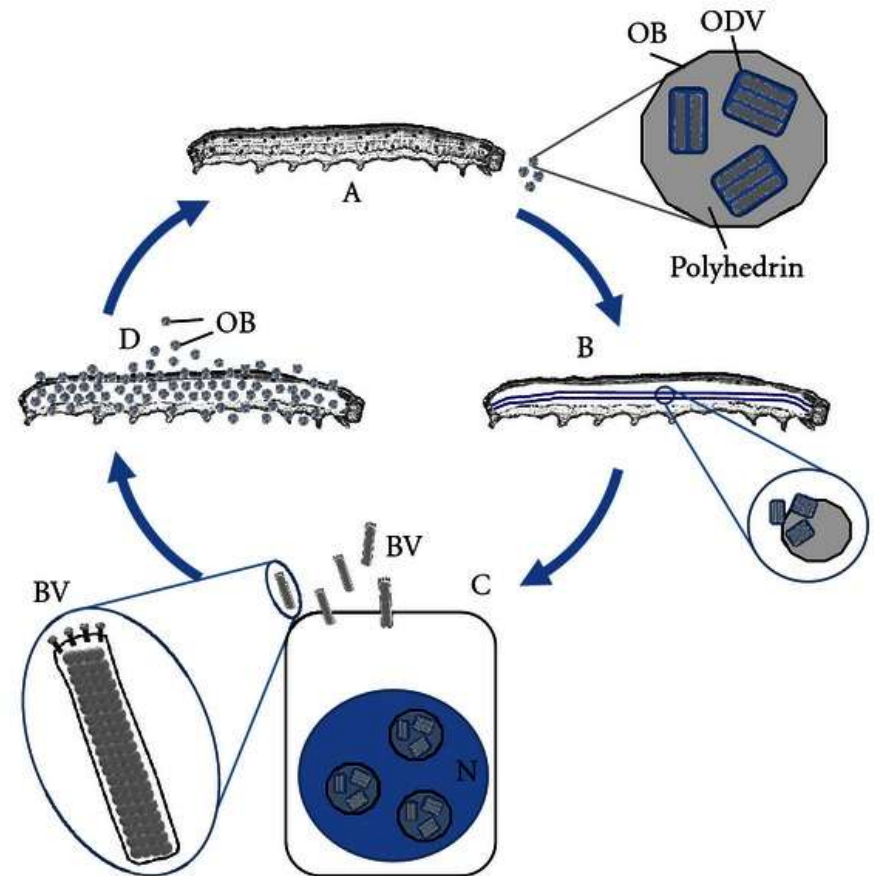
4. Systèmes d'expression Baculovirus- cellules d'insectes



4. Systèmes d'expression Baculovirus-cellules d'insectes

- **Cycle d'infection AcMNPV:**

- (A) L'infection est initiée par l'ingestion d'un corps d'occlusion viral (OB). Celui-ci est constitué de plusieurs nucléocapsides virales entourées d'une enveloppe lipidique unique (ODV) intégrée dans une matrice protéique formée par la protéine polyédrine codée par le virus.
- (B) Le corps d'occlusion est dissous par l'environnement alcalin de l'intestin moyen de l'insecte, libérant l'ODV qui initie une infection primaire dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen.
- (C) Le virus pénètre dans les cellules et se réplique dans le noyau. Deux formes différentes de virus infectieux sont produites dans les cellules infectées. Le virus bourgeonnant (BV) est libéré à la surface cellulaire et assure l'infection systémique de l'insecte via le système trachéal, tandis que l'ODV reste intégré dans les corps d'occlusion.
- (D) Les stades tardifs de l'infection virale déclenchent la liquéfaction de l'hôte, libérant les corps d'occlusion protéiques, stables dans l'environnement. La protéine polyédrine n'est pas essentielle à l'infection des cellules en culture continue en laboratoire et son niveau élevé de synthèse rend son promoteur idéal pour la production à haut niveau de protéines recombinantes.



4. Systèmes d'expression Baculovirus-cellules d'insectes

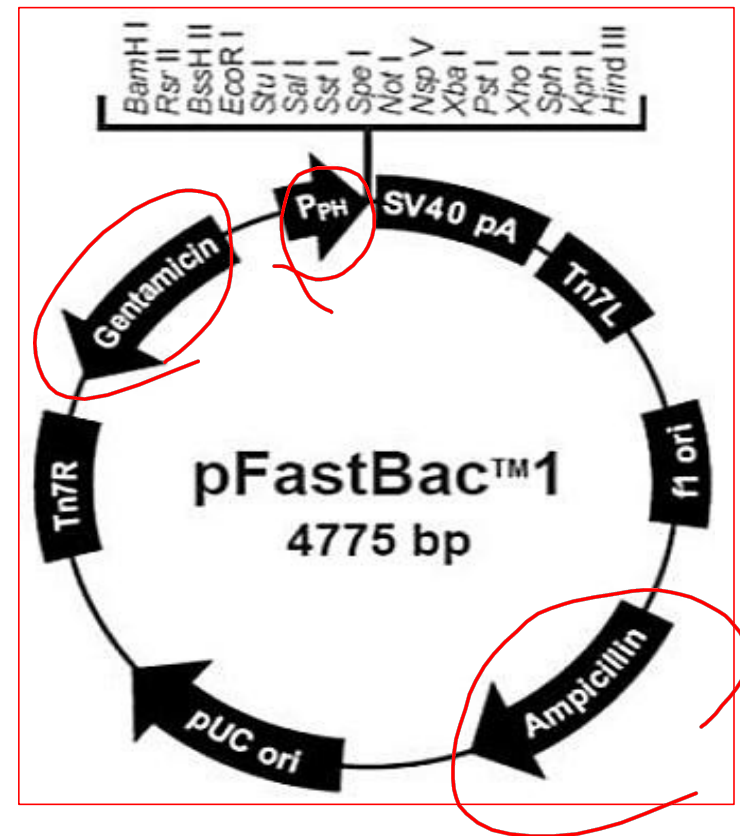
- L'insertion d'ADN étranger dans le vecteur doit être accomplie en utilisant un intermédiaire connu sous le nom de vecteur de transfert.
- Ceux-ci sont basés sur des plasmides d'*E. coli* et portent le promoteur du gène de la polyédrine (ou d'un autre gène viral) et tout autre signal d'expression essentiel.
- Le gène cloné pour l'expression est inséré dans le vecteur de transfert, et le recombinant est utilisé pour co-transfecter des cellules d'insectes avec de l'ADN viral non recombinant.
- La recombinaison homologe entre l'ADN viral et le vecteur de transfert aboutit à la génération de génomes viraux recombinants, qui peuvent être sélectionnés et utilisés pour produire la protéine d'intérêt.

4. Systèmes d'expression Baculovirus-cellules d'insectes

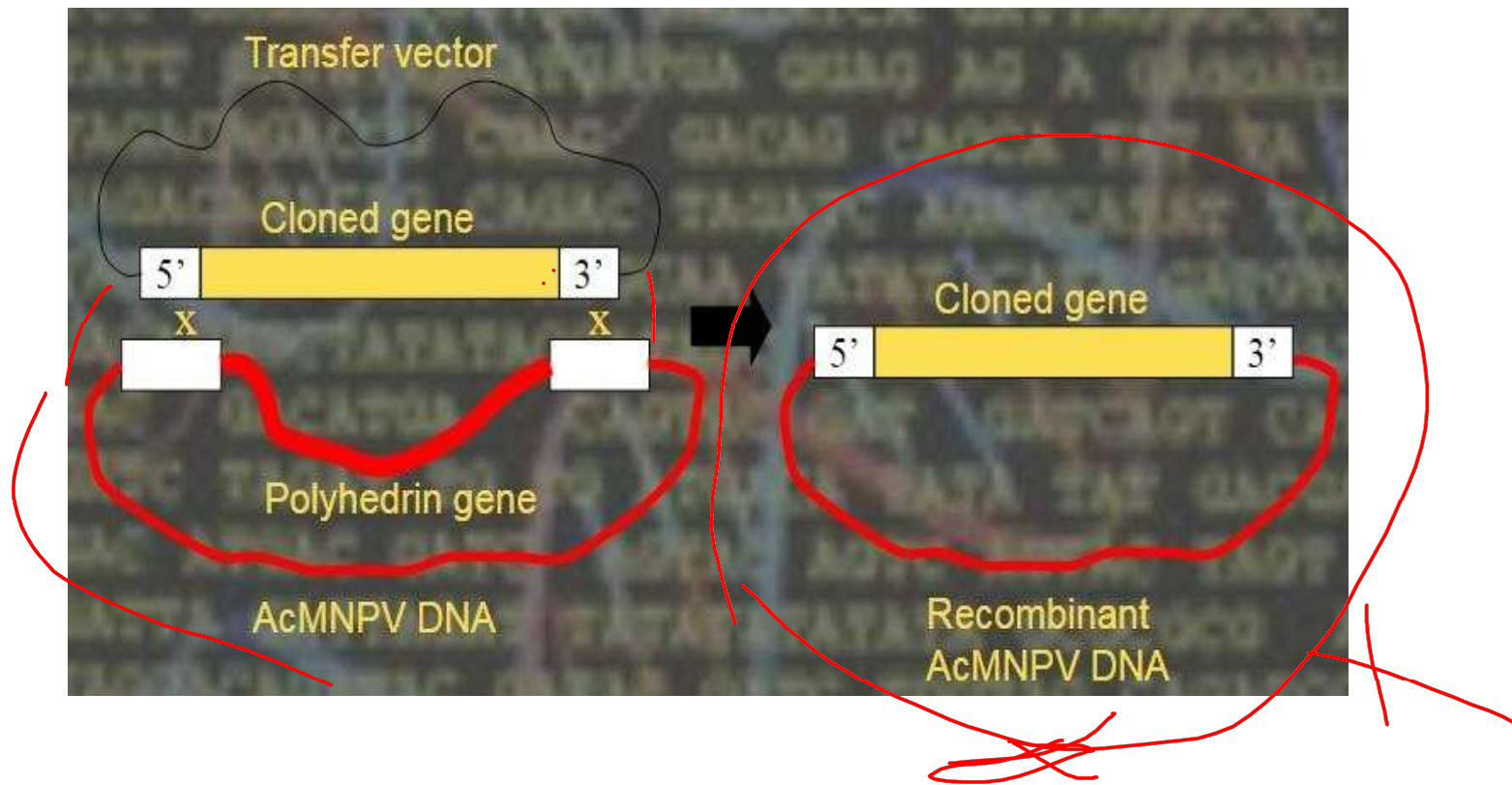
- Ce système nécessite la recombinaison homologue pour créer un baculovirus recombinant.
- La recombinaison se produit entre:
 - une version linéaire du génome baculoviral auquel manque un gène permettant la sélection (p.ex. gentamicine);
 - un vecteur de transfert portant le gène de résistance à la gentamicine ainsi que le gène encodant la protéine d'intérêt (ce dernier sous le contrôle du puissant promoteur de la polyhédrine).
- Le virus recombinant est ensuite utilisé afin d'infecter des cellules d'insectes. Ces dernières produiront alors de grandes quantités de la protéine d'intérêt.

4. Systèmes d'expression Baculovirus-cellules d'insectes

- Vecteur:
- **Pph:** promoteur de la polyhédrine, permettant des niveaux d'expression élevés;
- **TnTr/TnTL:** séquences utilisés lors de la recombinaison homologues entre le vecteur de transfert et le génome baculoviral;
- **Gentamicin:** gène de résistance à l'antibiotique gentamicine;



4. Systèmes d'expression Baculovirus-cellules d'insectes



4. Systèmes d'expression Baculovirus-cellules d'insectes

- **Avantages:**
- Ce système offre l'avantage de pouvoir obtenir, dans des temps relativement courts, des vecteurs recombinants faciles à sélectionner et de très hauts niveaux d'expression, allant de quelques dizaines à quelques centaines de milligrammes par litre de culture.
- Une autre considération importante est liée à la sécurité : aucun virus de vertébrés ne semble se multiplier dans les cellules de lépidoptères employées. Quant au baculovirus, il ne peut accomplir sa multiplication que dans les cellules d'insectes.
- L'absence de sérum dans le milieu de culture constitue un avantage non négligeable en terme de coût.

4. Systèmes d'expression Baculovirus-cellules d'insectes

- **Inconvénients:**
- Un inconvénient majeur réside dans la nécessité de procéder à la réinfection virale à chaque nouvelle culture, compte tenu du cycle lytique du virus.
- Les cellules d'insectes possèdent les équipements enzymatiques leur permettant d'effectuer la maturation et les modifications post-traductionnelles, mais ces dernières sont cependant très différentes de celles retrouvées chez les eucaryotes supérieurs

5. Systèmes d'expression dans cellules de mammifère

- Lorsqu'il s'agit de l'expression de protéines humaines recombinantes, il s'agit de systèmes autres que des bactéries, des microbes eucaryotes ou des cellules d'insectes.
- Cependant, l'utilisation de telles lignées cellulaires dans la production de protéines présente certains problèmes.
- Comme pour les lignées cellulaires d'insectes, les milieux nécessaires pour soutenir la croissance des cellules de mammifères sont complexes et coûteux, et les cellules sont relativement fragiles par rapport aux cellules microbiennes, en particulier lorsqu'une culture à grande échelle est impliquée.
- Il peut également y avoir des difficultés dans le traitement des produits (souvent le terme traitement est utilisé pour décrire les opérations nécessaires pour purifier une protéine à partir d'un processus de culture).

5. Systèmes d'expression dans cellules de mammifère

- Malgré ces difficultés, de nombreux vecteurs sont désormais disponibles pour l'expression de protéines dans des cellules de mammifères.
- Ils présentent des caractéristiques qui seront désormais familières - souvent basés sur un système viral, les vecteurs utilisent des marqueurs sélectionnables (souvent des marqueurs de résistance aux médicaments) et ont des promoteurs qui permettent l'expression de la séquence du gène cloné.
- Les promoteurs communs sont basés sur le virus simien (SV40) ou le cytomégalovirus (CMV).

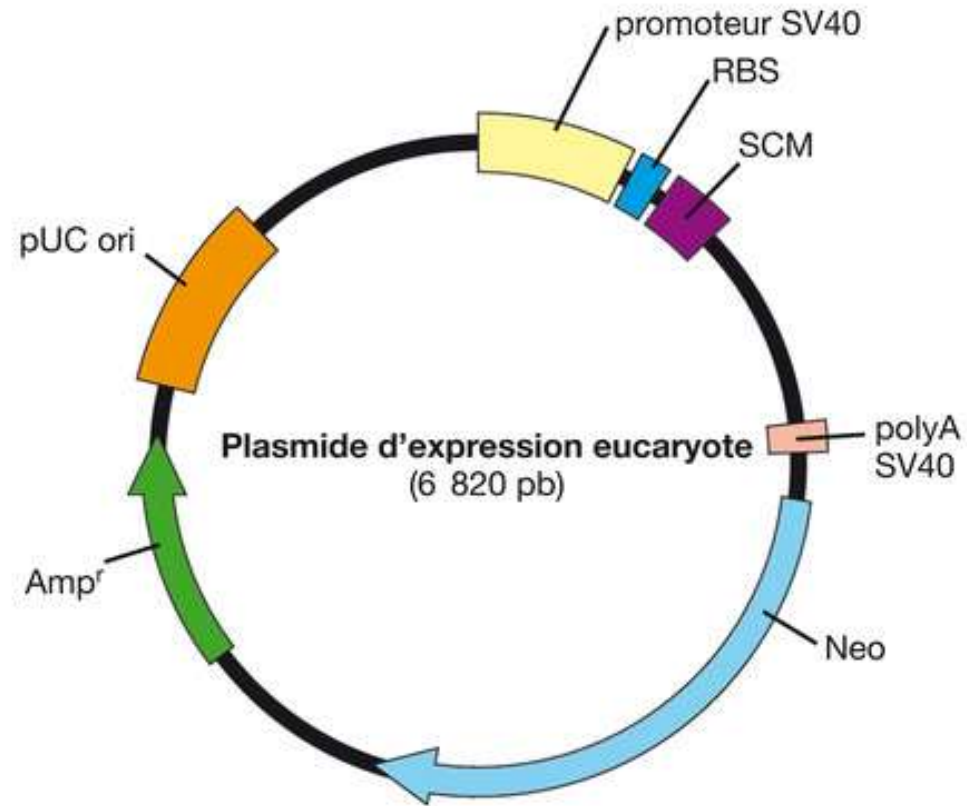
5. Systèmes d'expression dans cellules de mammifère

- Les lignées de cellules animales génétiquement modifiées sont utiles pour la production de protéines thérapeutiques humaines et fournissent également un système pratique pour étudier la régulation et le contrôle des gènes dans les processus cellulaires eucaryotes. Il existe, en général, deux types de procédés pour transférer de l'ADN dans des cellules de mammifères : (1) à médiation par une infection virale, ou (2) par transfection avec des vecteurs d'expression de mammifères.

5. Systèmes d'expression dans cellules de mammifère

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

5. Systèmes d'expression dans cellules de mammifère



vecteur d'expression typique destiné aux cellules animales

Systemes d'expression SV40

- Le virus SV40 est l'un des Papovavirus les plus étudiés, avec une taille génomique d'environ 5 kb. Il se compose de 2 promoteurs qui régulent les gènes précoces (codant pour les grands antigènes T et petits t) et les gènes tardifs (codant pour les protéines de capsid virale VP1, VP2 et VP3).
- Le virus SV40 contient également une origine de réplication qui prend en charge la réplication autonome en présence du grand antigène T.

Cycle d'un virus à ADN : le SV 40

- Les événements précoces
- Les événements tardifs

Cycle de multiplication du SV40

1/ Adsorption : récepteur HLA classe1

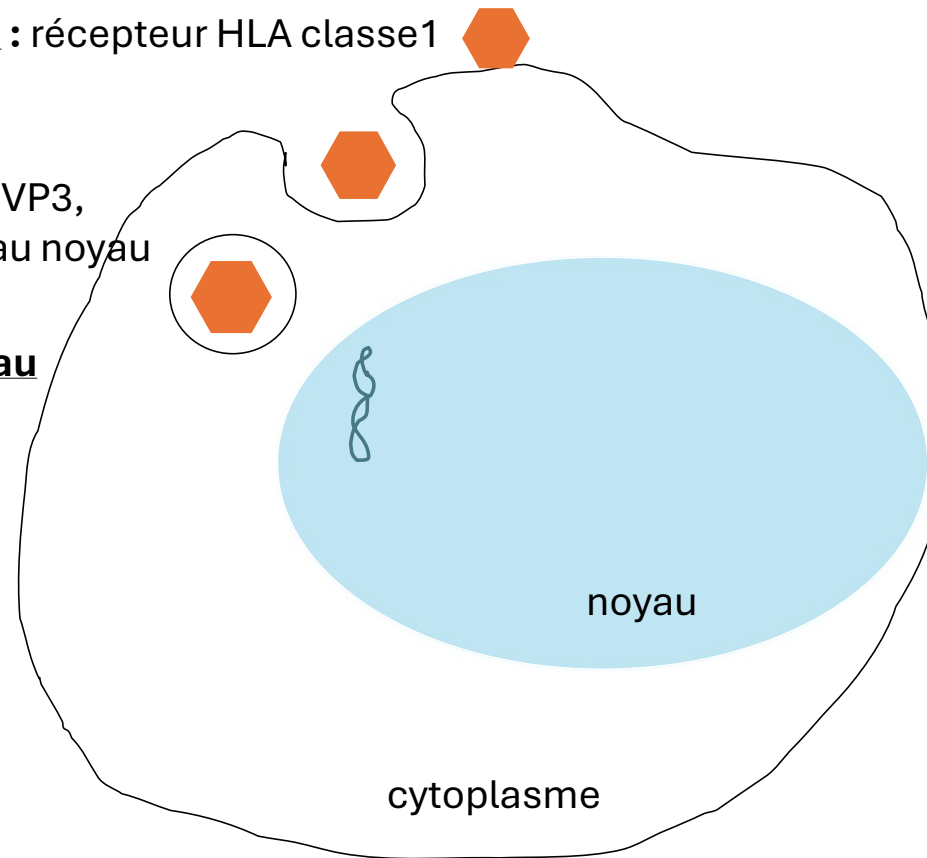
2/ Pénétration :

facilitée par VP2 et VP3,
endocytose jusqu'au noyau

3/ Décapsidation au

niveau du noyau :

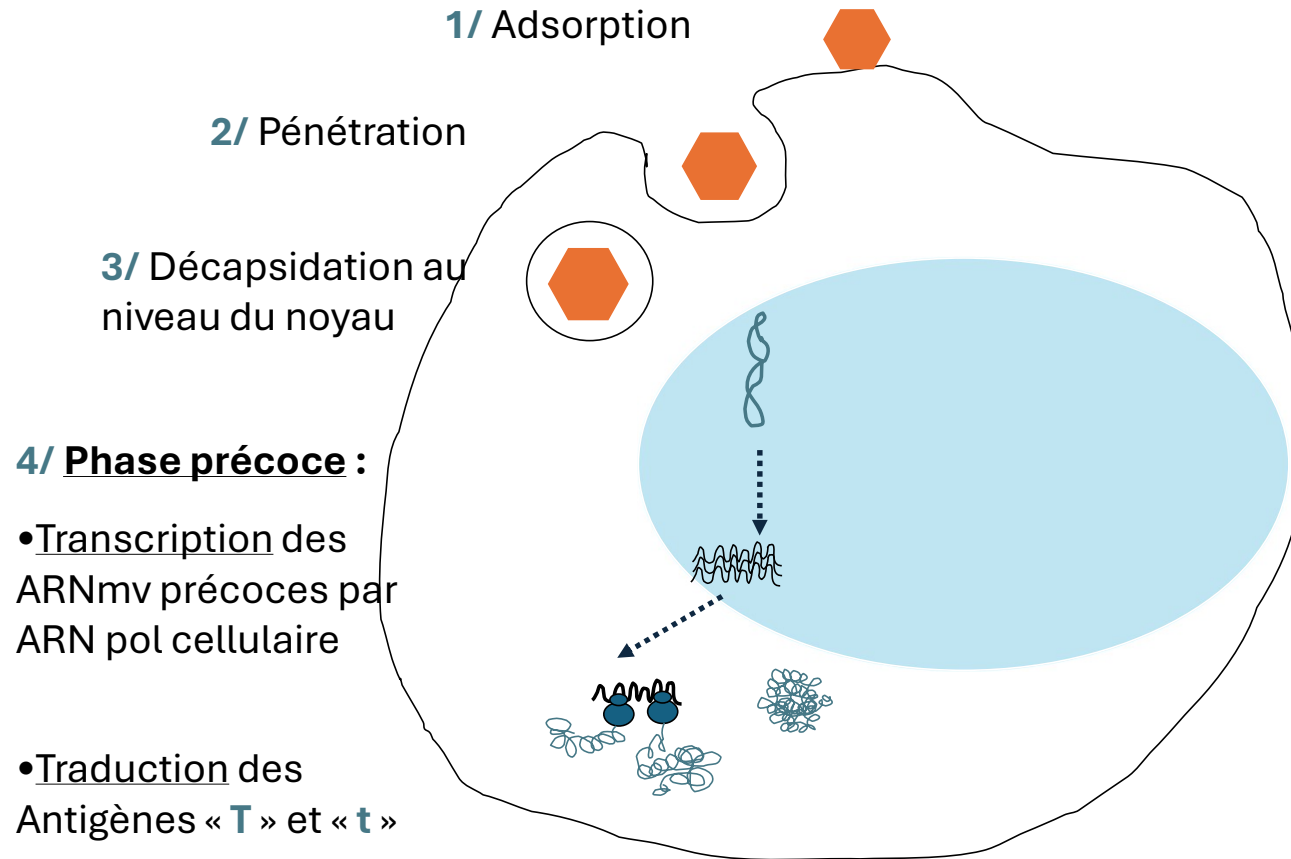
entrée par un pore



La phase précoce

- Transcription rapide en ARNm précoces par l'ARN pol cellulaire de l'ADNv
- Épissage différentiel :
 - pour une même information initiale des transcrits matures différents : ARNm « T » et ARNm « t »
 - l'intron ôté contient un terminateur de traduction
- Modifications post-transcriptionnelles
ajout d'une coiffe (5') et d'un polyA (3')
- Traduction en protéines « T » et « t » des messagers

Cycle de multiplication du SV40



La protéine « T »

- Facteur d'initiation de la réplication
- DNA binding protein (forte au niveau de ORI)
- Stimule la synthèse d'ADN en induisant la synthèse d'enzymes cellulaires : ligase, ADN pol...
- Contrôle sa propre synthèse
- Établit et maintient la transformation cellulaire

La protéine « t »

- Stimule la transcription du promoteur tardif
- Dissolution des câbles d'actine et Modification du cytosquelette cellulaire

La réplication

- Début de la phase tardive
- « T » : facteur d'initiation de la réplication, seul facteur d'origine viral participant à la réplication
- Bidirectionnelle et symétrique

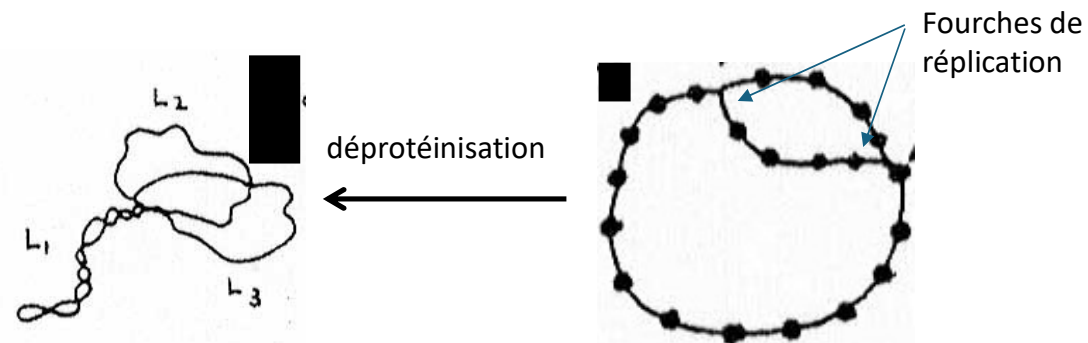


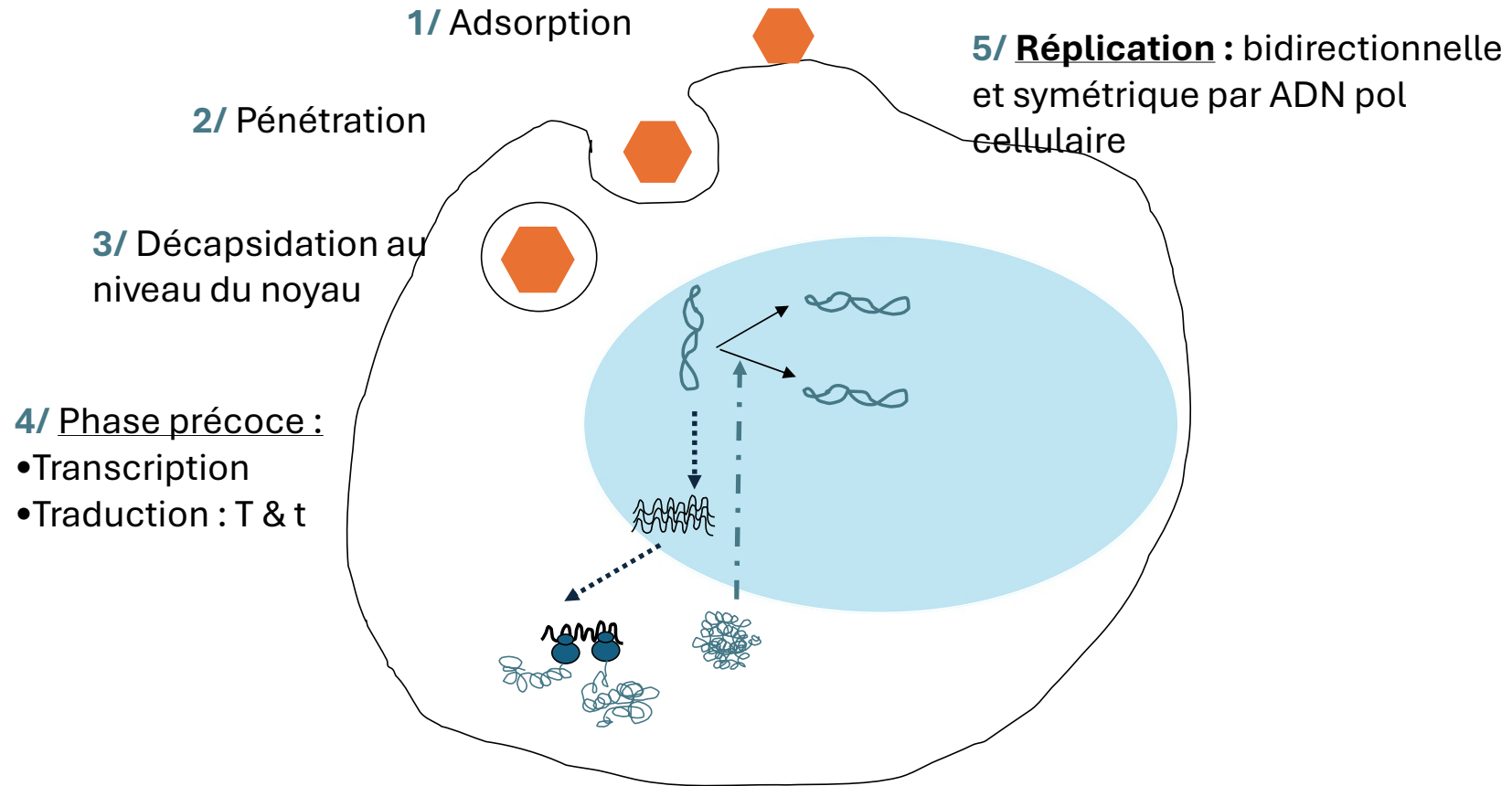
Schéma d'un intermédiaire de réplication en microscopie électronique

L₂, L₃ : ADN déjà répliqué, L₁ : ADN non encore répliqué (supers tours)

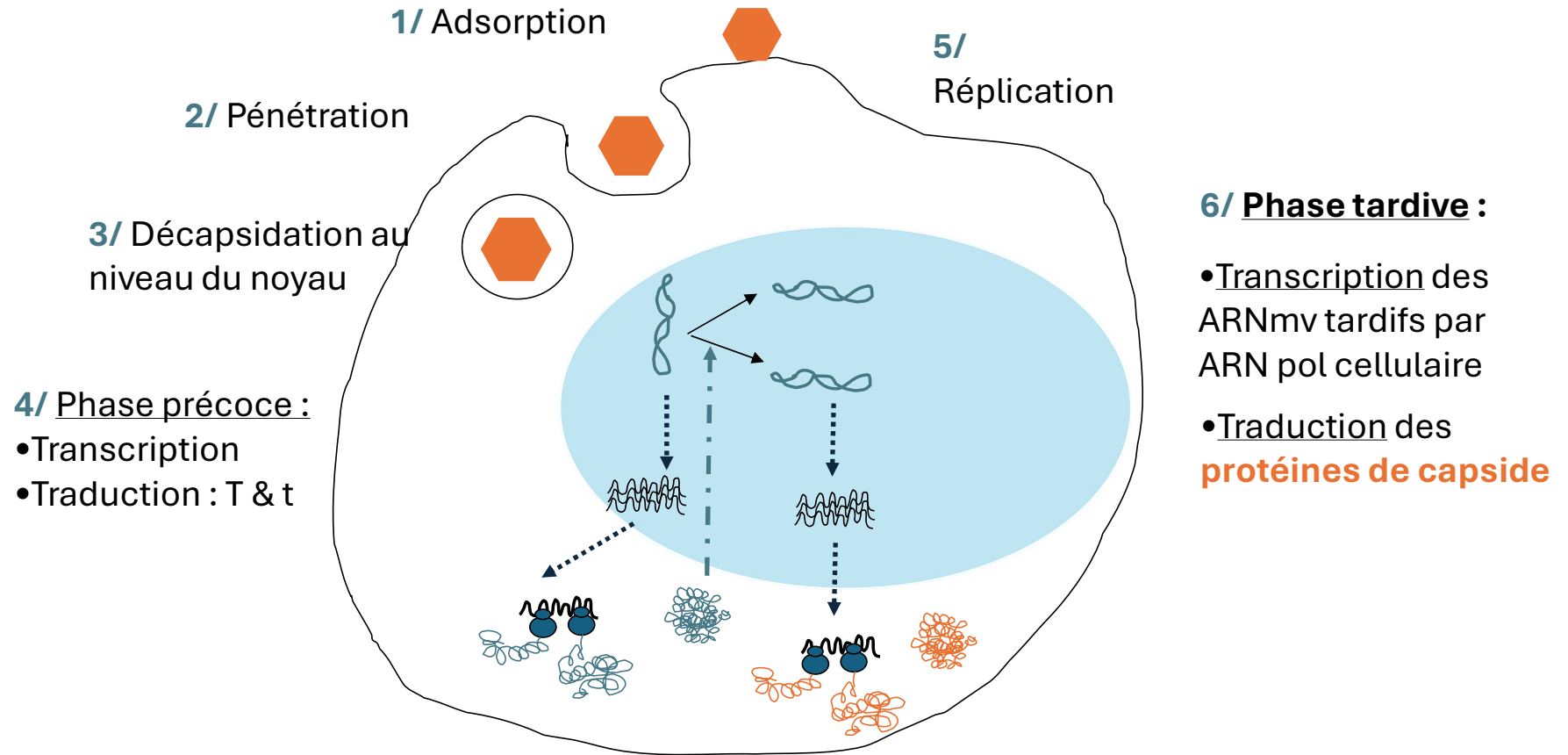
Cycle d'un virus à ADN : le SV 40

- Les événements précoces
- Les événements tardifs

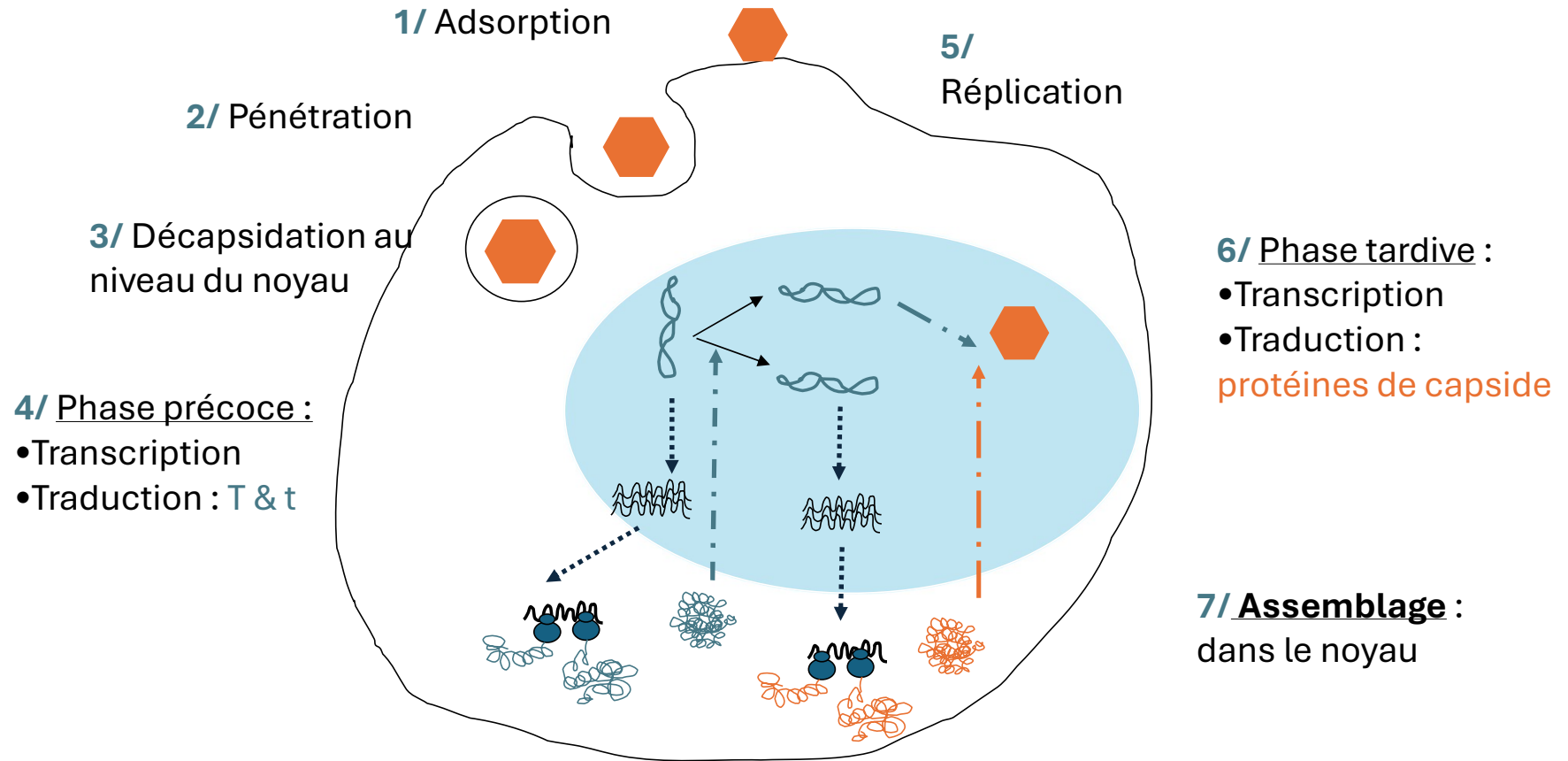
Cycle de multiplication du SV40



Cycle de multiplication du SV40



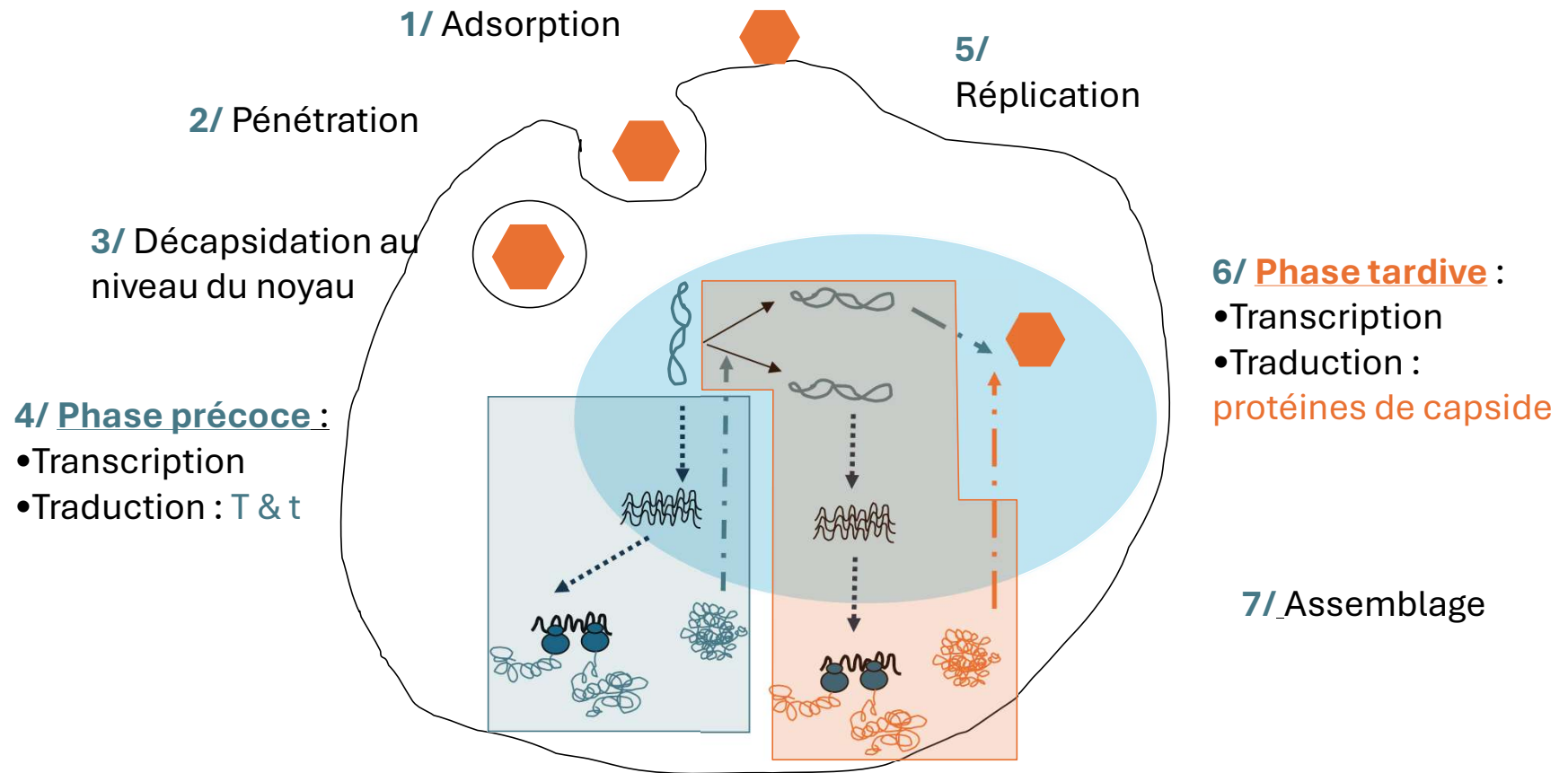
Cycle de multiplication du SV40



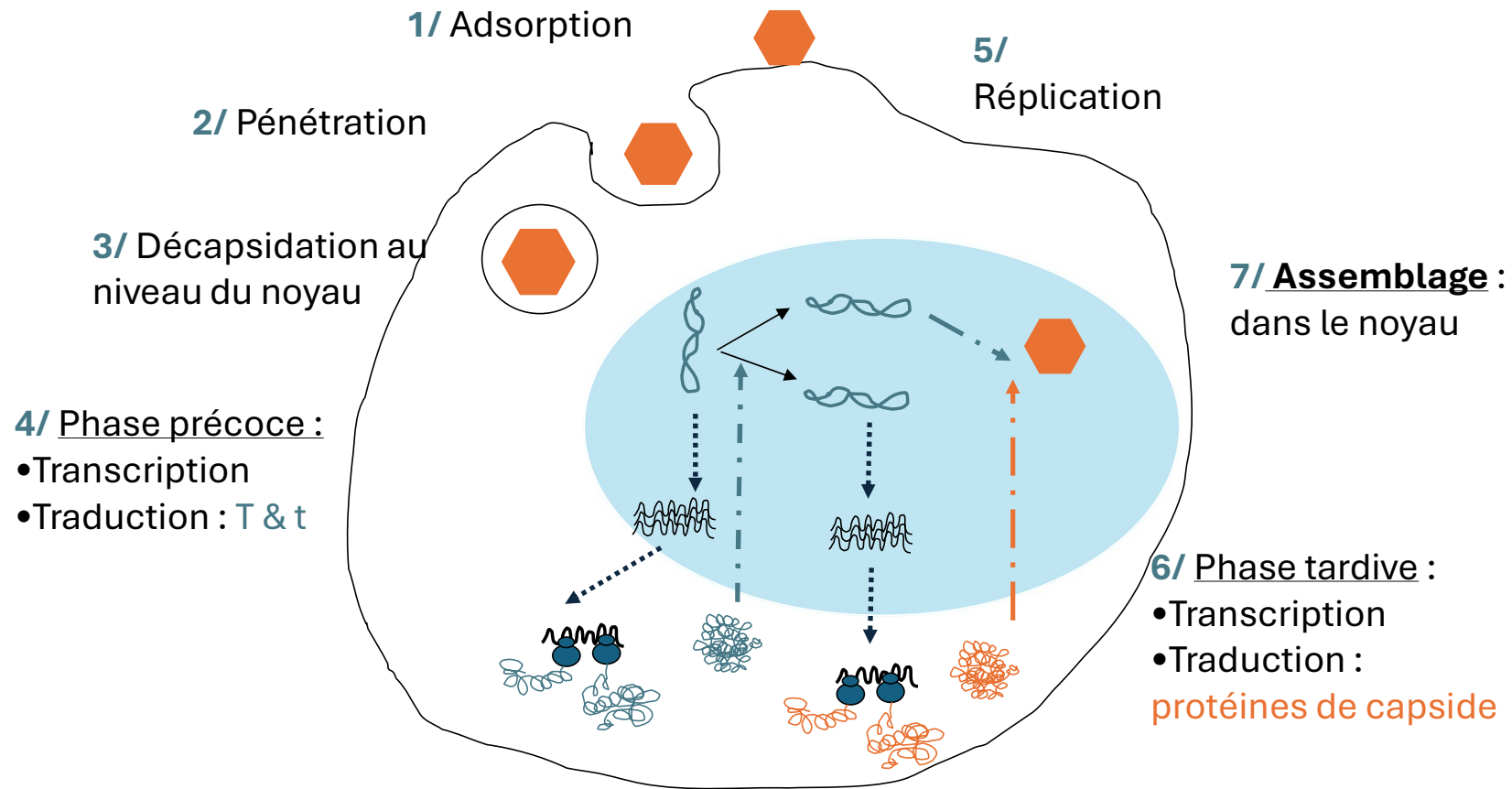
La phase tardive

- Débute dès le début de la réplication
- A partir du brin opposé de celui utilisé lors de la phase précoce
- Deux ARNm : issus de deux cadres de lecture ≠
 - 16S : VP1
 - 19S : VP2 & VP3 / traduction à partir de points différents
- Modifications post-traductionnelles : phosphorylation & glycosylation (VP1)

Cycle de multiplication du SV40



Cycle de multiplication du SV40



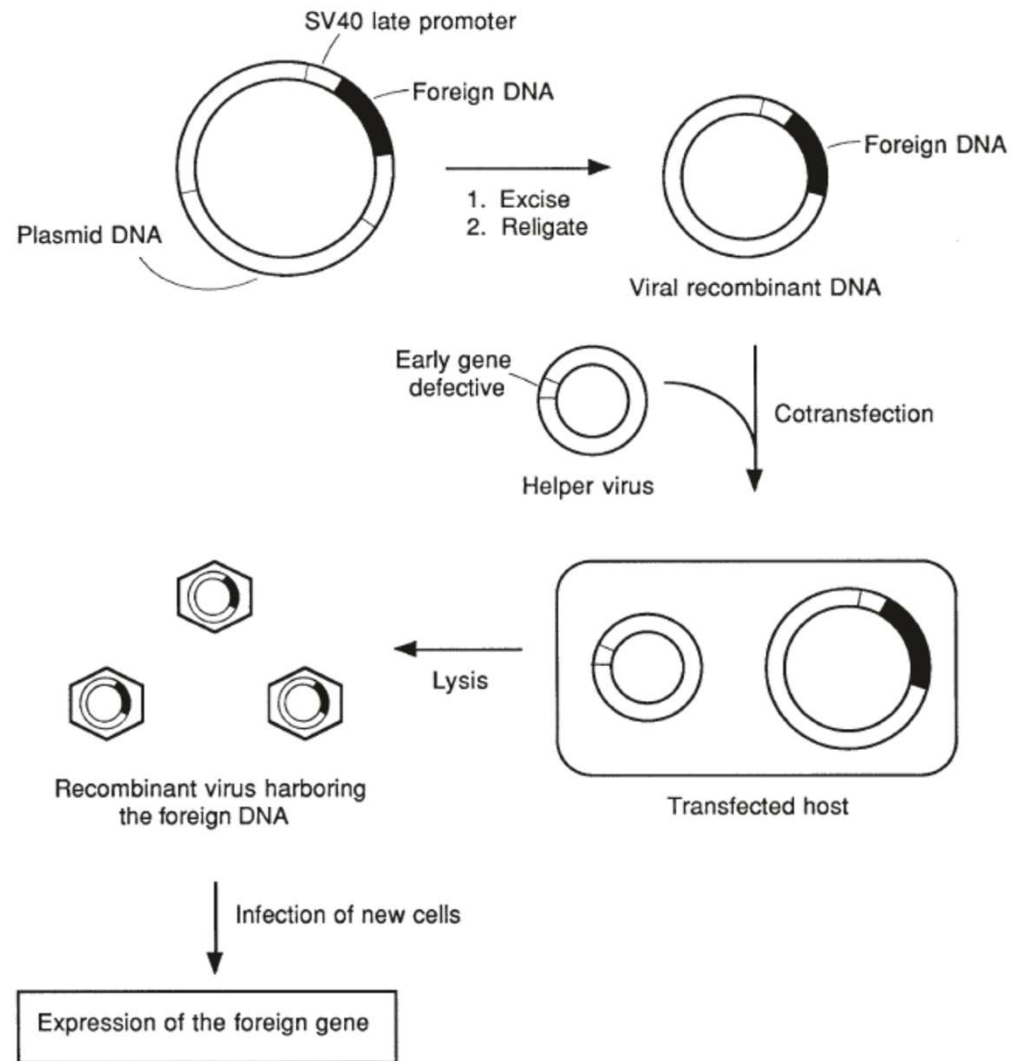
Systemes d'expression SV40

- Des vecteurs sont construits en clonant la séquence SV40 contenant l'origine de réplication et le promoteur tardif dans un plasmide bactérien (par exemple, pBR322).
- L'ADN étranger inséré remplace les gènes viraux tardifs. Le remplacement de l'ADN recombinant du SV40 par l'ADN plasmidique bactérien fournit un moyen efficace de manipulation de l'ADN

Systemes d'expression SV40

- Après la construction correcte de l'ADN recombinant du SV40, la séquence plasmidique est excisée.
- Le segment viral de l'ADN recombinant du SV40 est ligaturé et utilisé pour la cotransfection de cellules animales avec un virus auxiliaire.
- Un virus auxiliaire est un virus SV40 avec des gènes précoces défectueux mais qui possède des gènes tardifs fonctionnels pour compléter l'ADN recombinant viral (dans lequel les gènes tardifs sont remplacés par l'ADN étranger).
- Les cellules hôtes cotransfectées par un ADN recombinant et un virus auxiliaire sont donc capables de générer l'ADN viral et toutes les protéines virales nécessaires à l'encapsidation dans des particules virales infectieuses.
- L'utilisation d'un virus auxiliaire est anéantie si la cellule hôte fournit les fonctions virales à la place.

Systemes d'expression SV40



5. Systèmes d'expression dans cellules de mammifère

- **Avantages:**
- Les cellules animales se prêtent bien à la culture en masse en bioréacteurs, même si les rendements en protéines recombinantes sont plus faibles qu'avec les bactéries ou les levures, soit de l'ordre de 5 à 10 milligrammes par litre de milieu.
- Les cellules CHO sont capables de synthétiser des protéines complexes, de poids moléculaire élevé, correctement repliées, et possédant les modifications post- traductionnelles très proches de celles retrouvées sur les protéines humaines.

5. Systèmes d'expression dans cellules de mammifère

- **Avantages:**
- Leur physiologie est relativement bien connue et l'optimisation des rendements fait l'objet de nombreuses études.
- Parallèlement au développement de vecteurs toujours plus puissants, il est notamment possible de travailler sur le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose, afin d'augmenter la productivité et d'améliorer la qualité des protéines recombinantes synthétisées.
- Des travaux portant sur l'amélioration de la composition du milieu de culture ou sur le contrôle de l'expression des gènes endogènes sont également menés.
- Les améliorations récentes portent aussi sur la sécurité sanitaire : la tendance est au remplacement de substances d'origine animale dans le milieu par des substances végétales afin de limiter les risques décontamination.

5. Systèmes d'expression dans cellules de mammifère

- **Inconvénients:**
- Les cellules animales sont relativement exigeantes en éléments nutritifs, et la culture est délicate, limitée et coûteuse.
- En effet, les investissements requis pour mettre en place une unité de fermentation de cellules mammifères sont importants (environ 200 millions \$US pour une capacité de 200 kg d'anticorps annuelle)