



# **CHAPITRE V.1**

## **LE GENIE GENETIQUE ET LES BIOTECHNOLOGIES**

# INTRODUCTION

Techniques de l'ADN recombinant : **transfert de gènes d'un O\* à un autre** → 2 applications importantes:

- Production de **protéines biologiquement utiles** (protéines utilisées comme **médicaments** -Tab1- protéines utilisées en **industrie** -Tab2-
- Création des **O\* (Vg\*, A\*, μO\*)** ayant des **caractéristiques modifiées**

*Tableau 1. Protéines recombinantes humaines utilisées comme médicaments*

Protéine	Utilisée pour traiter
Antitrypsine $\alpha 1$	Emphysème
Calcitonine	Rachitisme
Gonadotrophine chorionique	Infertilité
Erythropoïétine	Anémie
Facteur VIII	Hémophilie
Insuline	Diabète
Interférons ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )	Infections virales, cancer
Interleukines	Cancer
Activateur de plasminogène tissulaire	Caillots sanguins
Hormone de croissance	Retard de croissance

*Tableau 2. Enzymes recombinants ayant des utilisations industrielles*

Protéine	Usage industriel
Rénine	Fabrication de fromage
$\alpha$ -amylase	Fabrication de bière
Bromélaïne	Pour attendrir la viande, et clarifier les jus.
Catalase	Antioxydant en agro-alimentaire
Cellulase	Production de sucre et d'alcool
Lipase	Fabrication de fromage

# I- EXPRESSION DES PROTEINES RECOMBINANTES

- Nécessite l'utilisation de vecteurs spécialisés = **vecteurs d'expression** (séquences d'ADN signaux qui gouvernent la transcription et la traduction de la séquence par la cellule hôte)
- Les cellules hôtes (B\*, levures, cellule Vg\*, cellule A\*)
- La technologie de l'ADN recombinant permet de produire des formes variantes de protéines naturelles. On parle du **génie de protéines**

## II- SYSTEMES D'EXPRESSION BACTERIEN

- Les 1<sup>ers</sup> systèmes d'expression de protéines → B<sup>+</sup> comme hôte.
- *E. coli* permet de produire des protéines rapidement et à faible coût

- 
- Caractéristiques des systèmes bactériens
    - Un promoteur en amont de la séquence clonée
    - Un signal de terminaison de la transcription en aval de la séquence clonée
    - Un site de fixation au ribosome en aval du start site de la transcription
    - La séquence d'ADN clonée doit avoir un codon d'initiation AUG au début et un codon de terminaison à la fin = **ORF**

### III- SYSTEMES D'EXPRESSION EUCARYOTES

- Bien que de nombreuses protéines eucaryotes puissent être exprimés avec succès ds des systèmes bactériens → certaines protéines exprimées sont instables ou biologiquement inactives



# **IV – LE GENIE GENETIQUE DS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE**

## **IV-1      TECHNIQUES      UTILISEES      POUR SYNTHETISER UNE PROTEINE**

## Pourquoi utiliser l'ADNc plutôt que l'ADN?

ADN eucaryote (intron)

Si on utilise des B<sup>+</sup> pr exprimer ces gènes →  
obstacle majeur: B<sup>+</sup> (**pas d'enzymes  
d'epissage**)

Le gène (**intron + exon**) → ARNm → protéine ≠  
de la protéine souhaitée

=> utilisation de l'**ADNc**

# Obtention de l'ADNc

Soit

- A partir des ARNm
- Synthèse chimique (petits gènes)

## Expression de l'ADNc

- 1eres expériences → une gde **déception**.  
(clonage d'un gène eucaryote ds une B<sup>+</sup> = **réussite mais pas d'expression !**)
- Nécessité des signaux Bactériens pr exprimer un gène eucaryote ds une B<sup>+</sup>
- Ds certains cas, il est possible de n'utiliser que le signal B<sup>+</sup>ien en amont de ATG et d'obtenir une protéine non hybride Ex interféron
- Ds d'autres cas, ça nécessite un promoteur + le début d'un gène B<sup>+</sup> ien Ex β galactosidase

→ ARNpol « trompée » transcrit le début du gène B\*ien puis le gène humain

→ ARNm hybride → protéine hybride contenant a l'extrémité NH<sub>2</sub> qlq a.a. supplémentaires

→ extraction de la protéine synthétisée → purification → élimination des a. a. supp → enfin, procéder à des contrôles: vérifier l'absence de toxicité puis contrôler l'efficacité

NB: si la protéine obtenue est inactive (cas des glycoprotéine, pont disulfure) → utilisation de ç eucaryotes mais le prix devient plus élevé

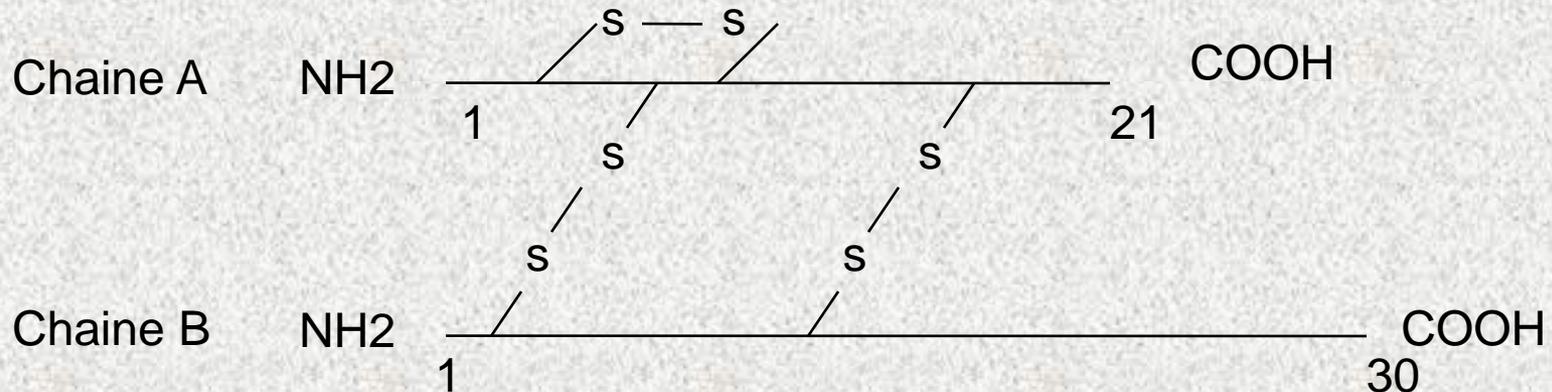
## IV – 2 EXEMPLES DE SYNTHÈSES DE PROTÉINES

### MÉDICAMENTS Ex l'insuline

Insuline = 1<sup>ère</sup> protéine obtenue par les techniques du GG à avoir été commercialisé (1982 au RU)

= hormone synthétisée par le pancréas, et qui fait défaut ds certains types de diabète

## \*Rappel de la formule des insulines animales



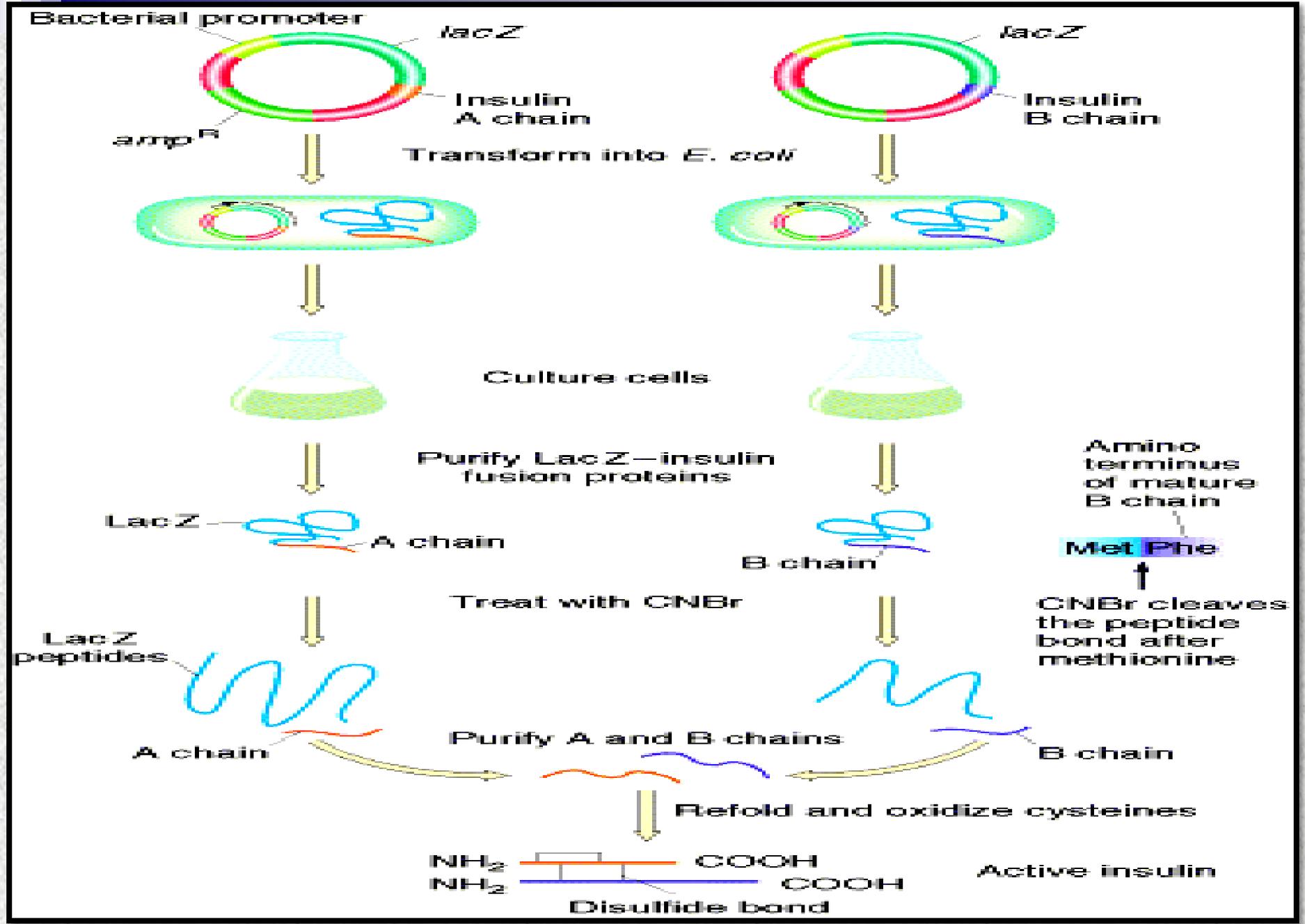
Les insulines bovines et porcines ont une formule voisine de l'insuline humaine → ils peuvent être utilisés comme médicaments par extraction du pancréas du bœuf ou le porc et purification

## \* **Obtention de l'insuline humaine**

- Pr certains traitements , on ne peut utiliser une insuline d'origine animale. La synthèse chimique de l'insuline humaine serait trop onéreuse.
- Actuellement, 2 procédés → insuline humaine
  - ✓ Insuline semi synthétique: **«insuline humanisée»**: substitution de l'**ala** porcine (COOHt) de la chaine B par la **thr** (**transpeptidation**)
  - ✓ Insuline humaine par les **techniques du GG**:

## Protocole:

- Synthèse par voie chimique d'un gène qui comprend: **un promoteur + le gène bactérien codant la Trp synthétase + codon Met + gène de la proinsuline humaine**
- La protéine chimérique « **trp synthétase - Met- proinsuline** » sera extraite puis coupée en aval de la Met par le bromure du cyanogène
- Clivage enzymatique pr libérer l'insuline



## VACCINS : les vaccins recombinants vivants

- Une nouvelle forme de vaccin
- Le gène codant la s/s unité antigénique est inséré ds le virus de la vaccine
- Ce virus (porteur du gène) est injecté au sujet
- Production, in vivo, de la protéine antigénique recherchée

NB/ l'ADN du virus de la vaccine est très long (190kb)

- Cette stratégie pose encore des pbs chez l'homme (risques d'infections dues au virus Ex encéphalites surtout chez les immunodéprimés)

## IV- 3 PERSPECTIVES D'AVENIR

- Au début: préparer des médicaments de structure identique a celles protéines naturelles
- Actuellement: recherche de produits ayant des propriétés biologiques améliorées (meilleure spécificité d'action,...)
- Les médicaments produits par GG n'ont pas tous un prix de revient inferieur ou équivalent au médicament préparé par extraction
- diminution du prix de revient

# V GENIE GENETIQUE DES PLANTES

- GG → méthode directe pr produire des plantes modifiées
- Plantes → particulièrement adaptées à des modifications (totipotentes)
- ++ systèmes de transfert des gènes aux plantes

Ex à succès: plasmide Ti

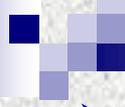
## Caractéristiques conférées aux plantes par GG:

### ➤ **Resistance aux attaques des insectes:**

Fabriquer par GG des plantes ayant une activité insecticide Ex: expression par GG de protéines inhibitrices de protéases

### ➤ **Resistance à l'infection virale:**

Transférer un gène codant une protéine capsidale virale



## ➤ **Resistance aux herbicides:**

10% de la production totale est perdue par les mauvaises herbes → Utilisation des herbicides

Les herbicides sont coûteux, potentiellement toxiques pr l'environnement , et peuvent tuer aussi bien des cultures que des mauvaises herbes



Transfert des gènes pour conférer une résistance  
aux herbicides des plantes → **destruction**  
**sélective des graines**

Le glyphosate :herbicide très utilisé (inhibe une  
enz impliquée ds la synthèse d'aa aromatiques  
par la plantes)

Resistance au glyphosate par transfert d'une  
forme bactérienne de l'enz qui n'est pas affecté  
par herbicide

## VI- LES ANIMAUX TRANSGENIQUES

- Sélection génétique sur les population d'élevage → très utilisé → A\* ayant des caractéristiques intéressantes Ex:
  - ✓ Haut rendement en lait
  - ✓ Vitesse de croissance importante ...

→ l'élevage sélectif est très efficace, mais il est difficile d'introduire de nouvelles caractéristiques sans modifier les traits existants

→ Introduire directement des caractères souhaités chez les A\* par transfert de gènes

L'A\* génétiquement modifié = A\* transgénique

Le gène transféré = transgène

Les transgènes peuvent être introduits dans les A\*  
suivant 3 méthodes

Chacune implique un transfert de gène dans

- Un ovule fécondé
- Des zygotes à un stade embryonnaire précoce

Les embryons modifiés → implantés dans l'utérus de  
l'A\* H

→ Se développent en descendance

- ✓ Vecteurs rétroviraux
- ✓ Microinjection
- ✓ zygotes embryonnaires

# Les principales applications des A\* transgéniques

➤ Etudier la fct des gènes:

➤ Systemes modèles pr les maladies humaines:

✓ Suivre l'apparition et la progression de maladies

✓ systèmes pour tester les nouveaux médicaments

## ➤ Production de protéines recombinantes:

On a produit des brebis transgéniques secrétant ds leurs lait des protéines recombinantes humaines →

++ avantages:

Lait est renouvelable

Produit en large quantités

Collecté sans douleur

=> protéines exprimées ressemblent a leur version humaines, facilement purifié (lait = peu de protéines)