

Introduction

La biotechnologie au secours des diabétiques

Le diabète est une maladie connue depuis l'Antiquité. Les Égyptiens avaient écrit sur cette maladie trois mille ans avant Jésus-Christ. Cinq siècles avant notre ère, les médecins chinois l'appelaient maladie de la soif et les Hindous la surnommaient affection de l'urine miel. Jusqu'au 18e siècle, les médecins devaient parfois goûter l'urine pour diagnostiquer la maladie. C'est au 19e siècle que Claude Bernard, un grand biologiste français, proposa une méthode de dosage du sucre dans le sang.



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 provient de pancréas de porcs ou de boeufs. Cette insuline animale diffère de l'insuline humaine et cause des problèmes d'allergie.

Le processus de génie est assez simple. Il s'agit de transférer le gène humain de l'insuline au chromosome de la bactérie E-coli. Celle-ci produit en quelques secondes l'insuline. Plusieurs milliards de bactéries peuvent fabriquer quelques grammes d'insuline. Pour arriver à réaliser ce transfert, il faut d'abord couper le fragment d'ADN humain qui contient le gène de l'insuline et le recombinaison avec l'ADN de la bactérie E-coli. Ensuite, cette nouvelle cellule d'ADN recombinée ou hybride est introduite dans la cellule de la bactérie E-coli. Le jumelage de la bactérie et de l'ADN hybride va produire l'insuline et toutes les colonies qui descendent de celle-ci auront la capacité de synthétiser cette hormone.

L'insuline humaine synthétisée par génie génétique se compare à l'insuline du pancréas humain et la purification permet d'éviter la contamination provenant des protéines de la bactérie E-coli. Cette sorte d'insuline pourra être produite en quantité illimitée et éviter ainsi les problèmes de pénurie.


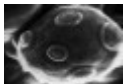




Les organismes modèles

Les multiples applications de la transgénèse utilisent des organismes dits " modèles ". Le recours à ces espèces est justifié en raison, d'une part de l'universalité de la molécule d'ADN, d'autre part de l'unité cellulaire du vivant et de son unicité structurale et fonctionnelle.


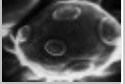




Aussi, ces espèces ont été retenues car elles partagent plusieurs caractéristiques intéressantes du point de vue génétique, expérimental et économique :

- génome bien caractérisé, souvent de faible taille, outils de biologie moléculaire disponibles pour son séquençage et sa manipulation à l'aide de diverses techniques ;
- temps de génération relativement faible, descendance nombreuse ;
- facilité d'élevage ou de culture, faible encombrement.

Caractéristiques des génomes

					
Bactérie	Ascomycète	Nématode	Angiosperme	Insecte	Mammifère

Comparaison de quelques caractéristiques génétiques d'organismes modèles avec celles de l'espèce humaine

Organisme		Position systématique	Nombre de chromosomes par jeu haploïde	Taille du génome (en Mb)	Nombre de gènes
	Escherichia coli	Bactérie	circulaire unique	4,7	4 288
	Saccharomyces cerevisiae	Ascomycète	16	14	6 200
	Caenorhabditis elegans	Nématode	6	100	19 100
	Arabidopsis thaliana	Angiosperme	5	130	25 000
	Drosophila melanogaster	Insecte	4	170	15 000
	Mus musculus	Mammifère	20	3 000	30 000

	Homo sapiens sapiens	Mammifère	23	3 000	30 000
---	-----------------------------	-----------	----	-------	--------

Présentation d'Escherichia Coli :

Escherichia Coli, dont le génome est décrypté, est sans doute la mieux connue des bactéries

Escherichia coli est présente dans la partie inférieure de l'intestin de la plupart des animaux à sang chaud. Cet organisme unicellulaire dont l'ensemble du génome est connu depuis plusieurs années est couramment utilisé comme modèle par les généticiens, les microbiologistes et les biologistes moléculaires. Génétiquement transformée, cette bactérie permet de produire diverses protéines telles l'insuline ou l'hormone de croissance humaine. De même, E. coli ne peut servir à l'industrie qu'après une modification génétique lui conférant une capacité de production de molécules d'intérêt économique. L'industrie alimentaire est cependant très intéressée par des organismes producteurs de composés naturels permettant de remplacer des molécules synthétiques. Ainsi en est-il des conservateurs de synthèse utilisés dans l'alimentation : ils sont de moins en moins prisés par cette industrie qui leur préfère des anti-oxydants d'origine biologique.

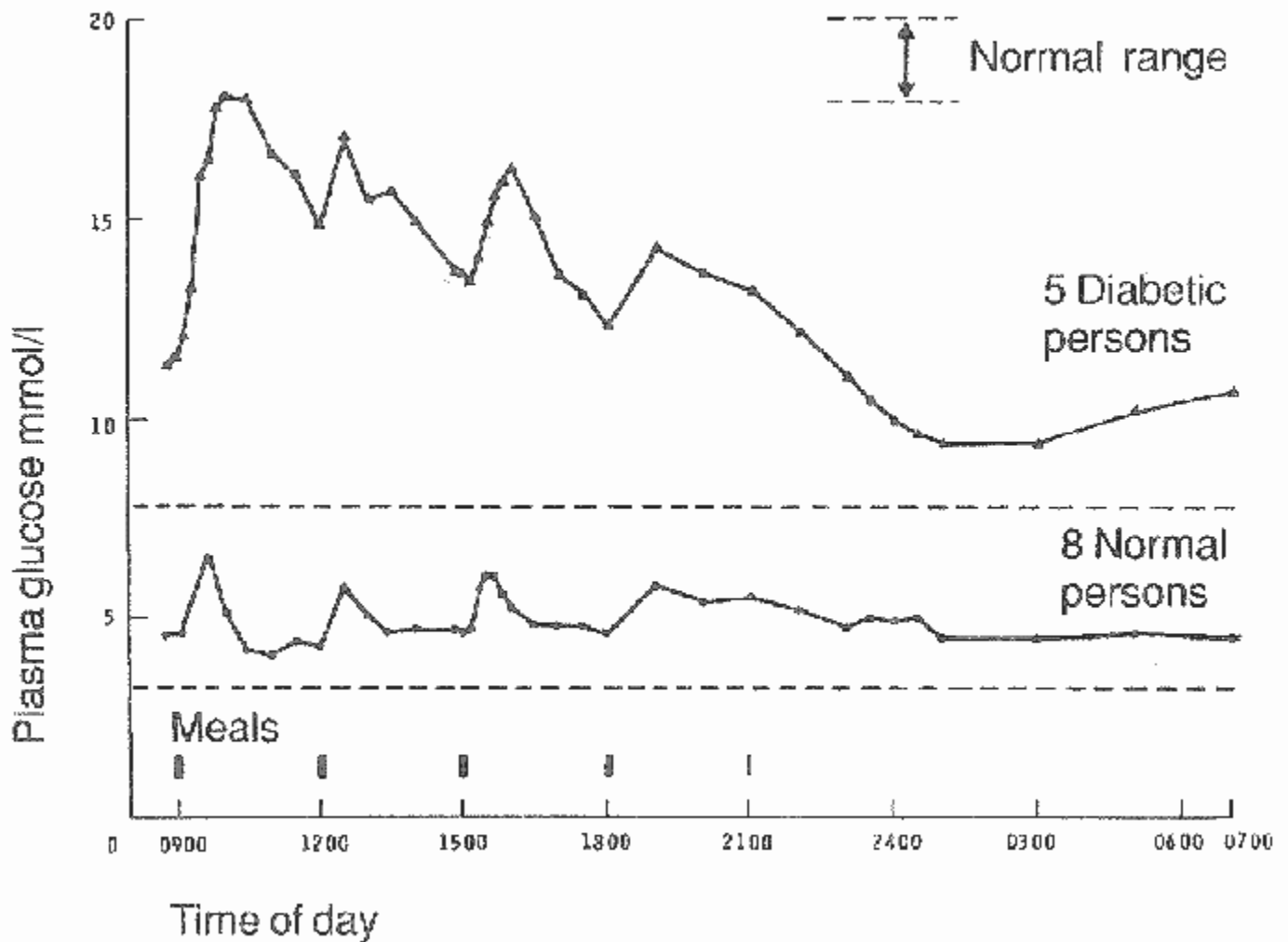
Technologie de recombinaison de l'ADN Dans la synthèse de l'insuline humaine



La nature et le but de synthétiser l'insuline humaine.

Depuis la découverte de l'insuline par Banting, les niveaux de sucre élevés chez les patients diabétiques (voir 1) sont due à la production altérée d'insuline, et ils ont été traités avec l'insuline dérivée des glandes de pancréas des animaux d'abattoir. L'hormone, produite et sécrétée par les cellules bêta du pancréas, règle l'utilisation et le stockage de la nourriture, en particulier les hydrates de carbone.

- Production d'insuline -

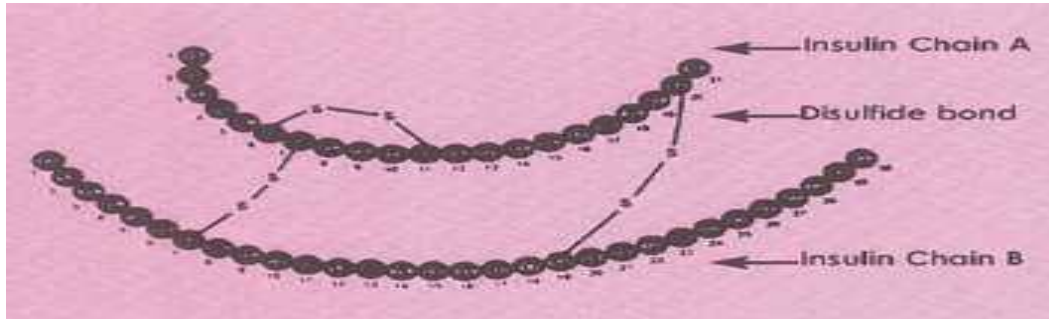


Fluctuations dans les niveaux de glucose du sang de la personne diabétique, comparés aux individus en bonne santé.

Bien que le bovin et l'insuline porcine soient semblables à l'insuline humaine, leur composition est légèrement différente. En conséquence, les systèmes immunitaires d'un certain nombre de patients produisent des anticorps contre elle, neutralisant ses actions et ayant pour résultat des réponses inflammatoires aux emplacements d'injection. Ajoutées à ces effets nuisibles de bovin et d'insuline porcine, des craintes des complications à long terme s'ensuivant de l'injection régulière d'une substance étrangère.

La structure de l'insuline.

Chimiquement, l'insuline est une petite et simple protéine. Elle se compose de 51 acides aminés, dont 30 constituent une chaîne polypeptidique, et les 21 restant composent la deuxième chaîne. Les deux chaînes sont liées par des ponts bi sulfurique.



La structure de l'insuline.

Présentation de la technologie

Les protéines recombinantes sont ainsi qualifiées dans la mesure où elles sont produites par des cellules dont l'ADN a été modifié par recombinaison génétique.

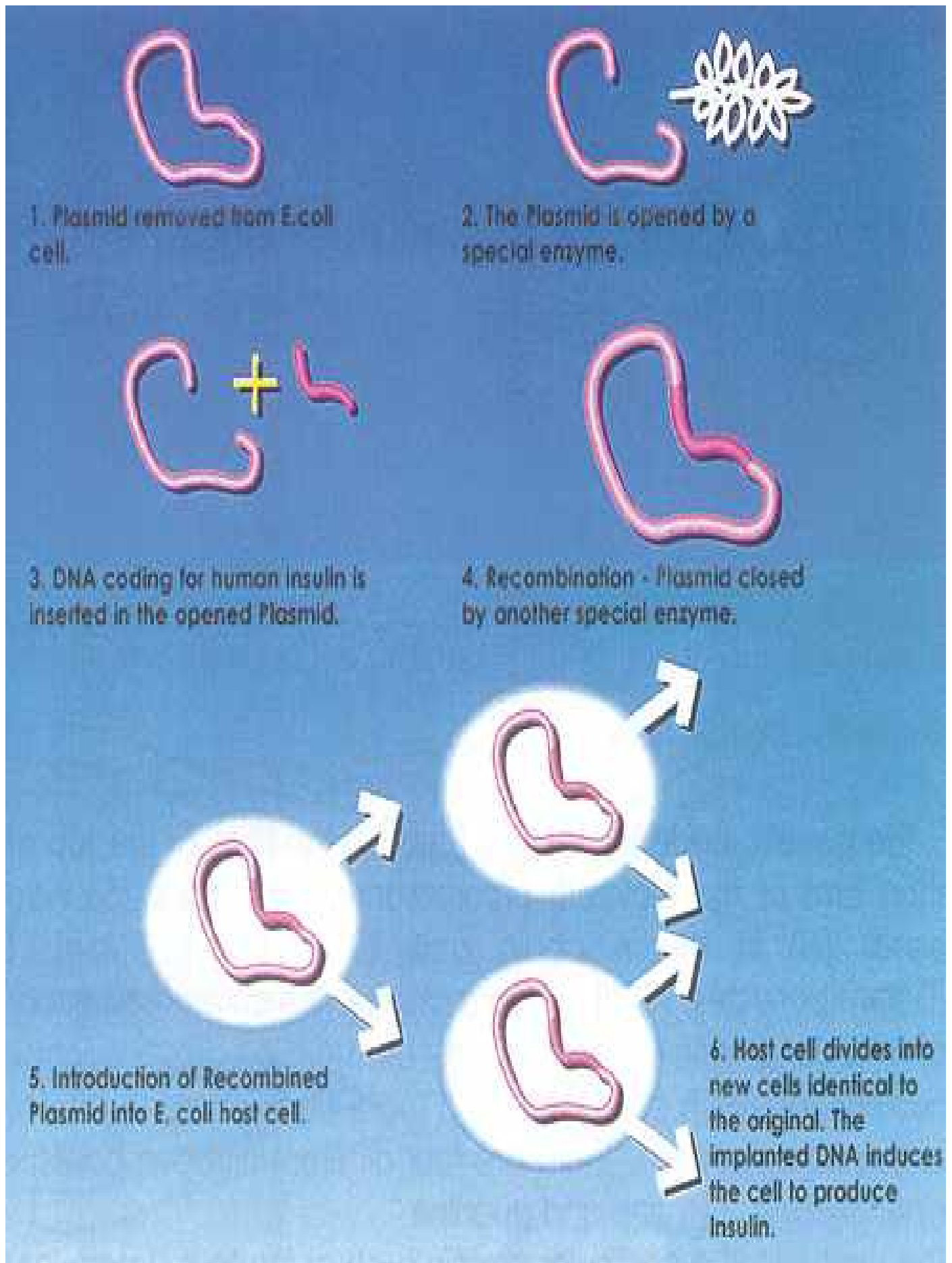
Au sens large, un système de production adapté à la fabrication d'une protéine recombinante donnée, est un process biotechnologique qui s'appuie principalement sur :

- *l'emploi d'un vecteur d'expression (en général un plasmide ou un virus -pour les vecteurs eucaryotes-), jouant le rôle de transporteur génétique du gène d'intérêt codant pour la protéine recherchée ;*
- *l'utilisation d'une cellule hôte, chargée d'exécuter les instructions fournies par le gène d'intérêt qui lui est inséré, dans l'objectif de synthétiser la protéine recherchée ;*
- *une phase de production proprement dite permettant de fabriquer les volumes de protéines souhaités ;*
- *enfin, une séparation et extraction de la protéine du milieu de culture, suivie par une purification de celle-ci.*

Au sens restreint, un système de production de protéines recombinantes est caractérisé par un couple constitué d'un vecteur d'expression et d'un hôte (cellule ou organisme).

Techniques mises en oeuvre

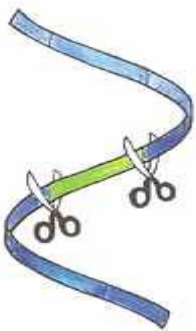
*Une vaste gamme de systèmes de production de protéines recombinantes -c'est-à-dire, au sens restreint, de couples vecteurs-hôtes- est aujourd'hui disponible, chacun d'eux présentant des avantages et des inconvénients. Les hôtes les plus utilisés à l'heure actuelle sont incontestablement la bactérie *Escherichia coli*, la levure *Saccharomyces cerevisiae* et les cellules CHO extraites des ovaires de hamster.*



Remarque

Dans E. Coli, la B-galactosidase est l'enzyme qui commande la transcription des gènes. Pour faire les bactéries produire l'insuline, le gène d'insuline doit être attaché à cette enzyme.

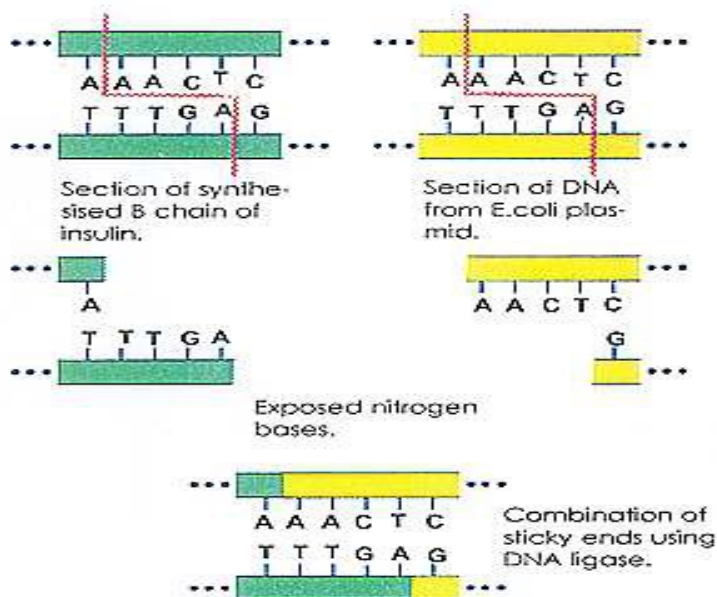
À l'intérieur de la boîte à outils du matériel génétique.



Enzymes de restriction, naturellement produites par les bactéries, agissent comme les scalpels biologiques, seulement identifiant des bouts droits particuliers des nucléotides, tels que celui codant pour l'insuline

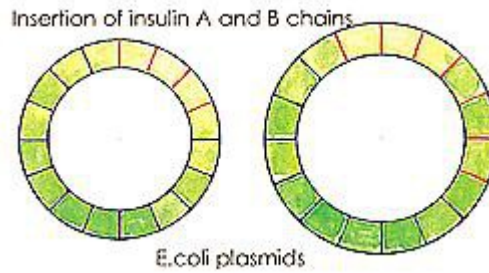
Un regard analogue aux enzymes de restriction.

Ceci permet pour diviser certaines paires de base d'azote et pour enlever la section de l'ADN de codage d'insuline d'un chromosome de l'organisation de sorte qu'il puisse fabriquer l'insuline. La ligase d'ADN est une enzyme qui sert de colle génétique, soudant les extrémités collantes des nucléotides exposés ensemble.



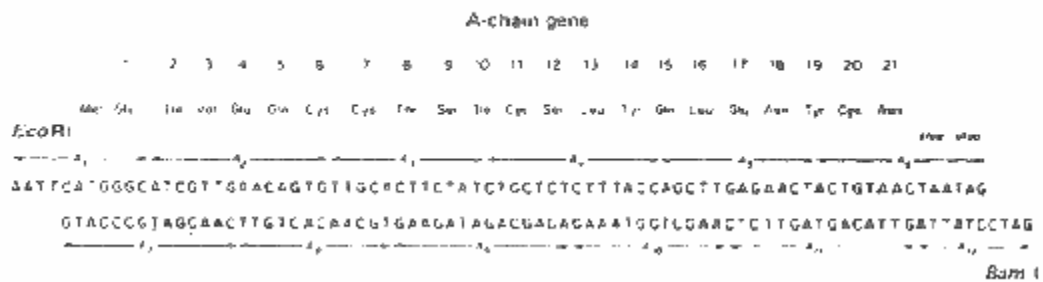
- Production d'insuline -

ADN de recombinaison.



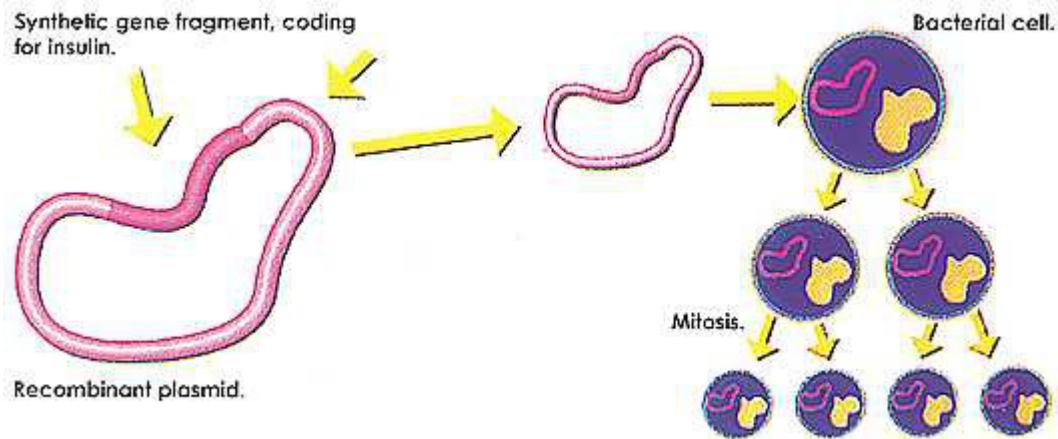
Fabrication d'insuline

La première étape est de synthétiser chimiquement les chaînes d'ADN qui portent les ordres spécifiques de nucléotide des chaînes polypeptide d'insuline A et B.



Structure humaine d'insuline

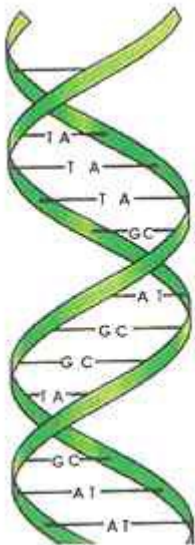
- Production d'insuline -



Le processus de la mitose.

Les plasmides de recombinaison sont alors présentés dans des cellules d'E. coli. L'utilisation pratique de la technologie de recombinaison de l'ADN Dans la synthèse de l'insuline humaine exige des millions de copies des bactéries dont le plasmide a été combiné avec le gène d'insuline afin de rapporter l'insuline. Le gène d'insuline est exprimé en tant que lui replié avec de la B-galactosidase dans la cellule subissant la mitose.

À l'intérieur de la double spirale.

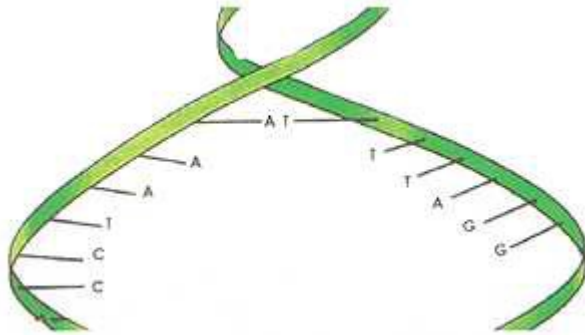


Le code génétique pour l'insuline est trouvé dans l'ADN au dessus du bras court de l'onzième chromosome. Il contient 153 bases azotées (63 dans la chaîne A et 90 dans la chaîne B). L'ADN qui compose le chromosome, se compose de deux longues spirales entrelacées, construites d'une chaîne de nucléotides, chacune est composée d'un sucre désoxyribose, d'un phosphate et de la base azotée. Il y a quatre bases différentes, adénine, thymine, cytosine et guanine la synthèse d'insuline est déterminée par l'ordre dans lequel ces bases sont répétées.

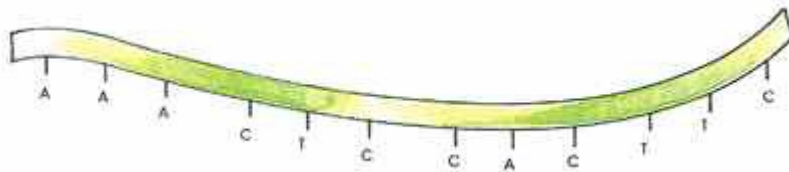
Brin d'ADN avec l'ordre spécifique de nucléotide pour la source de la chaîne B. d'insuline

Synthèse du code génétique d'insuline.

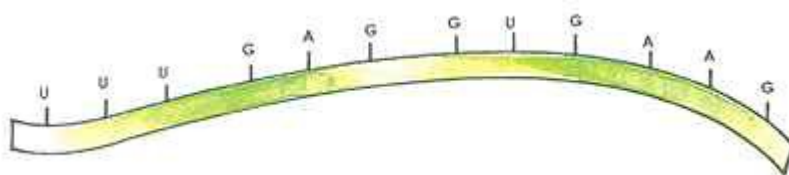
La double rive de l'onzième chromosome de l'ADN se divise en deux, exposant les bases dépareillées d'azote qui sont spécifiques à la production d'insuline.



Employer une des rives exposées d'ADN comme calibre, formes d'ARN de messenger en cours de transcription



Une rive simple du codage d'ADN pour la source de la chaîne B.

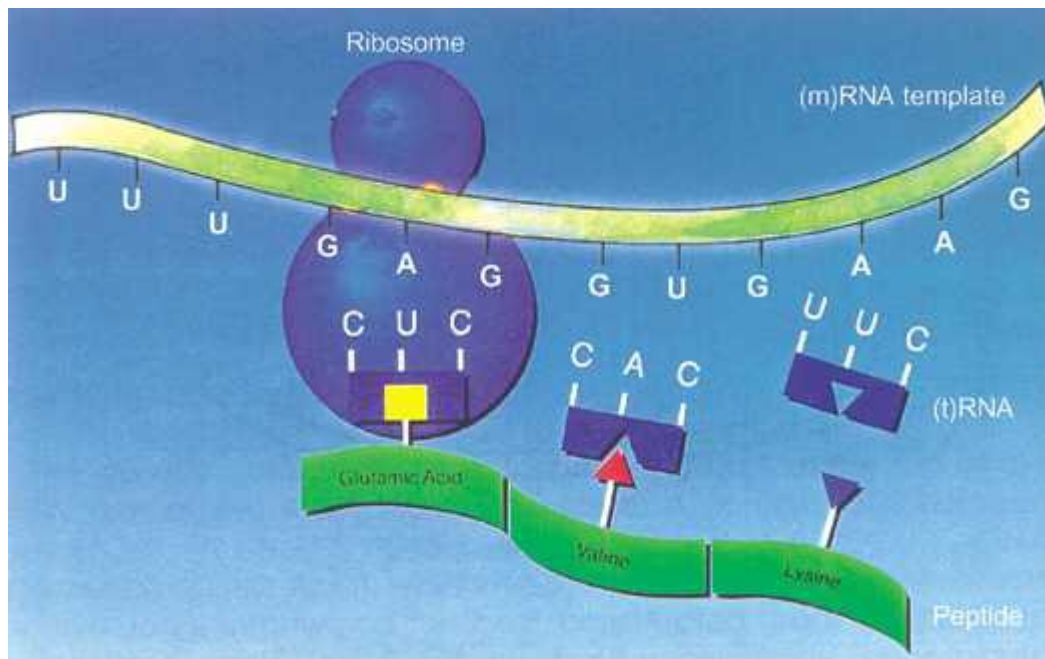


7

La rive d'ARN_{im}.

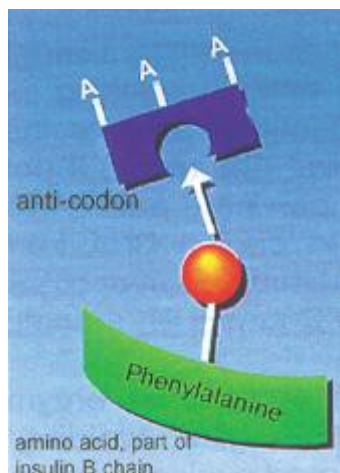
Le rôle de la rive de ARNm , sur laquelle le thymine de base d'azote est remplacé par l'uracile, est de diffuser l'information génétique, de ce type concernant l'insuline, du noyau dans le cytoplasme, où il s'attache à un ribosome.

- Production d'insuline -



Processus de traduction au ribosome

Les bases d'azote sur le ARNm sont groupées dans des threes, connus sous le nom de codons, trois bases dépareillées d'azote sur la Molécules d'ARN de transfert (ARNt) liées à un acide aminé spécifique, collectivement connu sous le nom d'une paire d'anti-codon avec les bases complémentaires (les codons) sur le ARNm.



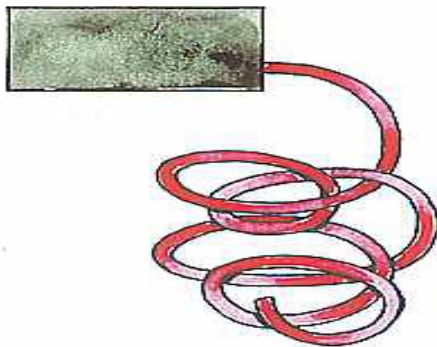
La lecture du ARNm par le ARNt au ribosome est connue comme traduction. Une chaîne spécifique des acides aminés est constituée par le ARNt après le code déterminé par le ARNm. L'ordre bas du RNAm a été traduit en ordre d'acide aminé qui lient ensemble pour former les protéines spécifiques telles que l'insuline.

Dans *E. coli*, la B-galactosidase est l'enzyme qui commande la transcription des gènes. Pour faire les bactéries produire l'insuline, le gène d'insuline doit être attaché à cette enzyme.

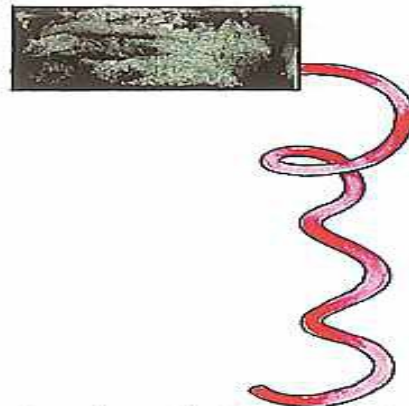
L'ordre exigé d'ADN peut être déterminé parce que les compositions en acides aminés des deux chaînes ont été dressées sur une carte. Soixante-trois nucléotides sont exigés pour synthétiser la chaîne A et quatre-vingt-dix pour la chaîne B, plus un codon à la fin de chacune des chaînes, signalant l'arrêt de la synthèse de protéine. Un anti-codon, incorporant l'acide aminé, méthionine, est alors placé au début de chaque chaîne qui permet le déplacement de la protéine d'insuline des acides aminés des cellules bactériennes.

Extraction et purification de l'insuline

La protéine à la laquelle est formé, consiste en partie en B-galactosidase, jointif à la chaîne A ou B de l'insuline. Les chaînes A et B sont alors extraites à partir du fragment de B-galactosidase et purifiées.

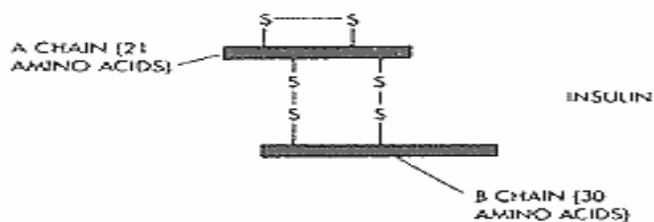


β - gal protein fused with A chain insulin protein.



β - gal protein fused with B chain insulin protein.

Les deux chaînes sont mélangées et rebranchées dans une réaction qui forme les ponts croisés du bisulfure, ayant pour résultat une insuline humaine synthétique et pure.



Molécule humaine d'insuline.

Implications biologiques d'insuline humaine de recombinaison génétiquement machinée.

L'insuline humaine est la seule protéine animale avoir été fait dans les bactéries de telle manière que sa structure soit absolument identique à celle de la molécule normale. Ceci réduit la possibilité de complications résultant de la production d'anticorps. Dans des études chimiques et pharmacologiques, l'insuline humaine de recombinaison disponible dans le commerce d'ADN a prouvé sa ressemblance à l'insuline humaine pancréatique.

Au commencement la difficulté principale rencontrée était la contamination du produit final par les cellules hôtes, augmentant le risque de contamination dans le bouillon de fermentation. Ce danger a été supprimé par l'introduction des processus de purification. Quand le produit final d'insuline est soumis à une batterie des essais, y compris les techniques d'analyse radio-immuno les plus fines, aucunes impuretés ne peuvent être détectées. Le procédé entier est maintenant exécuté en utilisant des cellules de levure comme milieu de croissance, car ils sécrètent une molécule humaine presque complète d'insuline avec la structure tridimensionnelle parfaite. Ceci réduit au minimum le besoin de procédures complexes et coûteuses de purification.

Comparaison entre *E. Coli* et *Saccharomyces cerevisiae*

* ***E. coli*** : elle fut et reste encore le premier hôte utilisé pour la fabrication de protéines recombinantes.

- *exemples de protéines recombinantes produites : hormone de croissance humaine, insuline, chymosine, interféron-, interleukine.*
- ***principaux avantages** : sa génétique est très bien connue. De nombreux vecteurs plasmidiques ont été construits et sont donc disponibles afin d'insérer et d'exprimer un gène étranger au sein de la bactérie. Elle est par ailleurs facile à utiliser, se prête très bien à la culture de masse en fermenteur. Enfin, les taux d'expression obtenus sont élevés, c'est-à-dire qu'elle permet de produire des quantités appréciables de protéines (jusqu'à plusieurs grammes par litre).*
- ***principaux inconvénients** : sécrétant mal les protéines, il est souvent nécessaire de "casser" la bactérie afin de récupérer la protéine (ce qui induit des problèmes de purification, ou de solubilisation et de renaturation..., quelquefois au détriment des rendements). Autre inconvénient majeur : *E. coli* n'effectue pas les modifications post-traductionnelles des protéines (en particulier la glycosylation, la carboxylation, etc.), qui constituent souvent une condition sine qua non d'activité de la protéine. Enfin *E. coli* étant une entérobactérie, il est donc nécessaire de s'assurer de l'absence d'endotoxines dans les protéines purifiées.*

* ***Saccharomyces cerevisiae*** : il s'agit de la levure de boulanger, utilisée depuis des millénaires dans l'alimentation humaine.

- *exemples de protéines recombinantes produites : antigène de surface du virus de l'hépatite B, insuline, hirudine...*
- ***principaux avantages** : son matériel génétique est simple et elle ne présente aucune toxicité. Bons vecteurs d'expression disponibles aujourd'hui. Les taux d'expression des protéines sont relativement bons (de l'ordre de la centaine de milligrammes par litre). La levure est capable de fabriquer des protéines complexes et de réaliser des modifications post-traductionnelles (glycosylations simples, carboxylations, acylations...).*

- *principaux inconvénients* : les protéines synthétisées sont souvent obtenues à l'intérieur du cytoplasme et nécessitent de casser la cellule afin de les récupérer. La sécrétion est possible, mais en général au détriment des rendements : elle fonctionne bien pour des petits polypeptides tels que l'insuline, mais beaucoup moins bien pour de grandes protéines.

Les Traitements actuels du diabète de type 1, par génie génétique

Aujourd'hui, suite à la découverte du gène codant l'insuline, nous pouvons fabriquer cette hormone en quantité illimitée à l'aide du génie génétique. Le principe est le suivant :

Tout d'abord, il faut extraire l'ADN de cellules humaines saines.

Ensuite, il s'agit de le dupliquer grâce à l'enzyme de la polymérase (dont c'est le principe même), afin d'avoir du matériel sur lequel travailler.

Par la suite, le gène codant l'insuline est prélevé sur l'ADN au moyen d'une enzyme de restriction spécifique.

Puis, à l'aide d'enzymes, ce gène est minutieusement intégré à un plasmide (fragment d'ADN circulaire que l'on trouve dans une bactérie, isolé du reste du génome, donc plus facilement prélevable).

Ce plasmide, une fois modifié, est réintroduit dans la bactérie.

Désormais, celle-ci produit donc de l'insuline, puisqu'elle " lit " le gène la codant.

De plus, en se reproduisant, la bactérie " copie " aussi le gène inséré.

Ainsi, la souche s'agrandit, produisant un nombre toujours plus grand d'insuline.

Les bactéries sont ensuite détruites afin de ne conserver que l'insuline, désormais susceptible d'être administrée aux malades.

Les avantages de cette technique sont multiples...

Tout d'abord, le travail est plus simple : après avoir inséré le gène codant l'insuline à l'intérieur de la bactérie, la souche pourra produire une grande quantité de l'hormone désirée. En effet, les bactéries se reproduisent à une vitesse fulgurante, et les hommes maîtrisent bien ce genre de " culture ".

De plus, aucuns risques de rejet n'est à envisager, puisque le gène codant l'insuline est d'origine humaine. (cf. annexe 7)

Conclusion

L'insuline aujourd'hui

Actuellement, l'administration de l'insuline se fait par piqûre, mais la recherche en vue de l'administration par voie buccale avance grâce à l'utilisation des liposomes. Les liposomes sont des petites sphères formées de couches concentriques superposées en alternance de couches lipidiques et aqueuses des liposomes, on peut insérer une substance soluble comme l'insuline. L'insuline qui se trouve à l'intérieur du liposome est protégée contre la décomposition des enzymes au niveau du système digestif.

L'utilisation de l'insuline par voie nasale avec et semble donner de bons résultats chez le singe. Les recherches de l'administration par voie rectale donnent également de bons résultats.

Source

- www.littletree.com
- www.cat.inist.fr
- www.unil.ch/gybn/Matieres/biol/G-genetic.html
- www.cath.ch/dossier/gene/gen4.html
- www.tecfa.unige.ch/~lombardf/divers/supprime.html
- www.diabetes.ca/franc/vivre/latra.htm
- Labat@esil.univ-mrs.fr