

Production des biomolécules dans les organismes transgéniques

Organismes transgéniques

- **Définition :**
- Un organisme transgénique (appelé aussi un organisme génétiquement modifié ou OGM) est un organisme vivant dont le patrimoine génétique a été modifié par l'intervention humaine.
- La **transgenèse** est le fait d'incorporer un ou plusieurs gènes dans le génome d'un organisme vivant. Ce **transgène** pourra être exprimé dans l'organisme transformé.

Organismes transgéniques

- Les organismes transgéniques ou génétiquement modifiés, qu'il s'agisse de bactéries, de virus ou de champignons, servent à de nombreuses fins de recherche.
- Des plantes, des insectes, des poissons et des mammifères (y compris les humains) transgéniques ont été sélectionnés.
- Dans certains pays, des plantes transgéniques comme le maïs et le soja ont remplacé les souches sauvages en agriculture.

Plantes transgéniques

- Il existe trois raisons majeures de développer des plantes transgéniques:
- Premièrement, l'ajout d'un ou plusieurs gènes améliore souvent la valeur agricole, horticole ou ornementale d'une plante cible.
- Deuxièmement, les plantes transgéniques peuvent servir de bioréacteurs vivants pour la production à moindre coût de protéines ou de métabolites d'importance économique.
- Troisièmement, la transformation génétique des plantes offre un puissant moyen d'étudier l'action des gènes au cours du développement et d'autres processus biologiques.

Plantes transgéniques

- La majorité des études initiales sur les plantes transgéniques se sont concentrées sur le développement de cultures offrant de meilleurs rendements notamment:
- Résistance aux insectes
 - Toxine insecticide *Bacillus thuringiensis*
 - Augmentation de l'expression de la protoxine *B. thuringiensis*,...
- Résistance aux virus
 - Protection médiée par la protéine d'enveloppe virale,.....;
- Résistance aux herbicides
 - Glyphosate,
- Résistance aux champignons et aux bactéries
 - Augmentation de la production de tréhalose
 - Séquestration des ions sodium,.....
- Phytoremédiation
 - Fruits et fleurs,.....

Plantes transgéniques

- Modification de la teneur nutritionnelle des plantes
 - Acides aminés
 - Lipides
 - Vitamines,.....
- Modification du goût et de l'apparence des plantes alimentaires
 - Prévention de la décoloration,...
- Les plantes comme bioréacteurs
 - Anticorps
 - Produits pharmaceutiques et vaccins,.....
- Rendement des plantes
 - Augmentation du rendement céréalier,.....

Quelques exemples de plantes transgéniques disponibles dans le commerce

Plante	Caractère transgénique
Pomme	Non brunissante
Haricot	Résistance aux virus
Coton	Tolérance aux herbicides, résistance aux insectes,
Aubergine	Résistance aux insectes
Maïs	Tolérance aux herbicides, résistance aux insectes
Melon	Maturation retardée, résistance aux virus
Papaya	Résistance aux virus
Ananas	Maturation retardée, couleur du fruit modifiée
Prune	Résistance aux virus
Pomme de terre	Résistance aux virus, tolérance aux herbicides, résistance aux insectes, résistance aux maladies fongiques,
Riz	Tolérance aux herbicides, résistance aux insectes, biofortifié en provitamine A
Rose	Couleur de fleur modifiée
Soja	Tolérance aux herbicides, résistance aux insectes, tolérance au stress abiotique, teneur en huile modifiée
Canne à sucre	Résistance aux insectes, tolérance à la sécheresse
Poivron doux	Résistance aux virus
Tomate	Résistance aux virus, résistance aux insectes, maturation retardée
Blé	Tolérance aux herbicides

Plantes transgéniques: Transformation des plantes

- Transformation avec le plasmide Ti d'*A. tumefaciens*:
- La bactérie du sol à Gram négatif *Agrobacterium tumefaciens* est un phytopathogène qui, au cours de son cycle biologique normal, transforme génétiquement les cellules végétales.
- Cette transformation génétique entraîne la formation de tumeurs du collet, qui perturbent la croissance normale d'une plante infectée.
- La formation de galles du collet est la conséquence du transfert, de l'intégration et de l'expression de gènes codés dans un segment spécifique de l'ADN plasmidique bactérien, appelé ADN-T (ADN transféré), dans le génome de la cellule végétale. L'ADN-T fait en réalité partie d'un gène tumorigène beaucoup plus vaste, présent chez la plupart des souches d'*A. tumefaciens*.

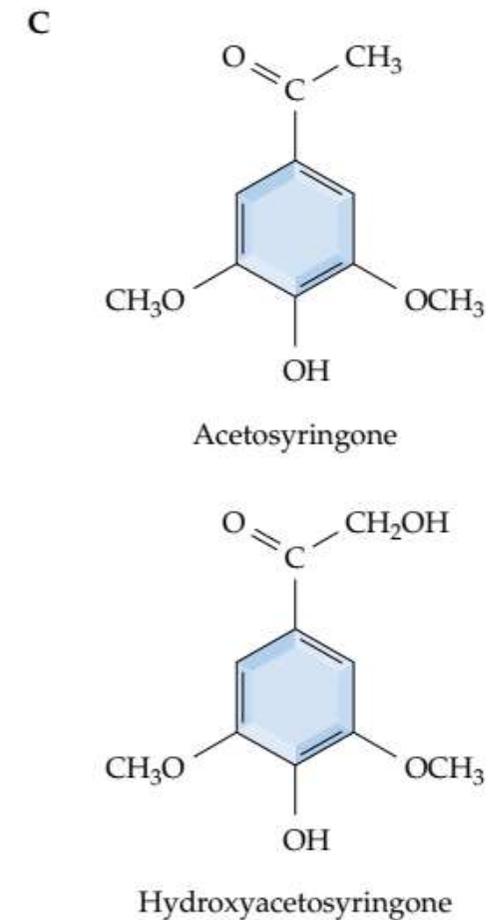
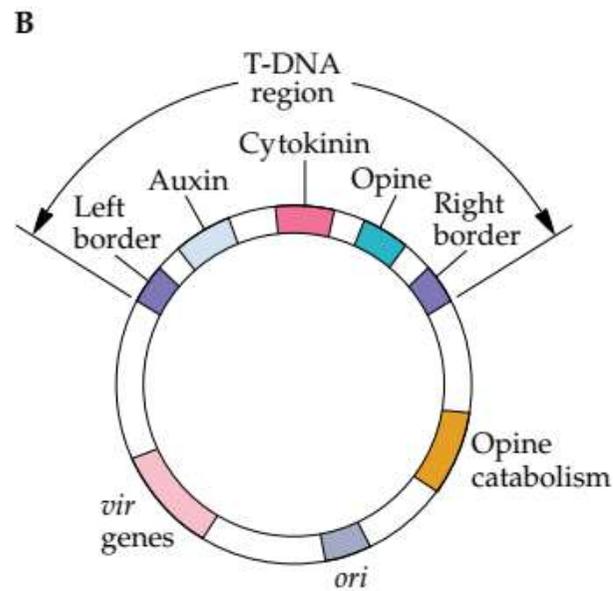
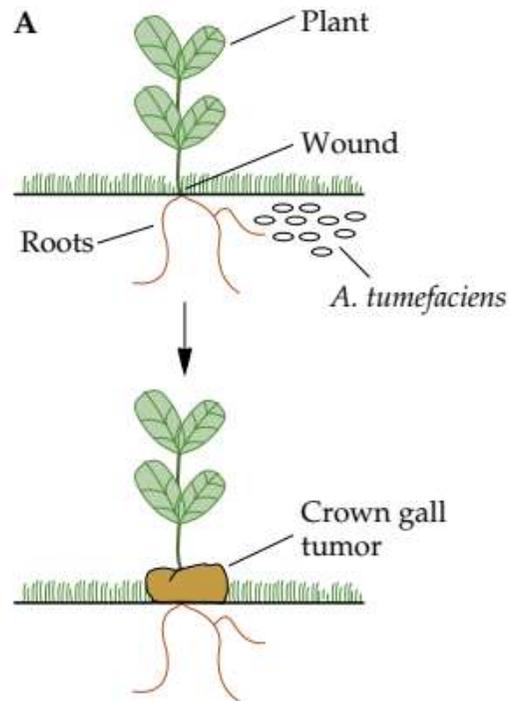
Plantes transgéniques: Transformation des plantes

- Transformation avec le plasmide Ti d'*A. tumefaciens*:
- Après la fixation initiale de la bactérie à une cellule végétale au niveau d'une plaie ouverte, *A. tumefaciens* réagit à certains composés phénoliques végétaux, tels que l'acétosyringone et l'hydroxyacétosyringone, excrétés par les plantes blessées sensibles.
- Ces composés de réponse aux plaies ressemblent à certains produits du métabolisme des phénylpropanoïdes, principale voie végétale de synthèse de métabolites secondaires, tels que les lignines et les flavonoïdes.
- Ces petites molécules (acétosyringone et hydroxysyringone) induisent les gènes de virulence (*vir*) portés par le plasmide Ti.

Plantes transgéniques: Transformation des plantes

- Transformation avec le plasmide Ti d'*A. tumefaciens*:
- Les produits des gènes vir sont essentiels au transfert et à l'intégration de la région ADN-T dans le génome d'une cellule végétale.

Plantes transgéniques: Transformation des plantes



D

Right 5'-TGNCAGGATATATNNNNNNGTNANN-3'

Left 5'-TGGCAGGATATATNNNNNTGTAAAN-3'

Plantes transgéniques: Transformation des plantes

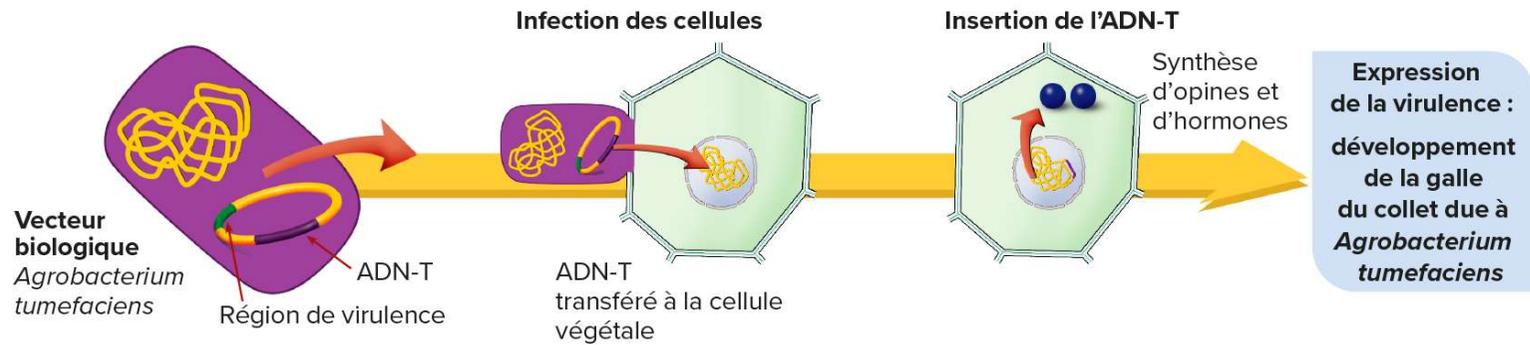
Processus de transformation végétale utilisant l'Agrobacterium comprend un certain nombre d'étapes :

- (a) l'isolation des gènes désirés de l'organisme source ;
- (b) l'élaboration d'une plateforme fonctionnelle transgénique incluant le gène cible, les promoteurs pour coder l'expression du caractère, la modification du codon, si nécessaire pour réussir à améliorer la production de protéine et les gènes marqueurs pour faciliter le traçage des gènes introduits dans la plante hôte ;
- (c) l'introduction du transgène dans le plasmide-Ti ;
- (d) l'introduction de l'ADN-T contenant le plasmide dans l'Agrobacterium;
- (e) le mélange du Agrobacterium avec les cellules de la plante afin de permettre le transfert de l'ADN-T dans les chromosomes de la plante ;
- (f) la régénération des cellules GM en plantes génétiquement modifiées (GM)
- (g) l'évaluation de la performance du caractère ou de l'expression du transgène aux niveaux du laboratoire, de la serre et du champ.

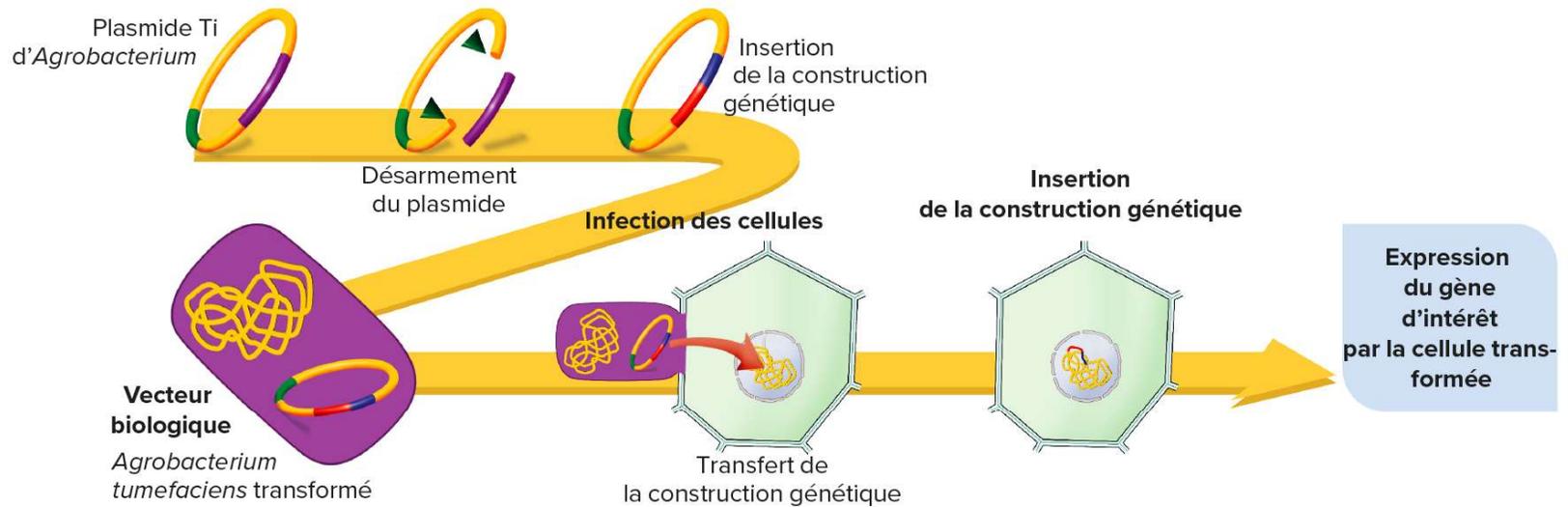


L'UTILISATION D'AGROBACTERIUM

Transfert naturel de l'ADN-T par *Agrobacterium tumefaciens*

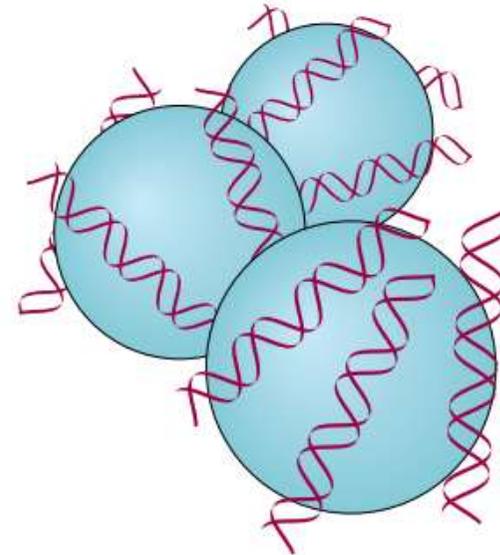
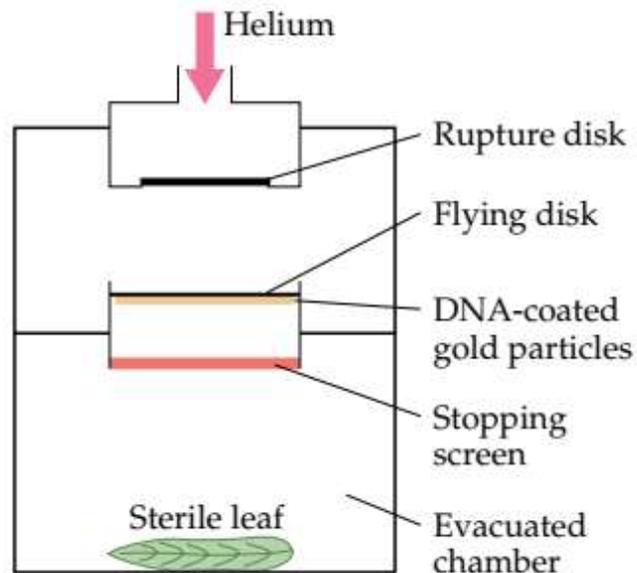


Transfert naturel de la construction génétique par *Agrobacterium tumefaciens*



Plantes transgéniques: Transformation des plantes

- Autres méthodes:
- Microprojectile Bombardment

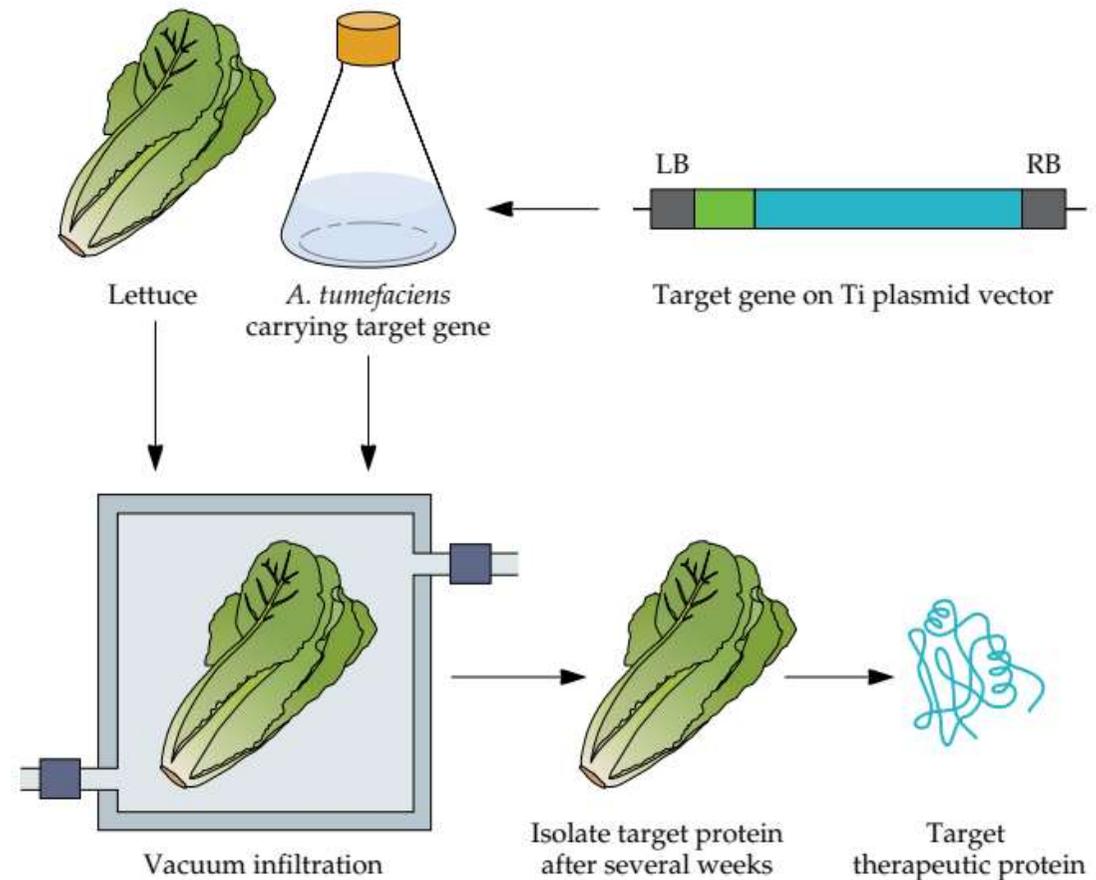


Plantes transgéniques: Les plantes comme bioréacteurs

- Les plantes sont relativement faciles à cultiver et peuvent générer une biomasse considérable.
- Contrairement aux bactéries recombinantes, cultivées dans de grands bioréacteurs, un procédé qui nécessite un personnel hautement qualifié et des équipements coûteux, les plantes peuvent être produites à un coût relativement faible par des travailleurs moins qualifiés.
- De plus, lorsque des protéines destinées à l'usage humain sont produites dans des plantes transgéniques, le risque de contamination par des virus de mammifères est considérablement réduit par rapport aux protéines produites dans des cellules animales cultivées.
- En fin de compte, le principal obstacle à surmonter dans la production de protéines recombinante dans les plantes est la purification du produit d'un transgène à partir de la masse de tissu végétal.

Plantes transgéniques: Les plantes comme bioréacteurs

- Transformation d'une laitue avec de l'ADN-T porteur d'ADN viral et d'un gène cible spécifique, à l'aide d'une souche d'*A. tumefaciens*. Après incubation et infiltration sous vide, la protéine cible peut être récoltée sur la laitue transitoirement transformée en une à plusieurs semaines. LB et RB, bordures gauche et droite, respectivement.



Plantes transgéniques: Les plantes comme bioréacteurs

- Comparaison de la production de protéines recombinantes dans les plantes et dans d'autres systèmes

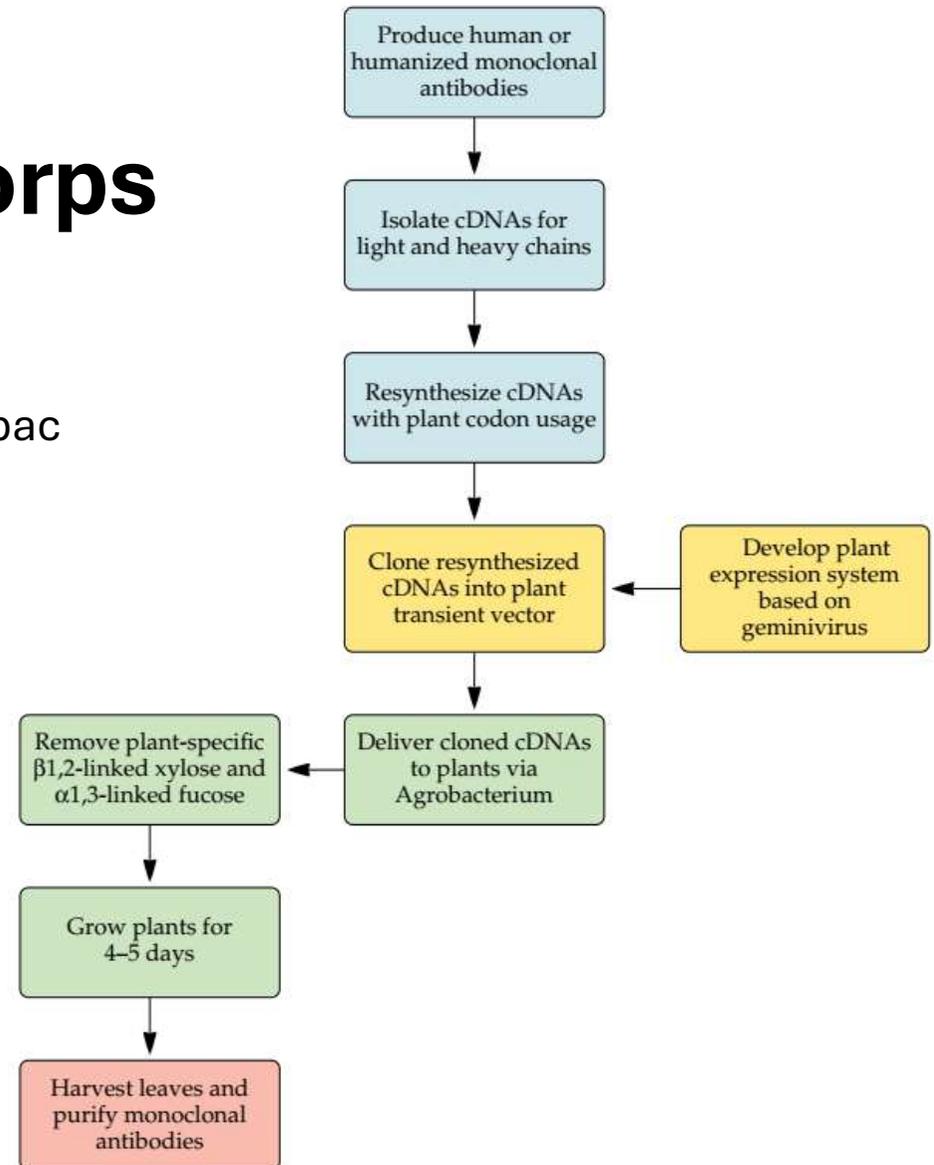
Parameter	Bacteria	Yeast	Mammalian cell culture	Transgenic plants
Glycosylation	None	Incorrect	Correct	Generally correct
Assembles multimeric proteins	Limited	Limited	Limited	Yes
Production costs	Medium	Medium	High	Low
Protein-folding accuracy	Low	Medium	High	High
Protein yield	High	High	Medium	Medium
Scale-up costs	High	High	High	Low
Time required	Low	Low	High	Medium
Skill level required for growth	Medium	Medium	High	Low

Certaines protéines pharmaceutiques produites dans les plantes

Pharmaceutical protein	Plant(s)	Application(s)
α -Tricosanthin	Tobacco	HIV therapy
Allergen-specific T-cell epitope	Rice	Pollinosis
Angiotensin-1-converting enzyme	Tobacco, tomato	Hypertension
Cyanovirin-N	Tobacco	HIV microbicide
Glucocerebrosidase	Tobacco	Gaucher disease
Human α 1-antitrypsin	Rice, tomato	Cystic fibrosis, liver disease, hemorrhage
Human apolipoprotein	Safflower	Plaque reduction
Human aprotinin	Corn	Trypsin inhibitor for transplantation surgery
Human enkephalins	<i>Arabidopsis</i> , canola	Antihyperanalgesic by opiate activity
Human epidermal growth factor	Tobacco	Wound repair, control of cell proliferation
Human erythropoietin	Tobacco	Anemia
Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	Tobacco	Neutropenia
Human growth hormone	Tobacco	Dwarfism, wound healing
Human hemoglobin	Tobacco	Blood substitute
Human hirudin	Canola, tobacco	Thrombin inhibitor, anticoagulant
Human homotrimeric collagen I	Tobacco	Collagen synthesis
Human insulin	Potato, <i>Arabidopsis</i> , safflower	Diabetes
Human α interferon	Rice, turnip	Hepatitis C and B
Human β interferon	Tobacco	Antiviral
Human interleukin-2 and interleukin-4	Tobacco	Immunotherapy
Human lactoferrin	Potato, rice	Antimicrobial, diarrhea
Human muscarinic cholinergic receptors	Tobacco	Central and peripheral nervous systems
Human placental alkaline phosphatase	Tobacco	Achondroplasia or cretinism in children
Human protein C	Tobacco	Anticoagulant
Human serum albumin	Tobacco	Liver cirrhosis, burns, surgery
Human somatotropin	Tobacco	Growth hormone
Lipase	Corn	Cystic fibrosis

Les plantes comme bioréacteurs : les Anticorps

Aperçu des étapes de production d'anticorps monoclonaux humanisés dans la plante de type tabac *Nicotiana benthamiana*.



Les plantes comme bioréacteurs : les Anticorps

- La production d'anticorps et de fragments d'anticorps dans les plantes transgéniques présente plusieurs avantages potentiels par rapport à leur synthèse dans des cellules microbiennes recombinantes.
- Par exemple, la transformation des plantes entraîne généralement une intégration stable de l'ADN étranger dans le génome végétal, tandis que la plupart des micro-organismes sont transformés par des plasmides qui peuvent être perdus lors d'une fermentation prolongée ou à grande échelle.

Les plantes comme bioréacteurs : les Anticorps

- De plus, la transformation et l'assemblage des protéines recombinantes chez les plantes sont similaires à ceux des cellules animales, tandis que les bactéries ne traitent, n'assemblent ni ne modifient post-traductionnellement les protéines eucaryotes.
- En outre, la culture à grande échelle des plantes est peu coûteuse et leur production n'est pas limitée par leur capacité de fermentation ; on estime qu'il en coûte environ 5 000 \$ par gramme pour produire des anticorps à partir de cellules d'hybridome en culture, 1 000 \$ par gramme pour produire des anticorps à partir de bactéries transgéniques et 10 à 100 \$ par gramme pour produire des anticorps à partir de plantes transgéniques.

Exemples d'anticorps et de fragments d'anticorps potentiellement thérapeutiques produits dans les plantes

Host plant	Disease or antigen
Tobacco	38C13 mouse B-cell lymphoma
Tobacco	Anthrax
Tobacco	B-cell lymphoma
Tobacco	Breast and colon cancer
Tobacco	Broad-spectrum anticancer
Tobacco	Botulism
Tobacco	CD40 (cell surface protein)
Tobacco	Cell surface protein from mouse B-cell lymphoma
Tobacco	Hepatitis
Soybean	Herpes simplex virus
Tobacco	Human carcinoembryonic antigen
Pea	Human cancer cell surface antigen
Tobacco	Human CD40 cell surface protein
Tobacco	Human creatine kinase
Alfalfa	Human IgG
Tobacco	Rabies
Tobacco	<i>Salmonella</i> surface antigen
Tobacco	<i>Streptococcus mutans</i> cell surface antigen SA I/II
Tobacco	Substance P (neuropeptide)

Certains antigènes vaccinaux potentiels qui ont été exprimés dans les plantes

Disease or causative agent	Plant(s) or vector
Hepatitis B	Tobacco, potato, yellow lupin, lettuce
Malaria	Virus
Rabies	Tomato, spinach, virus
Human rhinovirus	Virus
HIV	Virus
<i>E. coli</i>	Tobacco, potato, corn
Norwalk virus	Tobacco, potato, corn
Diabetes	Tobacco, potato, carrot
Foot-and-mouth disease	<i>Arabidopsis</i> , alfalfa
Cholera	Potato, rice
Human cytomegalovirus	Tobacco
Dental caries	Tobacco
Respiratory syncytial virus	Tomato
Human papillomavirus	Potato, tobacco
Anthrax	Tobacco
SARS ^b	Tomato, tobacco
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cowpea
Measles	Lettuce
Influenza virus	Tobacco
Tuberculosis	<i>Arabidopsis</i>
Rotavirus	Alfalfa

Animaux transgéniques

- En utilisant les méthodes d'élevage traditionnelles, de nombreuses générations d'accouplements sélectifs sont nécessaires pour améliorer génétiquement le bétail et les autres animaux domestiques en termes de caractéristiques telles que le rendement laitier, les caractéristiques de la laine, le taux de prise de poids et la fréquence de ponte des œufs.
- Cette combinaison d'accouplement et de sélection a été exceptionnellement efficace et, aujourd'hui, presque tous les aspects des bases biologiques de la production animale peuvent être attribués à ce processus.

Animaux transgéniques

- Cependant, cette approche est longue et coûteuse, et l'introduction de nouveaux caractères dans une lignée génétique établie nécessite un nouveau programme de croisements multigénérationnels avec des procédures de sélection rigoureuses pour garantir qu'une nouvelle lignée conserve ses attributs d'origine et que le nouveau caractère a été établi.
- Au début des années 1980, les progrès réalisés dans le développement de techniques de transfert de gènes dans l'ADN chromosomique de cellules animales (c'est-à-dire de transfection de cellules animales) ont conduit à la naissance du premier animal transgénique, une souris. Depuis, des animaux transgéniques ont été produits pour de nombreuses espèces de mammifères, d'oiseaux, d'amphibiens, de poissons et d'invertébrés.

Animaux transgéniques

- **Définition :**
- Le terme animal transgénique désigne un animal chez lequel il y a eu une modification délibérée du génome - le matériel responsable des caractéristiques héréditaires - par opposition à une mutation spontanée.
- Pour produire un animale transgénique la stratégie est simple. Un gène cible est introduit dans le noyau d'un embryon à un stade précoce, où il est intégré à un chromosome. Les embryons sont implantés chez une femelle réceptive lorsque le développement embryonnaire est impossible en dehors d'une femelle, comme c'est le cas chez les mammifères. Certains descendants issus de ces embryons porteront le gène cible dans toutes leurs cellules.

Animaux transgéniques: Méthodologies des animaux transgéniques

- Méthode de microinjection d'ADN
- Méthode des vecteurs rétroviraux
- Lipofection
- Electroporation
- Méthode des cellules souches embryonnaires modifiées
- Transfert de noyaux de cellules somatiques pour le bétail transgénique
- Modification génomique avec le système CRISPR-Cas
- Modification génétique conditionnelle avec le système de recombinaison Cre-loxP
- Contrôle de l'expression transgénique avec le système inductible par la tétracycline
- Inactivation génique par interférence ARN
-

Méthodologies des animaux transgéniques

- Microinjection d'ADN:
- La microinjection d'ADN est la méthode privilégiée pour la production de souris transgéniques.
- Les donneuses d'ovules femelles sont stimulées à superovuler afin d'augmenter le nombre d'ovules fécondés disponibles pour la microinjection.
- Les souris femelles reçoivent une première injection de gonadotrophine sérique de jument gestante, puis une autre injection, environ 48 heures plus tard, de gonadotrophine chorionique humaine.
- Une souris superovulée produit environ 35 ovules au lieu des 5 à 10 habituels.

Méthodologies des animaux transgéniques

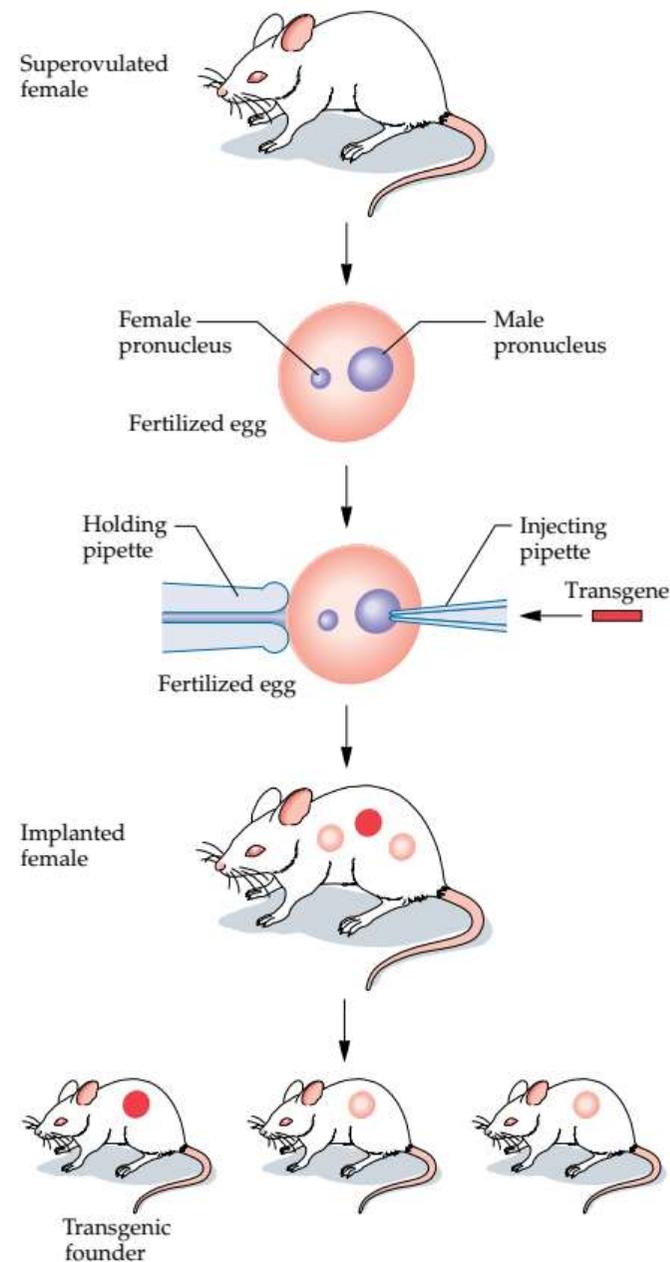
- Microinjection d'ADN:
- Chez les mammifères, après l'entrée du spermatozoïde dans l'ovule, le noyau spermatique (pronoyau mâle) et le noyau femelle sont des entités distinctes.
- Le noyau femelle achève sa division méiotique pour devenir un pronoyau femelle, puis la fusion des deux noyaux (caryogamie) a lieu.
- Avant la fusion nucléaire, le pronoyau mâle, généralement plus grand que le pronoyau femelle, peut être localisé à l'aide d'un microscope à dissection.
- L'ovule peut ensuite être manœuvré et maintenu en place par micromanipulation, tandis que l'ADN est microinjecté dans le pronoyau mâle.
- Certaines des molécules d'ADN injectées s'intégreront à un chromosome.

Méthodologies des animaux transgéniques

- Microinjection d'ADN:
- Après microinjection, 25 à 40 ovules sont implantés par microchirurgie dans une mère adoptive rendue pseudo-enceinte par accouplement avec un mâle vasectomisé.
- Chez la souris, la copulation est le seul moyen connu de préparer l'utérus à l'implantation. Dans ce cas, le mâle étant dépourvu de spermatozoïdes, aucun ovule de la mère adoptive n'est fécondé.
- La mère adoptive mettra au monde des petits issus des ovules microinjectés environ 3 semaines après l'implantation.

Méthodologies des animaux transgéniques

- Microinjection d'ADN:



Méthodologies des animaux transgéniques

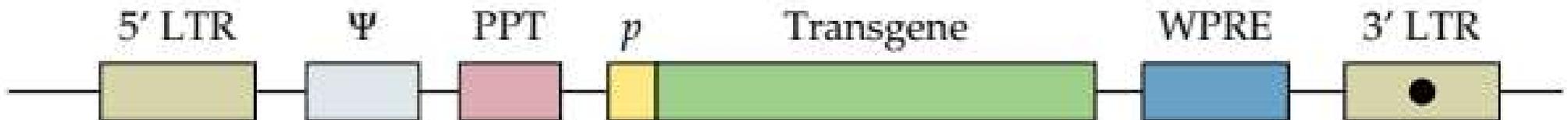
- Méthode des vecteurs rétroviraux :
- Les vecteurs rétroviraux exploitent la capacité des rétrovirus à délivrer et à intégrer un transgène dans le génome d'une cellule réceptrice.
- Les rétrovirus possèdent des génomes d'ARN qui servent de matrice à la transcriptase inverse pour synthétiser une copie d'ADN double brin linéaire pouvant être insérée dans un chromosome d'une cellule hôte infectée.
- Les embryons au stade de clivage, généralement au stade huit cellules, sont infectés par un rétrovirus défectueux porteur d'un transgène.

Méthodologies des animaux transgéniques

- Méthode des vecteurs rétroviraux :
- Les femelles implantées (mères adoptives) donnent naissance à des petits transgéniques.
- Des accouplements sont effectués pour déterminer quels petits possèdent le transgène dans leurs cellules germinales.
- Des lignées transgéniques peuvent être établies à partir de ces animaux transgéniques fondateurs.
- Cependant, le site d'intégration dans le génome de l'hôte est aléatoire et les transgènes introduits sur certains vecteurs rétroviraux sont inhibés dans les embryons.

Méthodologies des animaux transgéniques

- Le vecteur de transfert est introduit dans la lignée cellulaire d'emballage qui produit les protéines virales nécessaires à la production de l'ARN vecteur de transfert, y compris la séquence du transgène et les capsides dans lesquelles l'ARN vecteur est emballé.



Méthodologies des animaux transgéniques

- Les longues répétitions terminales (LTR) aux extrémités 5' et 3' du vecteur sont nécessaires à la production d'ARN lentiviral, et le signal packaging (Ψ) est nécessaire à l'emballage de l'ARN dans les particules virales.
- Après infection de cellules animales par un lentivirus, l'ARN lentiviral est rétrotranscrit et le transgène est intégré au génome de la cellule animale via des séquences des LTR. Une séquence du tractus polypurine (PPT) et un élément régulateur post-transcriptionnel woodchuck (WPRE) améliorent la transduction des cellules hôtes et augmentent l'expression du transgène dans les cellules animales.
- Un élément régulateur du LTR 3' est supprimé (indiqué par un point noir) afin d'empêcher la production d'ARN vecteur à partir d'un promoteur contenu dans le LTR après introduction dans les cellules hôtes. L'expression du transgène n'est pas affectée par la suppression, car il est exprimé à partir de son propre promoteur.

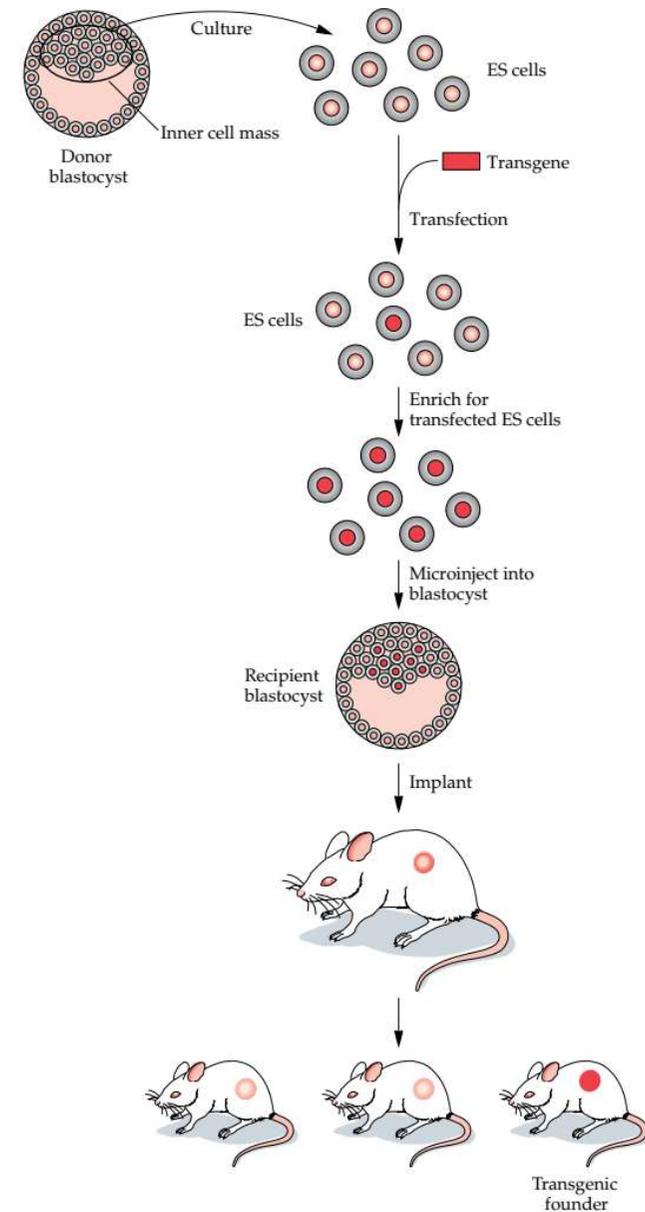


Méthodologies des animaux transgéniques

- Cellules souches embryonnaires modifiées :
- Les cellules du stade blastocyste précoce d'un embryon en développement peuvent proliférer en culture cellulaire tout en conservant la capacité de se différencier en tous les autres types cellulaires, y compris les cellules germinales, après leur réintroduction dans un autre embryon blastocyste.
- Ces cellules sont appelées cellules souches embryonnaires pluripotentes. Les cellules souches embryonnaires cultivées chez certains animaux, comme la souris, peuvent être facilement modifiées génétiquement sans altérer leur pluripotence.
- Après transfection de cellules souches embryonnaires in vitro avec un transgène (généralement par électroporation) conçu pour s'intégrer dans un emplacement chromosomique spécifique

Méthodologies des animaux transgéniques

- Cellules souches embryonnaires modifiées :
- **Un blastocyste est un embryon de 5/6 jours qui a une structure cellulaire complexe composée d'environ 200 cellules.**



Animaux transgéniques: Les animaux comme bioréacteurs

- Les glandes mammaires des animaux transgéniques constituent des bioréacteurs intéressants pour la production de protéines thérapeutiques humaines telles que des hormones, des facteurs de croissance et des enzymes.
- Un transgène codant pour la protéine cible est placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la glande mammaire et introduit dans des embryons unicellulaires par l'une des méthodes décrites précédemment.
- Les grandes quantités de protéines recombinantes produites par les glandes mammaires des animaux transgéniques sont généralement glycosylées de manière appropriée, ont des activités biologiques identiques à celles des sources humaines et peuvent être facilement purifiées à partir du lait.

Animaux transgéniques: Les animaux comme bioréacteurs

- Limiter la production aux glandes mammaires évite tout risque potentiel pour l'animal lié aux protéines biologiquement actives. Les animaux transgéniques sont élevés dans un environnement physiquement confiné afin qu'ils ne puissent pas transmettre le transgène à d'autres animaux ni entrer dans l'alimentation humaine ou animale.
- Plus de 100 protéines humaines différentes ont été produites dans le lait de brebis, de chèvres, de porcs et de lapins transgéniques.

Animaux transgéniques: Les animaux comme bioréacteurs

Protein	Transgenic animal	Application
Antithromobin	Goat	Prevent excessive blood clotting
C1 esterase inhibitor	Rabbit	Attenuate dysfunction of transplanted organs
α -Fetoprotein	Goat	Autoimmune disease
Butyrylcholinesterase	Goat	Organophosphate poisoning, Alzheimer's disease
Lactoferrin	Cow	Nutraceutical to prevent infectious disease
Growth hormone	Cow	Dwarfism
Factor VIIa	Rabbit	Hemophilia
Factor IX	Pig	Hemophilia
Fibrinogen	Rabbit, cow	Tissue sealant
α -1 Antitrypsin	Goat	Hereditary antitrypsin deficiency
Anti-CD20 monoclonal antibody	Goat	Cancer immunotherapy
Anti-CD137 monoclonal antibody	Goat	Cancer immunotherapy
Malaria merozoite surface protein	Goat	Vaccine for prevention of malaria
Rotavirus capsid proteins VP2/VP6	Rabbit	Vaccine for prevention of viral gastroenteritis

Animaux transgéniques: Les animaux comme bioréacteurs

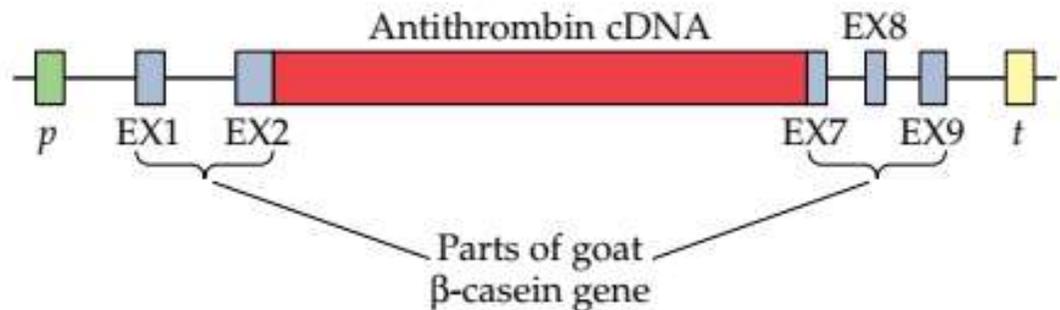
- L'un des principaux avantages de la production de protéines pharmaceutiques dans les glandes mammaires réside dans la facilité de collecte de lait en grandes quantités.
- Cela contribue à réduire le coût de production de protéines recombinantes à une fraction de celui de la production en cellules de mammifères en culture.
- Chaque vache laitière produit environ 10 000 litres de lait par an. Si 1 gramme de protéine recombinante est produit par litre de lait et qu'il peut être purifié avec une efficacité de 50 %, le rendement de 20 vaches transgéniques serait d'environ 100 kg par an.

Animaux transgéniques: Les animaux comme bioréacteurs

- **Exp:** Production d'**antithrombine** recombinante dans le lait de chèvre
- Pour produire de l'antithrombine chez les chèvres, l'ADNc de l'antithrombine humaine a été fusionné au promoteur du gène de la β -caséine de chèvre, puis la construction a été introduite dans des embryons par microinjection.
- Il est important de noter que l'antithrombine recombinante sécrétée dans le lait des chèvres transgéniques était structurellement similaire à la protéine humaine, à l'exception de quelques différences au niveau des oligosaccharides sur trois des quatre sites de glycosylation N-liée. Ces différences n'affectent pas l'activité inhibitrice de la thrombine de la protéine.
- Le lait de chèvre transgénique est une source importante d'antithrombine humaine, avec des rendements de 2 à 10 grammes par litre de lait. En culture cellulaire, des rendements de l'ordre de 0,2 à 1 gramme par litre de milieu de culture ont été atteints.

Animaux transgéniques: Les animaux comme bioréacteurs

- **Exp:** Production d'**antithrombine** recombinante dans le lait de chèvre
- L'ADNc complet de l'antithrombine humaine a été cloné entre l'exon 2 (EX2) et l'exon 7 (EX7) du gène de la β -caséine de chèvre. Les séquences promotrices (p), de terminaison de la transcription (t) et les exons 1, 8 et 9 (EX1, EX8 et EX9) du gène de la β -caséine sont conservées.

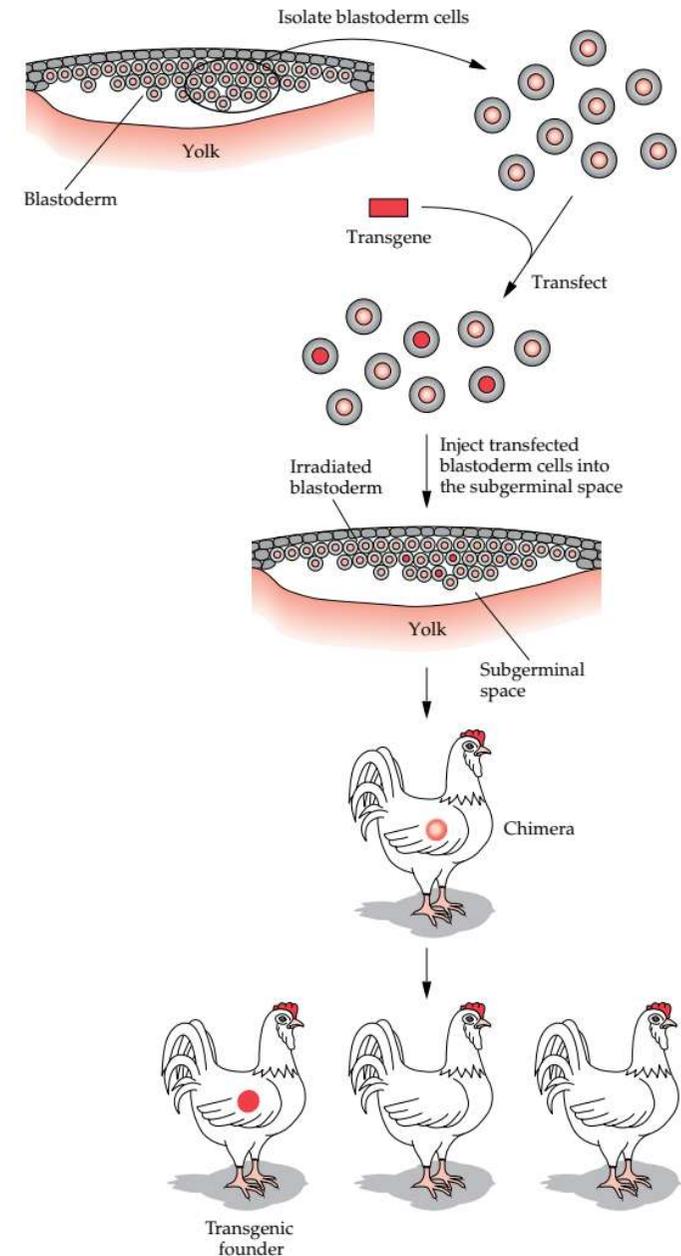


Animaux transgéniques: Les animaux comme bioréacteurs

- **Exp:** Production de protéines thérapeutiques dans les œufs de poule
- Les œufs de poule, libérés par la poule et riches en protéines, sont particulièrement adaptés à la production de protéines thérapeutiques recombinantes.
- L'expression d'un transgène dans les cellules de l'appareil reproducteur d'une poule pourrait entraîner l'accumulation d'une protéine dérivée du transgène, qui s'incruste dans la coquille.
- La protéine recombinante peut ensuite être extraite des œufs stériles. L'ovalbumine constitue plus de 50 % des protéines du blanc d'œuf ; par conséquent, l'expression d'un transgène sous le contrôle du promoteur et des éléments régulateurs de l'ovalbumine peut produire des niveaux élevés de protéines recombinantes.

Animaux transgéniques: Les animaux comme bioréacteurs

- **Exp:** Production de protéines thérapeutiques dans les œufs de poule
- Des rendements allant jusqu'à 1 gramme de protéine recombinante ont été obtenus par œuf et, sachant qu'une poule pond plus de 300 œufs par an, la productivité de ces bioréacteurs animaux pourrait être substantielle.



Comparaison des différents systèmes d'expression de protéines recombinantes

Systèmes de production	Cout de production	Cout d'extraction purification	Temps de production	Capacité de production	Qualité	Cout de stockage	Glycosylation	Risques de contaminations
Bactérie	Faible	Moyen	Court	Elevé, Centaines de mg/L	Médiocre	Modéré (-20°C)	Aucune	Endotoxines
Levures	Moyen	Faible	Moyen	Elevé, 200 mg/L	Moyenne	Modéré (-20°C)	Incorrecte	Risques faibles
Baculovirus/ Cellules d'insectes	Moyen	Faible	Court	Moyen, 10 à 100 mg/L	Bonne	Cher (N ₂)	Différences majeures	Risques faibles
Cellules de mammifères	Elevé	Faible	Long	Moyen, Qq dizaines mg/L	Très Bonne	Cher (N ₂)	Correct	Virus, prions et ADN oncogénique
Animaux transgéniques	Elevé	Elevé	Très long	Très élevé, Qq g/L	Très Bonne	Cher	Correcte	Virus, prions et ADN oncogénique
Cultures cellulaires végétales	Moyen	Faible	Moyen	Moyen	Bonne	Modéré	Différences mineures	Risques faibles
Plantes transgéniques	Très faible	Elevé	Long	Très élevé 600mg/kg Mat fraîche	Bonne	Peu cher (T°C ambiante)	Différences mineures	Risques faibles