

intérêt à coopérer avec de petites entreprises innovantes et à sous-traiter de plus en plus de travaux de recherche et de développement aux petites et moyennes entreprises de génie génétique.

En 1996, leur nombre a augmenté de 60 pour cent en Europe, pour atteindre 716. Simultanément, l'industrie pharmaceutique poursuit sa restructuration : fusions et absorptions de sociétés augmentent la concentration.

La production des protéines

Le génie génétique se développe depuis la découverte des enzymes de restriction, au début des années 1970. Ces ciseaux moléculaires coupent l'ADN en des séquences spécifiques, de sorte que l'on peut ensuite assembler divers fragments et construire de nouvelles combinaisons. Le premier ADN recombiné a été produit en 1973.

Le langage des gènes étant universel, on peut introduire du matériel génétique étranger dans des cellules ou dans des bactéries, ces dernières synthétisant alors la protéine codée par le gène inséré, comme s'il s'agissait d'un de leurs propres gènes (à condition que le gène introduit dispose des éléments de contrôle appropriés).

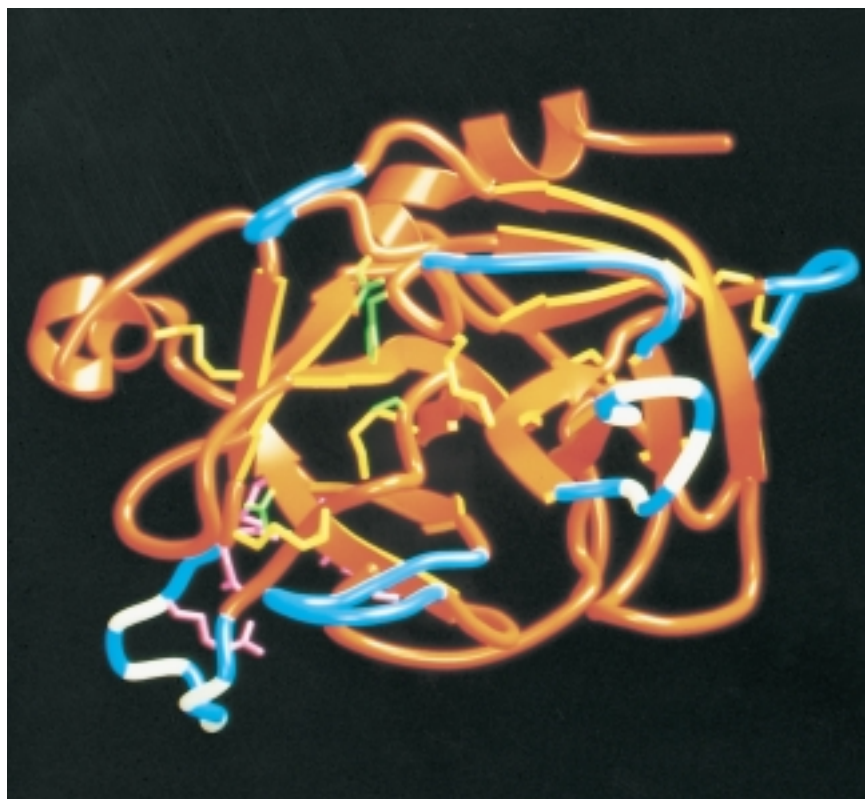
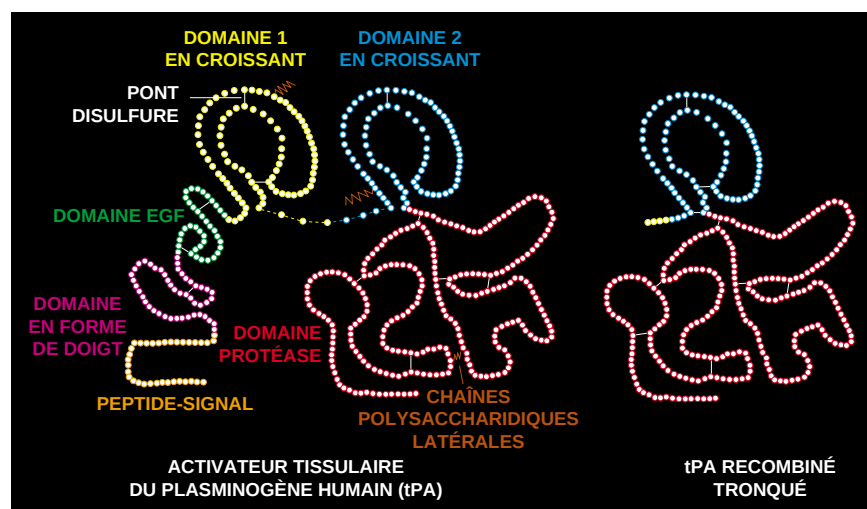
On favorise alors la multiplication des bactéries modifiées dans des fermenteurs où règnent des conditions optimales de culture. Quand la température, l'apport en oxygène et en éléments nutritifs sont appropriés, chaque cellule se divise toutes les 20 minutes, donnant un milliard de cellules en une demi-journée. Les bactéries peuvent contenir jusqu'à la moitié de leur propre poids en protéine étrangère.

Toutefois, de nombreuses protéines humaines ne sont actives qu'après avoir subi des modifications que les bactéries ne réalisent pas. La machinerie biochimique qui assure la maturation des protéines (la mise en forme qui les rend efficaces) diffère entre les bactéries et les cellules humaines. Ainsi, certaines glycoprotéines ne sont correctement produites que dans des cellules animales ou humaines en culture. Pour obtenir l'érythropoïétine, par exemple (voir l'encadré pages 76 et 77), on doit cultiver des cellules d'ovaires de hamster chinois. Les lignées de cellules utilisées sont stables, cultivées pendant des décennies (en

raison de mutations, elles se divisent indéfiniment).

Les cellules en suspension sont cultivées dans des cuves en acier inoxydable de plus de 1 000 litres. Le procédé ressemble au brassage de la bière, où

l'on cultive des levures de bière en présence d'une solution de sucre de malt. Toutefois, les cellules de hamster exigent beaucoup de substances nutritives : des acides aminés, des sucres, des vitamines et diverses hormones de



1. LE tPA RECOMBINÉ (ci-dessus et en haut à droite) est une protéine thérapeutique produite par génie génétique. Elle est utilisée pour la dissolution des caillots sanguins après un infarctus du myocarde. Elle est issue de l'activateur tissulaire du plasminogène humain (tPA) (en haut, à gauche). Cette molécule contient des domaines inutiles, voire indésirables. La souche bactérienne utilisée pour la production du tPA recombiné tronqué ne contient qu'un seul gène tPA, où les séquences d'ADN correspondant à ces domaines inutiles ont été supprimées. La protéine étant synthétisée par des bactéries, elle est dépourvue des chaînes polysaccharidiques latérales qui lui sont normalement ajoutées après sa synthèse ; ici, cette absence est plutôt favorable. Sur le modèle informatique, les acides aminés conférant l'activité catalytique sont en vert et ceux qui forment des ponts disulfure en jaune.

croissance. De surcroît, elles se divisent beaucoup plus lentement que les bactéries (une fois par 24 heures), de sorte qu'il faut une semaine pour produire un nombre suffisant de cellules. Les cellules de hamster sécrètent l'érythropoïétine dans le milieu de culture ; il reste alors à séparer cette substance des autres constituants du milieu par de fastidieuses étapes de purification.

Avec les bactéries, la récupération des protéines produites est simplifiée, car les souches industrielles fabriquent ces molécules en si grande quantité que leur métabolisme est perturbé ; elles s'en défendent en agglomérant les protéines en amas insolubles. Lorsque les bactéries en ont accumulé une quantité suffisante, on récolte ces micro-organismes par fil-

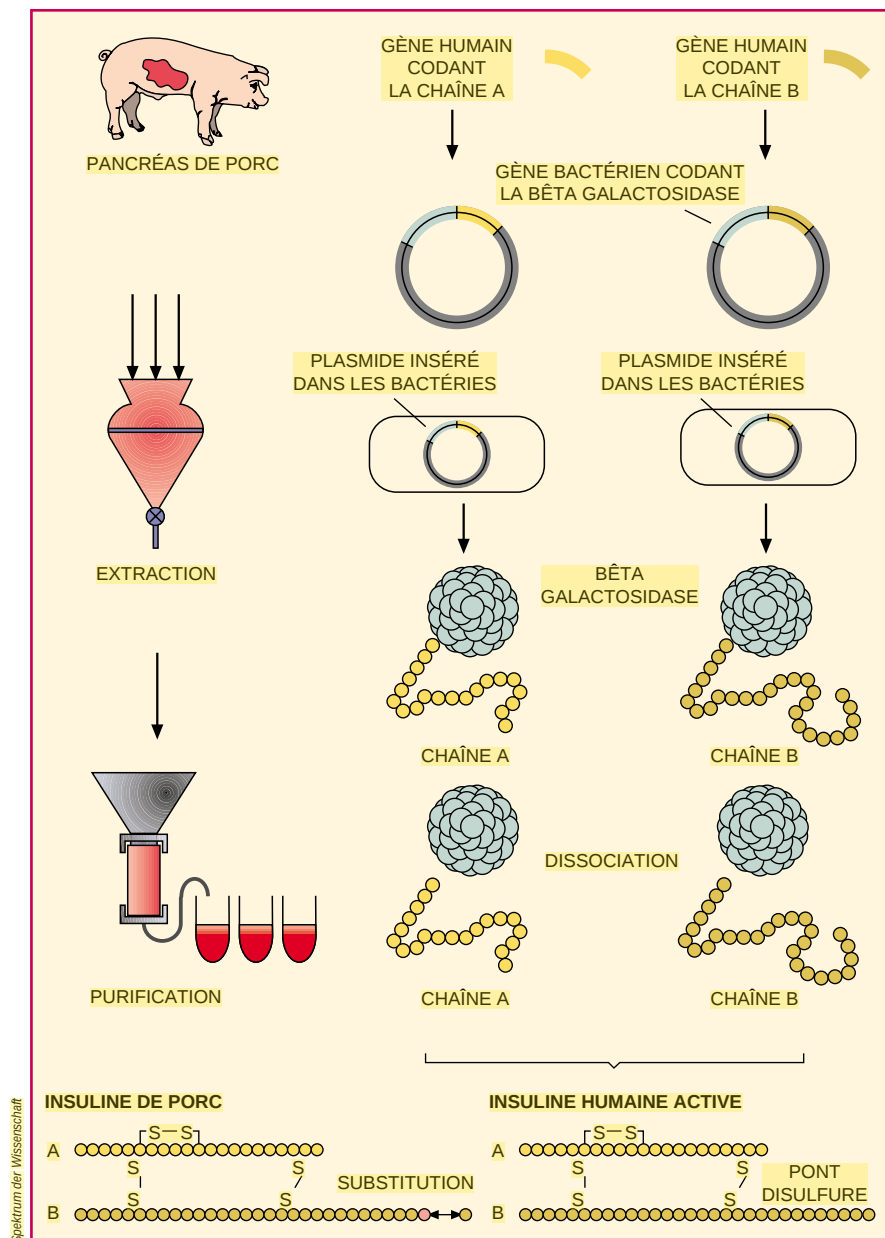
tration, on les dissocie et on récupère les protéines libérées dans la solution. La solubilisation des protéines agglomérées est réalisée à l'aide de quantités massives de chlorure de guanidinium, un sel qui dissocie et déplie les chaînes d'acides aminés ; en réduisant lentement sa concentration, on permet aux chaînes d'acides aminés d'adopter leur structure tridimensionnelle naturelle. Cette renaturation des protéines est longue et son rendement varie selon les protéines. Le procédé est coûteux et nécessite des conditions d'asepsie rigoureuses : une seule bactérie étrangère risquerait de contaminer toute la culture.

Des médicaments produits à la ferme

Les plantes et les animaux transgéniques sont une autre source de protéines thérapeutiques. Pour obtenir de tels organismes, on introduit des gènes humains dans des embryons femelles de chèvres, de porcs, de moutons ou de vaches, après les avoir couplés à un «commutateur génétique», afin que la protéine recherchée soit uniquement produite par les cellules mammaires et sécrétée dans le lait.

L'antitrypsine alpha, obtenue dans le lait de brebis, a été l'un des premiers exemples de ces médicaments «produits à la ferme» ; cette enzyme facilite la respiration des patients souffrant d'une forme d'emphysème pulmonaire. L'antitrypsine alpha extraite du sang de donneurs ne couvrait, jusqu'à présent, qu'un tiers des besoins et coûtait plus de 138 000 francs par patient. Un troupeau de 500 à 1 000 brebis transgéniques, qui produiraient chacune près de 30 grammes d'antitrypsine alpha par litre de lait, satisfait la demande mondiale.

Toutefois, les animaux transgéniques sont difficiles à obtenir par la technique classique de micro-injection de gènes dans les embryons. Par cette méthode, on injecte le gène thérapeutique dans un embryon au stade d'une cellule : ce gène ne s'insère pas nécessairement dans le génome, de sorte que toutes les cellules filles de la première cellule modifiée n'ont pas le gène intéressant. On obtient des animaux mosaïques, dont seules certaines cellules expriment le gène thérapeutique. La micro-injection de gènes dans un embryon est une méthode dont le ren-



2. EXTRACTION DE L'INSULINE de porc (à gauche) et production de l'hormone par génie génétique dans des bactéries (au centre et à droite). L'insuline de porc extraite du pancréas d'animaux d'abattoir ne diffère que par un seul acide aminé de l'hormone humaine ; une substitution catalysée par une enzyme la transforme en insuline humaine, mais la production est insuffisante. L'insuline humaine produite par génie génétique couvrira les besoins mondiaux toujours croissants, indépendamment de l'approvisionnement en insuline de porc. Dans cette méthode, les séquences codant les deux chaînes de l'insuline sont insérées à la suite du gène bactérien codant l'enzyme bêta galactosidase (à droite). Les bactéries transformées synthétisent l'enzyme prolongée de la chaîne A ou B d'insuline. On dissocie ensuite ces chaînes de la bêta galactosidase, on les purifie et on les rassemble.

dement est faible et le coût élevé, et qui donne des animaux mosaïques. Pour éviter ces inconvénients, on peut utiliser les techniques de clonage. Les biologistes cherchent à introduire le gène thérapeutique dans des cellules fœtales de plusieurs jours et sélectionnent celles qui l'ont effectivement intégré. Le noyau contenant le gène est alors introduit dans un ovocyte dont on a retiré le noyau : cette cellule modifiée – un embryon – est réimplantée dans une mère porteuse. Lorsque l'on a obtenu un animal transgénique intéressant, on peut à nouveau utiliser les méthodes de clonage pour le multiplier plus rapidement qu'en attendant l'accomplissement du cycle normal de la reproduction.

Une autre solution serait l'utilisation de plantes. En effet, le code génétique étant universel, la frontière entre le monde animal et le monde végétal est ténue. En collaboration avec la Société *Limagrain-Biosanté*, Claude Poyart, Michael Marden et leurs collègues de l'Unité INSERM U299, à l'Hôpital Bicêtre, ont réussi à introduire le gène de l'hémoglobine dans un plant de tabac. La plante a synthétisé les deux sous-unités de la molécule d'hémoglobine (la globine alpha et la globine bêta), qui se sont associées au groupe hème de la plante (cette structure chimique est la même dans le règne végétal et dans le règne animal). La molécule obtenue semble fonctionnelle, puisqu'elle fixe l'oxygène (c'est le transporteur naturel de l'oxygène dans le sang) et le monoxyde de carbone (ce gaz a une forte affinité pour l'hémoglobine et, quand il est inhalé, il se fixe sur l'hémoglobine qui ne transporte plus l'oxygène, ce qui entraîne la mort par asphyxie).

Toutefois la quantité d'hémoglobine synthétisée est infime, et la protéine n'est exprimée que dans les graines et dans les racines. Les biologistes recherchent d'autres plantes qui pourraient assurer cette synthèse avec de meilleurs rendements. Des études sont notamment en cours sur le maïs (les méthodes de récupération des protéines extraites des graines de maïs sont bien maîtrisées). La production à grande échelle d'une enzyme digestive est en cours de développement.

Deux sociétés américaines font, d'ores et déjà, produire à du maïs et à du soja, des vaccins, des anticorps monoclonaux et diverses protéines thérapeutiques. Aucune de ces molécules



Victor Colombo et François Gerber

3. LES PROTÉINES ÉTRANGÈRES synthétisées par des bactéries sont souvent stockées sous forme d'inclusions insolubles. Ces amas de protéines apparaissent sous forme de masses sombres sur cette photographie prise au microscope électronique ; elles représentent parfois jusqu'à la moitié du poids de la bactérie productrice. On isole ces protéines après avoir fait éclater les bactéries. Ensuite, on les déroule en ajoutant des sels dont on diminue progressivement la concentration, de façon à ce que les protéines adoptent leur conformation naturelle, biologiquement active.

produites par les plantes n'est encore commercialisée.

Quelles protéines fabriquer par génie génétique ? Au cours d'une évolution qui a duré des millions d'années, les protéines les mieux adaptées à chaque tâche biochimique ont été sélectionnées. Inversement, les modifications qui nuisaient à l'organisme ont été éliminées. C'est pourquoi on n'a pas non plus à craindre d'imprévisibles effets secondaires – toxiques, cancérogènes ou tératogènes – lorsque l'on apporte à l'organisme une protéine qu'il ne synthétise pas ou qu'il produit en quantité insuffisante. Le génie génétique produit des protéines dont la séquence en acides aminés est identique à celle des protéines naturelles.

Recopier la nature

L'érythropoïétine est une de ces protéines identiques aux protéines naturelles que l'on a appris à produire. Chez l'adulte, l'érythropoïétine synthétisée par le rein déclenche la différenciation en globules rouges des précurseurs des cellules sanguines présents dans la moelle osseuse. Les personnes qui ont une maladie rénale chronique ne fabriquent généralement plus cette hormone en quantité suffisante. Les dialyses épuisent le sang, opération normalement

assurée par les reins, mais elles ne compensent pas le manque d'érythropoïétine. Sans l'hormone, les globules rouges se raréfient, de sorte que les tissus sont mal oxygénés et que les personnes atteintes sont très fatiguées. Des transfusions sanguines régulières les soulagent, mais elles risquent de transmettre des agents pathogènes et de surcharger l'organisme en fer, dommageable pour le foie et pour le cœur.

En revanche, chez les patients à qui l'on administre de l'érythropoïétine recombinée, le nombre de globules rouges augmente rapidement, et leur état général s'améliore. Près de 30 à 50 pour cent des quelque 300 000 dialysés dans le monde sont traités avec l'érythropoïétine recombinée. Cet exemple montre que l'on peut traiter avec des protéines recombinées non seulement des maladies héréditaires, telle l'hémophilie, mais aussi des maladies acquises.

À côté de ces protéines identiques aux protéines naturelles, les biologistes espèrent bientôt produire des protéines thérapeutiques sur mesure. Ils ont appris à assembler différents gènes ou parties de gènes ; la molécule codée est une protéine de fusion (ou protéine hybride). On utilise cette technique pour combiner des anticorps monoclonaux, ou leurs sites de reconnais-