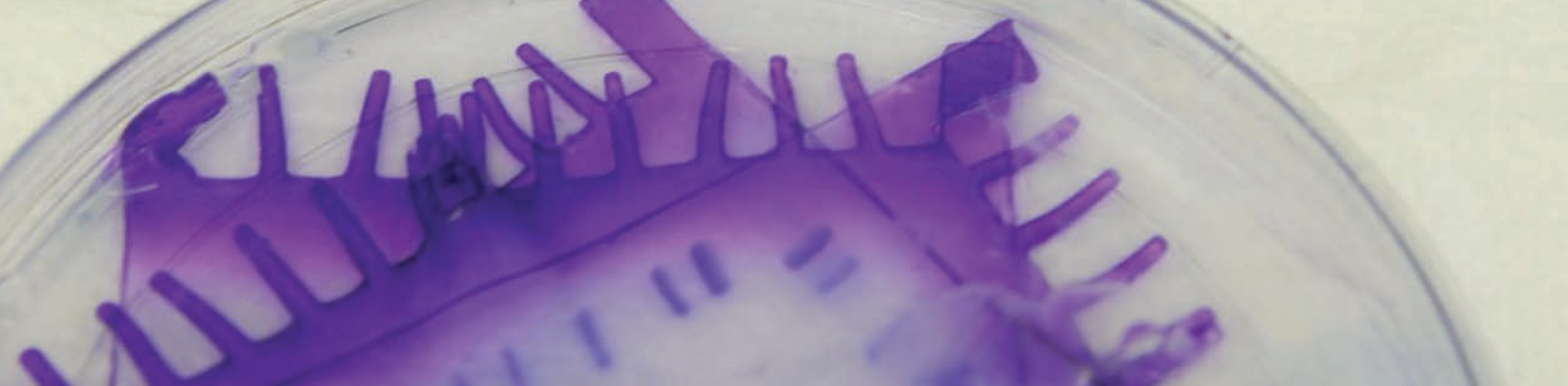


Amgen
A propos de la biotechnologie





A propos de la biotechnologie

La biotechnologie a permis de découvrir et de développer une nouvelle génération de médicaments à usage humain. Grâce aux progrès réalisés dans le domaine de la biologie cellulaire et de la biologie moléculaire, les scientifiques ont identifié et développé tout un éventail de nouvelles thérapies. Ces molécules qui ont des effets cliniques significatifs ont rendu possible la mise à disposition de nouvelles avancées thérapeutiques pour des pathologies encore sans traitement connus. Depuis ses débuts, la société Amgen s'est engagée à développer des produits, innovants qui améliorent la qualité de vie des patients.



Qu'est-ce que la biotechnologie?

La biotechnologie se définit comme un ensemble de techniques qui utilisent les ressources de la biologie ou des organismes vivants. Partant de cette définition, on peut donc affirmer que les êtres humains utilisent le procédé de la biotechnologie depuis des milliers d'années pour fabriquer tout ce qui leur est nécessaire : produits alimentaires, textiles, etc. Ainsi, de nombreux produits qui nous sont familiers - le pain au levain, les yaourts, les fromages, la bière, le vin, le vinaigre... - ont tous ce même point commun : ils sont fabriqués grâce à la culture de micro-organismes (fermentation).

Depuis le milieu du vingtième siècle, le terme « biotechnologie » désigne l'utilisation de la génétique et de toutes les techniques qui lui sont dérivées. Il s'agit désormais d'une définition commune à tout un champ d'applications, depuis la médecine jusqu'à l'agriculture.

Amgen produit des médicaments issus de molécules déjà naturellement produites par le corps humain. La biotechnologie désigne dans ce cas précis le procédé par lequel ces composants naturels sont reproduits dans des quantités suffisantes pour un usage thérapeutique.

Fabriqués de cette manière, ces composants sont donc théoriquement identiques à ceux naturellement « fabriqués » par le corps humain. Ce sont le plus souvent des protéines, et elles ont une activité physiologique très spécifique. A l'inverse, les médicaments traditionnels sont fabriqués à partir d'une synthèse chimique, et ont souvent un rôle moins spécifique.

Pour créer les protéines recombinantes, les scientifiques d'Amgen utilisent le plus souvent les techniques issues du génie génétique, et notamment celle de l'ADN recombinant. Ils utilisent des bactéries, des levures, des cellules d'origine animale, dans lesquelles ils sélectionnent et intègrent des gènes humains contenant l'information (code génétique) pour obtenir la protéine thérapeutique souhaitée. Après cette étape, ces cellules peuvent être mises en culture dans des fermenteurs où elles se reproduisent en grande quantité.

Lors de la fermentation, les organismes unicellulaires tels que les levures et les bactéries, prolifèrent en présence de sucre et d'amidon. Leur prolifération produit de l'alcool, du dioxyde de carbone et autre dérivés. (Les bulles dans la bière sont le résultat de ce procédé, tout comme les trous dans la mie de pain et dans certains fromages). Le procédé est le même pour ces médicaments. Durant la fermentation, les cellules génétiquement modifiées produisent la protéine humaine en grandes quantités. Selon la manière dont la cellule a été produite, cette protéine peut se trouver soit à l'intérieur de la cellule, soit dans le liquide de fermentation.

Le nom de « protéine recombinante » vient ainsi de ce procédé qui permet d'ajouter de la matière génétique à des cellules. Ce sont ces protéines recombinantes qui constituent la majeure partie des produits Amgen issus de la biotechnologie.

L'histoire de la biotechnologie

Au 19^{ème} siècle, les travaux de trois savants posent les bases de la biotechnologie moderne. Louis Pasteur et Robert Koch développent la bactériologie et les concepts de maladie microbienne, d'immunité et de vaccination. Johann Grégor Mendel décrit lui les lois qui régissent la transmission des caractères biologiques entre les générations (transmission qui obéit aux lois de l'hérédité).

La seconde moitié du 20^{ème} siècle connaît une véritable accélération de la connaissance du vivant grâce aux progrès de la science et aux avancées technologiques. En 1944, le microbiologiste américain Oswald Avery démontre que l'ADN est le support de l'hérédité : cet ADN devient la matière première de la génétique. En 1953, James Watson et Francis Crick poursuivent les travaux d'Avery : ils découvrent la structure de l'ADN, ce qui rend possible la manipulation directe des caractéristiques génétiques.

Les techniques d'insertion de gènes « étrangers » dans le patrimoine génétique des bactéries ont d'abord été développées dans les années 1970 par plusieurs laboratoires universitaires, notamment ceux de l'Université de Californie à San Francisco, l'Université de Stanford et l'Université de Harvard. Ces développements marquèrent une étape décisive dans la révolution de la biotechnologie.

Le premier produit issu de la biotechnologie moderne fut l'insuline recombinante, une protéine produite par le pancréas et utilisée par le corps pour réguler la concentration de glucose dans le sang. Les patients diabétiques ne pouvant plus produire leur propre insuline, ils devaient avoir recours à des injections d'insuline animale.

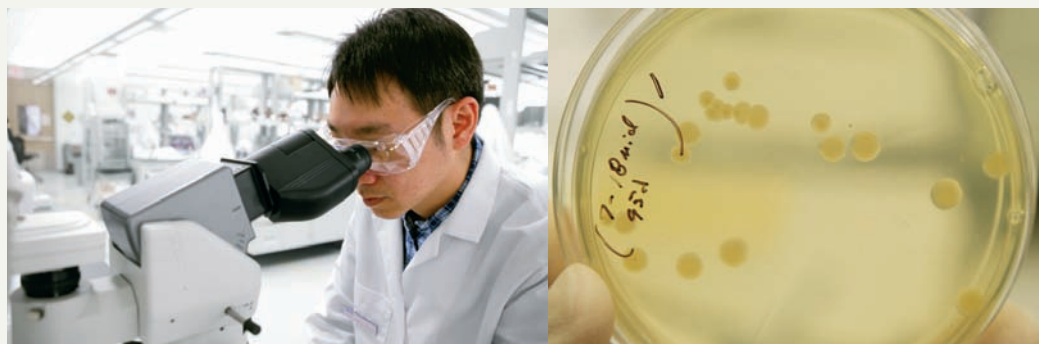
Au début des années 1920, l'insuline a tout d'abord été extraite de pancréas de vaches et de porcs. Cette insuline d'origine animale a prouvé son efficacité dans le traitement du diabète, et a, sous cette forme, été rapidement disponible pour les patients. Néanmoins, l'insuline animale n'étant pas totalement identique à l'insuline humaine, les médecins et les chercheurs se sentirent de plus en plus concernés par les effets de son utilisation à long-terme. D'autant plus que le nombre de patients diabétiques ne cessant d'augmenter dans le milieu des années 1970, se posait également le grave problème de l'extraction en quantité suffisante de cette insuline animale pour répondre aux besoins des patients.

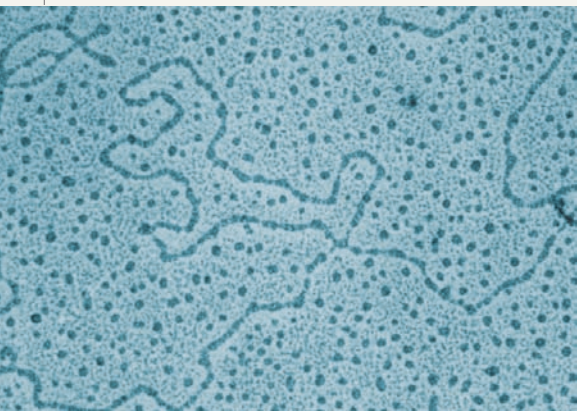
L'insuline devint alors la cible idéale d'un petit groupe de biochimistes et de biologistes moléculaires qui cherchaient à appliquer de nouvelles techniques de génie génétique pour soigner certaines pathologies.

En 1978, le gène de l'insuline humaine est transféré dans la bactérie *Escherichia coli*, dans le laboratoire d'Herbert Boyer à l'Université de Californie à San Francisco. L'insuline est une protéine, et, comme toutes les protéines, elle consiste en une chaîne constituée d'éléments appelés acides aminés. L'ordre des acides aminés dans une protéine n'est pas anodin ; au contraire, il est particulièrement spécifique à cette protéine. Lorsque la séquence des acides aminés est connue, la séquence correspondante de l'ADN peut être isolée et introduite dans les cellules bactériennes pour créer la protéine humaine.

Les différentes étapes de la production d'une protéine recombinante sont les suivantes : la partie de l'ADN étranger est tout d'abord insérée à l'intérieur du plasmide, petit fragment d'ADN bactérien en forme de cercle. Le nouveau plasmide « recombinant » transportant le gène humain est alors introduit à l'intérieur d'une autre cellule bactérienne. Une fois à l'intérieur de la cellule, le gène humain qui est sur le plasmide peut être lu par le système de fabrication des protéines de la cellule.

A cette époque, l'approche de Boyer et de ses collègues dans la synthèse du gène était inédite. Aujourd'hui elle est devenue commune et l'utilisation d'autres méthodes d'isolation directe ou indirecte d'ADN humain est très courante.





Qu'est ce qu'un Gène?

Les gènes sont composés d'ADN qui codent les informations nécessaires aux cellules pour fabriquer les protéines. Chez les êtres humains, cette relation apparaît sous la forme de caractéristiques héréditaires, telles que la couleur des yeux ou la couleur des cheveux. Dans les microorganismes tels que les bactéries et les levures, le patrimoine génétique apparaît généralement sous la forme de caractéristiques biochimiques, comme la capacité d'une cellule à proliférer avec un sucre et non avec un autre.

L'ADN de nombreux organismes, y compris celui des animaux, des levures, et des moisissures, se trouve à l'intérieur d'un noyau cellulaire. En groupes, ces organismes sont appelés eucaryotes, ce qui signifie « vrai noyau ». Dans les cellules eucaryotes, l'ADN peut aussi se présenter sous forme de structures plus grandes, appelées les chromosomes, et qui peuvent être, dans certain cas, vues au microscope lors de la division cellulaire. Certains chromosomes ont aussi une forme distincte ; c'est le cas du chromosome X par exemple.

Contrairement aux eucaryotes, les bactéries n'ont pas de noyau. De plus, le chromosome bactérien consiste en un unique grand cercle d'ADN, plutôt qu'en une superstructure distincte comme chez les organismes supérieurs. Du fait de leur manque de noyaux, les bactéries sont classées dans un groupe distinct appelé organismes procaryotes.

Chez tous les microorganismes, l'ensemble du matériel génétique s'appelle le génome.

Les chercheurs d'Amgen travaillent à partir de l'ADN, et s'intéressent plus particulièrement aux protéines, considérées comme les molécules-clés cellulaires car elles sont essentielles au bon fonctionnement du corps humain.

Les hormones jouent le rôle de messagers des cellules, tandis que le cytosquelette est formé de molécules structurales. Les Enzymes sont les médiateurs du métabolisme cellulaire, et les anticorps et lymphokines sont parmi les principaux composants de défenses immunitaires du corps.

Leur importance biologique fait des protéines un excellent candidat pour des médicaments lorsque l'on cherche à en restaurer ou à en augmenter leurs fonctions naturelles. Les gènes, sous forme d'ADN, sont la base de notre savoir pour créer des protéines d'intérêt.

La structure de l'ADN : au cœur de la biotechnologie

Comme nous l'avons vu précédemment, les protéines sont codées par les gènes. Les gènes, eux, sont composés d'Acide DésoxyriboNucléique, soit ADN. Le nom « Acide DésoxyriboNucléique » se réfère à la fois à la composition chimique de la molécule et au fait qu'elle réside à l'intérieur du noyau. L'extraordinaire singularité de l'ADN est sa capacité à coder tous les gènes nécessaires à l'expression de la biodiversité sur terre. La clé de cette capacité est liée à sa fameuse structure composée d'une « double hélice », décrite en 1953 par James Watson et Francis Crick.

Cette double hélice peut être comparée à une longue échelle spiralée dont les montants sont constitués de sucre et de groupes phosphates. Les barreaux sont composés de bases azotées. Une unité individuelle composée de séquences associant un sucre, un groupe phosphate, et une base azotée est appelée nucléotide. Les séquences de nucléotides, sont « accrochées » les unes aux autres par une liaison chimique.

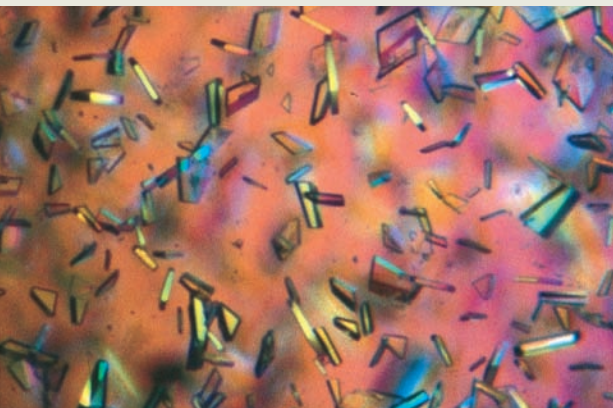
L'ADN ne contient que quatre bases azotées différentes : Adénine (A), Thymine (T), Guanine (G), et Cytosine (C). Ces quatre bases s'associent entre elle ; A avec T, et G avec C. Donc, en connaissant les séquences de bases sur un côté (brin) de l'ADN, les chercheurs peuvent en déduire la séquence sur l'autre brin en suivant cette règle d'appariement. C'est l'ordre, la séquence de ces « lettres », qui constituent l'information, comme le feraient les mots qui constituent un texte.

La première observation qui a été faite après la découverte de la structure en double brin de l'ADN est sa capacité à être copiée. Comme l'Adénine s'apparie toujours avec la Thyminine, et la Guanine avec la Cytosine, chaque brin d'ADN peut servir pour constituer la réplique en miroir de la molécule et en faire une copie identique. A l'époque il était difficile de comprendre comment une molécule possédant une variabilité reposant uniquement sur quatre bases azotées, pouvait contenir l'information permettant l'élaboration de molécules aussi complexes et différentes que les protéines. Les protéines sont, elles aussi, des molécules « ordonnées », composées par l'enchaînement, dans un ordre déterminé et propre à chacune d'elles, de leurs composants fondamentaux : les acides aminés. Il existe 20 acides aminés différents. C'est l'enchaînement des bases A-T-G-C dans l'ADN qui détermine l'enchaînement des acides aminés dans les protéines.

Le code génétique

Dans l'ADN, les séquences de Nucléotide forment un alphabet simple qui repose sur les quatre bases azotées (ATCG). Cet alphabet peut coder pour les vingt acides aminés qui sont retrouvés dans les protéines. Le langage du code génétique se compose de codons : ce sont les mots qui désignent les acides aminés de façon individuelle. Chaque codon est long de trois lettres : un gène peut donc être pensé en une phrase composée exclusivement de mots de trois lettres (trois bases azotées). Cet alphabet peut sembler trop limité. Mais utiliser les quatre lettres A, T, C, G en combinaison de mots de trois lettres permet d'obtenir 64 combinaisons possibles, c'est-à-dire plus qu'il n'en faut. Un acide aminé peut donc correspondre à plusieurs codons différents. On parle de redondance du code génétique.

Le mécanisme de base du code génétique est similaire à beaucoup d'organismes. Grâce à cette similitude, il est donc parfois possible de prendre un segment d'ADN appartenant à une première source et de prédire son comportement au sein d'un autre organisme. Par exemple, un segment d'ADN humain introduit dans l'organisme d'une bactérie, provoque la production de protéine humaine au sein de cette bactérie. C'est toute la clé du génie génétique.



ADN, ARN, et Protéine

Pour la fabrication des protéines, la cellule est confrontée à un problème de lieu : la fabrication de la protéine se fait dans le cytoplasme et l'information codant pour cette fabrication (l'ADN) se trouve dans le noyau. Pour résoudre ce problème, la cellule utilise une molécule intermédiaire appelée Acide RiboNucléique (ARN), et plus précisément un type d'ARN : l'ARN messager (ARNm). L'ARN a une structure très similaire à l'ADN, mais avec trois différences majeures : le sucre est un ribose (et non un désoxyribose), au niveau des bases azotées, la Thyminine est remplacée par l'Uracile, et dans la plupart des cas, l'ARN n'a qu'un seul brin. L'ARNm est formé dans un processus appelé transcription, en utilisant un seul brin (appelé le

brin « sens ») de l'ADN en tant que modèle. L'ARNm est ensuite transporté vers le cytoplasme où il est lu, et « converti » en protéine.

Ce processus de lecture exige des structures complexes existant dans le cytoplasme de la cellule : les ribosomes, le réticulum endoplasmique et des molécules d'ARN appelées ARN de transfert (ARNt). Les ribosomes agissent comme un échafaudage, tenant l'ARNm dans la bonne position afin qu'il puisse être lu par l'ARNt, qui transporte les acides aminés. Dans ce processus, les acides aminés sont assemblés entre eux, formant la protéine dont l'information était à l'origine stockée dans l'ADN. L'ensemble de ce processus peut être rapidement résumé par une formule considérée comme le dogme de la biologie moléculaire : « l'ADN fait l'ARN, et l'ARN fait la protéine. »

La technologie de l'ADN recombinant

Le terme «biotechnologie» se réfère souvent à des techniques d'ADN recombinant qui consistent à transférer un gène d'un organisme à un autre.

Le but d'Amgen consiste généralement à isoler un gène humain ayant un potentiel thérapeutique puis de l'introduire dans une bactérie, une levure, ou une lignée cellulaire d'origine animale grâce à des techniques de pointe. Ces systèmes recombinants permettent ainsi d'obtenir des protéines hautement purifiées en grandes quantités dans des conditions contrôlées, afin de pouvoir être utilisées en thérapeutique humaine.

La technique d'ADN recombinant illustrée ci-dessus est simple: en utilisant des protéines appelées «enzyme de restriction », des gènes issus d'ADN humain sont isolés et insérés dans de petites portions circulaires d'ADN coupées avec ce même enzyme et appelées « plasmides ». Une fois inséré dans ce plasmide, le gène peut être « collé » en utilisant un autre enzyme appelé ADN ligase. Enzyme de restriction et ADN ligase sont donc les ciseaux et la colle de la technologie de l'ADN recombinant.

Construit de cette façon, le plasmide recombinant est inséré dans une bactérie, une levure ou dans des cellules d'origine animales puis il est mis en culture dans un processus dit de transformation. Chez Amgen, nous utilisons la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*), la levure de boulanger, et un certain nombre de cellules de mammifères, y compris les cellules ovariennes de hamster chinois (cellules CHO) que nous utilisons pour produire notamment l'époétin alfa.

Les cellules transformées sont séparées des cellules non transformées grâce à une procédure de sélection basée sur des gènes résistants à certaines drogues également présents dans le plasmide. Un échantillon pur de cellules recombinantes est alors produit par le processus de clonage : dans le clonage, une seule cellule est sélectionnée, et par division cellulaire celle-ci donne lieu à une population entière de cellules identiques à la cellule de départ. A la sortie de ce processus, toutes les cellules doivent contenir une copie du plasmide portant la séquence d'ADN inséré, conçues pour produire la protéine à visée thérapeutique recherchée.

Quand un gène a été inséré, et les cellules clonées, celles-ci traduisent, la séquence d'ADN qui fabriquera la protéine recombinante. Selon le type cellulaire employé, la protéine sera présente au final à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule, dans le milieu de culture.

L'Epoétin alfa, est une érythropoïétine humaine recombinante. Il s'agit d'une hormone naturellement produite chez l'homme par des cellules spécifiques du rein. L'Erythropoïétine stimule les cellules précurseurs situées dans la moelle osseuse à former des érythrocytes matures (globules rouges).

Les patients souffrant de maladie rénale chronique sont souvent incapables de produire de l'érythropoïétine en quantité suffisante pour maintenir un taux normal de globules rouges circulants. Ces patients souffrent d'anémie de façon chronique (le nombre de leurs globules rouges dans le sang est trop faible). Dans certains cas, pour maintenir des niveaux adéquats de globules rouges, ces patients peuvent nécessiter des transfusions sanguines en plus de la dialyse.

Or, l'anémie associée à une maladie rénale peut être évitée par un apport thérapeutique d'érythropoïétine. Les quantités d'érythropoïétine produites par le corps humain sont trop petites pour que l'on puisse envisager d'en prélever suffisamment pour traiter les patients. De même, la molécule est trop complexe pour être synthétisée chimiquement.

Le Dr. Fu Kuen Lin est le premier chercheur d'Amgen à avoir dirigé des recherches visant à cloner le gène de l'érythropoïétine humaine. Grâce à des collaborateurs de l'Université de Chicago qui ont fourni à son équipe de très petites quantités d'érythropoïétine humaine, les scientifiques ont réussi à déterminer en partie la séquence des acides aminés présents dans une molécule d'érythropoïétine.



Grâce à ces informations, le Dr Fu Kuen Lin a ainsi été en mesure de concevoir de très courts morceaux d'ADN, appelés oligonucléotides, pouvant correspondre à une partie de la séquence de l'ADN humain codant pour l'érythropoïétine. Simultanément, des morceaux d'ADN humain correspondant qui pouvaient contenir le gène de l'érythropoïétine ont été clonés au hasard dans des bactéries.

Avec cette méthode, le Dr Fu Kuen Lin a fini par réussir à isoler le gène de l'érythropoïétine humaine. Et c'est en clonant ce gène humain dans des cellules ovariennes de hamster chinois qu'il a pu produire la protéine humaine. Cette même lignée cellulaire est encore utilisée de nos jours.

Suite à la réussite du clonage de l'érythropoïétine, tout a été mis en œuvre pour que le médicament soit un véritable succès : développement clinique, transposition d'échelle et mise en œuvre du procédé industriel de fabrication, coordination de l'ensemble des éléments nécessaires à l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché du produit, la protection du brevet jusqu'à la commercialisation du produit.

D'autres produits d'Amgen comme la darbépoétin alfa et le pegfilgrastim ont nécessité un travail supplémentaire au-delà du clonage d'un gène et de la purification des protéines produites.

Dans le cas de la darbépoétin alfa, une étape de glycosylation permet de rajouter des oligosaccharides, soit des sucres, aux protéines, tout en formant des ponts de liaison.

Dans le cas du pegfilgrastim, le processus de pegylation permet de rattacher une molécule de polyéthylène glycol (PEG) à une molécule de Filgrastim, pour que les molécules restent dans le corps plus longtemps, et d'augmenter ainsi leur durée d'action.



Le futur

La technologie de l'ADN recombinant a été la base du succès d'Amgen.

Aujourd'hui, tandis que les scientifiques continuent à affiner les techniques de recombinaison de l'ADN, des méthodes nouvelles sont en cours d'élaboration et paraissent déjà très prometteuses pour les deuxièmes et troisièmes générations de produits biotechnologiques.

Au cours de ces dernières années, nous avons assisté à une amélioration exponentielle dans la compréhension des processus de croissance cellulaire et de différenciation. Nous espérons ainsi que ces progrès nous permettront de fabriquer de nouveaux médicaments pour le traitement de diverses maladies. Quant aux protéines et à la structure de l'ADN, l'élargissement de nos connaissances nous a permis de créer de nouvelles classes de molécules thérapeutiques innovantes pour les patients.

AMGEN[®]

Amgen S.A.S.
62, Boulevard Victor Hugo
92523 Neuilly Sur Seine
Cedex
France