

La **saga** de l'hydrocortisone

Après avoir réalisé sa thèse à Rome sur la physique des supraconducteurs, Roberto Spagnoli s'est dirigé vers la biologie et les biotechnologies, et a été Directeur Département Biotechnologie France chez Hoechst Marion Roussel (aujourd'hui Sanofi). Dans ce chapitre, il nous fait partager l'aventure de l'hydrocortisone, qui a occupé une dizaine d'années de sa vie professionnelle.

1 Chimie et biologie : micro-organismes et bioconversions

1.1. Les micro-organismes : des microchimistes

Comme toute saga, celle de l'hydrocortisone commence avec un prologue. On est en 1992, j'ai écrit une petite histoire pour la communication interne et externe dont la protagoniste est la levure (**Encart** : « *La levure s'en-nuyait* »).

Si on peut définir les chimistes comme des bâtisseurs de molécules, ils ne sont pas les seuls. Les micro-organismes sont aussi des microchimistes très habiles. La **Figure 1** montre une grande variété de produits naturels parmi des dizaines de milliers issus de micro-organismes :

antibiotiques, antiviraux, vitamines (**Figure 1**).

Les micro-organismes fabriquent des molécules nouvelles mais peuvent aussi être utilisés pour transformer des molécules : on parle alors de biotransformations. Il peut s'agir de micro-organismes entiers ou de composants sub-cellulaires, les enzymes. Dans une biotransformation, un substrat S est transformé en un produit P ; cela peut se faire en une ou plusieurs étapes : dans ce dernier cas on parle de synthèses multistades.

1.2. Les bioconversions industrielles

Ce qui caractérise souvent les biotransformations dans l'industrie, c'est la recherche de procédés pour surclasser la rentabilité des procédés

LA LEVURE S'ENNUYAIT

La levure s'ennuyait, on ne lui demandait depuis des millénaires que des tâches de routine, du pain, du vin, de la bière... Dans des temps plus récents, c'est vrai, l'homme son ami l'avait mise au défi de fabriquer pour lui des substances plus nobles, des protéines que l'homme lui-même et les animaux ne savaient fabriquer qu'en petites quantités. Mais cela n'était pas à la hauteur de ses ambitions. Au fond, un procaryote tout bête, un *Escherichia coli* minable, avait pu, souvent, réussir les mêmes choses. La levure rêvait d'être un jour appelée à une grande entreprise. La nuit, elle lisait et relisait un texte où une phrase l'avait particulièrement frappée et chatouillait agréablement son ego :

« *Microorganisms can and will do everything, they are smarter, wiser, more energetic than chemists, engineers and others* » - D. Perlman (1979). *The laws of applied microbiology*.

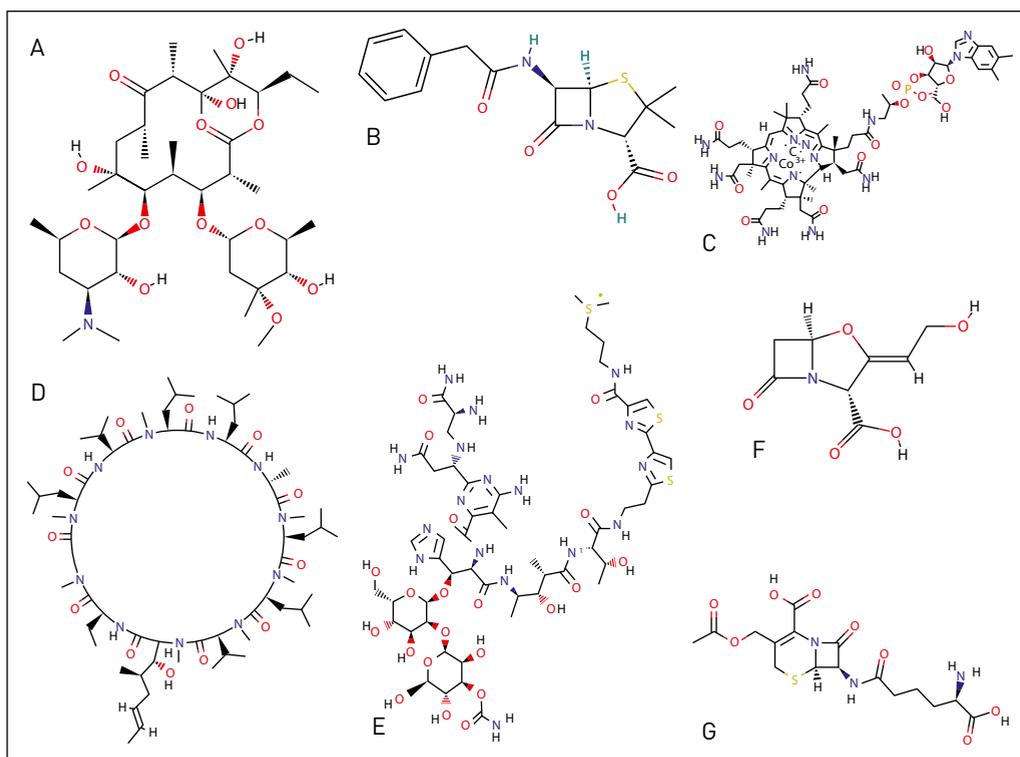


Figure 1

Quelques molécules naturelles issues de micro-organismes : A) Érythromycine ; B) Pénicilline ; C) Vitamine B12 ; D) Cyclosporine ; E) Bléomycine ; F) Acide clavulanique ; G) Céphalosporine C.

chimiques en place. On vise ainsi un rendement élevé et une productivité élevée (en grammes par litre de produit obtenu), à des échelles qui vont du kilogramme à celle des tonnes. Quand on développe un nouveau procédé

dans l'industrie, on sait que pour être gagnant en termes de rentabilité, il ne faut pas se contenter de petites améliorations, mais il faut viser des améliorations du coût de production qui soient au moins de l'ordre de 20 à 30 %.

Si on généralise, pour développer un procédé de biotransformation industrielle, on est confronté à trois objectifs :

- la recherche d'un rendement de bioconversion élevé. Selon le coût du substrat utilisé, l'objectif pourra varier de 60 % (pour des substrats peu chers) à 99 %. Cela est lié principalement à la souche qu'on utilise ;
- la recherche d'une concentration en substrat, et donc d'une productivité volumique élevée : typiquement de l'ordre de 1-100 grammes par litre ; on devra pour cela travailler à l'optimisation du procédé ;
- en dernier lieu, puisqu'il faut *in fine* sortir le produit du milieu réactionnel, on cherche un rendement de purification élevé, de 80 à 100 %. Ce rendement est lié à la fois à la souche et aux procédés.

molécule optiquement active¹ (**Figure 2**), découverte en 1935 et utilisée en thérapeutique depuis le début des années 1950.

Les corticostéroïdes², en général, et l'hydrocortisone en particulier, possèdent une action anti-inflammatoire unique. En tant que génériques ils trouvent leur place dans différents domaines d'applications, ils demeurent le « gold standard » dans le traitement de l'asthme et représentent une partie significative du chiffre d'affaires du « *business bulk* » de Sanofi.

1. Molécule optiquement active : une molécule est optiquement active si elle fait dévier le plan de polarisation de la lumière polarisée.
2. Corticostéroïdes : appelées aussi corticoïdes, ce sont des hormones stéroïdiennes sécrétées chez les êtres humains par le cortex de la glande surrénale.

2 La synthèse industrielle de l'hydrocortisone : d'une synthèse majoritairement chimique à une bioconversion par la levure

2.1. La synthèse d'hydrocortisone par voie purement chimique : de 40 à 9 étapes

La saga, telle que nous la racontons et où l'on verra la levure à l'œuvre, se développe sur plusieurs saisons : la saison 1 entre 1992 et 2000 (recherche), et une saison 2 entre 2000 et le présent (développement).

Qu'est-ce que l'hydrocortisone ? C'est une très belle

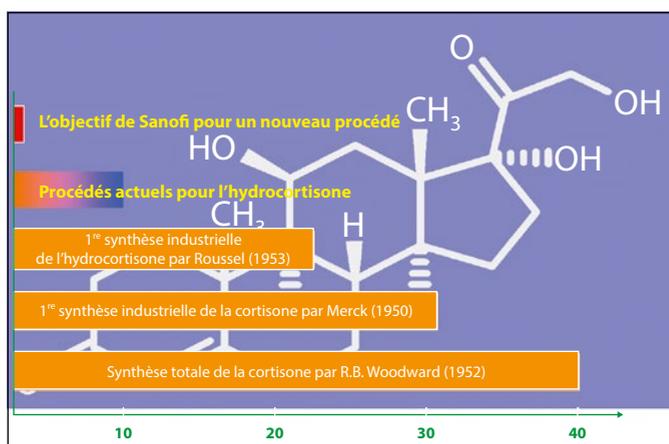


Figure 2

Évolution du nombre d'étapes de la synthèse de l'hydrocortisone au cours des années : on est passé d'une synthèse en 40 étapes en 1952 à une synthèse en 23 étapes en 1953, puis en 9 étapes à une époque plus récente.

Le bulk, c'est la matière première utilisée dans la fabrication des médicaments.

En 1952 a été réalisée une « synthèse totale » de l'hydrocortisone, c'est-à-dire une synthèse à partir de molécules toutes simples. On peut voir sur la **Figure 2** le nombre d'étapes nécessaires pour bâtir ainsi cette molécule complexe, soit une quarantaine d'étapes et un rendement final ridiculement faible, chaque étape ayant évidemment un rendement inférieur à 100 %.

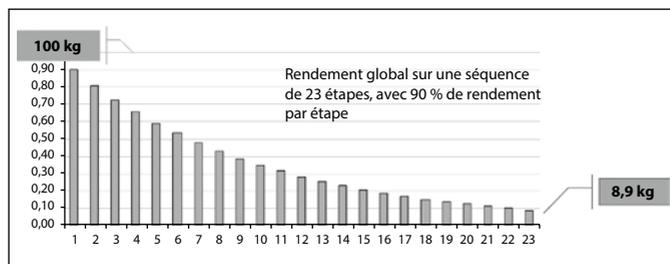
Pour pouvoir la produire industriellement il a fallu développer des méthodes spécifiques plus efficaces. En 1950, a été publiée la première synthèse industrielle de cortisone par Merck, en une trentaine d'étapes. Puis Roussel-Uclaf (l'« ancêtre » de Sanofi) intervient sur la scène en 1953 avec sa première synthèse industrielle d'hydrocortisone en 23 étapes. À partir de là, il y a eu évidemment une course pour faire plus court et moins cher, et le procédé actuel se fait en 9 étapes. Peut-on mieux faire ? L'objectif de Sanofi est alors le plus ambitieux possible : produire l'hydrocortisone en une seule étape, et c'est l'histoire qui va être racontée.

L'influence du nombre d'étapes sur le rendement final (et *in fine* sur le coût de production) est illustrée sur la **Figure 3**. Même avec un rendement moyen par étape de 90 %, qui est assez optimiste, la chute vertigineuse de la quantité produite pour une même quantité de produits de départ est spectaculaire. En 1953, le procédé de Roussel-Uclaf en 23 étapes utilisait comme matière première l'acide désoxycholique d'origine animale (extrait de la bile de bovins et ovins), mais ce dernier a dû être abandonné au cours des années 1980 à cause de l'épidémie dite « de la vache folle » (ESB : encéphalopathie spongiforme bovine). On a donc dû développer une nouvelle voie pour arriver au produit final.

L'hydrocortisone, et plus généralement les corticostéroïdes, représente pour notre entreprise un volume de production de plusieurs tonnes, un chiffre d'affaires important, beaucoup de monde impliqué dans sa fabrication dans les usines, et tout cela dans un contexte de concurrence acharnée. La voie industrielle actuelle, déjà très améliorée par rapport aux procédés antérieurs, compte, comme on l'a dit,

Figure 3

Diminution de la quantité de produit obtenu dans l'hypothèse d'un rendement moyen de 90 % pour chaque étape de la synthèse d'hydrocortisone en 23 étapes.



9 étapes : d'abord une bio-conversion pour transformer un substrat naturel d'origine végétale en un intermédiaire très important, ensuite 8 étapes chimiques.

C'est déjà pas mal, mais comment faire encore mieux pour faire face à une compétition mondiale de plus en plus dure ? L'idée a été de s'inspirer de la nature. En fait, l'hydrocortisone est une substance naturelle produite dans les glandes surrénales de tout mammifère ; avec son efficacité remarquable, la nature arrive à la synthétiser en 5 étapes à partir du cholestérol, qu'il soit assimilé par l'alimentation ou fabriqué sur place. Ici on peut citer Leonard De Vinci, qui, en 1508, déclarait : « *l'homme n'arrivera jamais à faire mieux que la nature parce qu'en nature rien n'est superflu et rien ne manque* ». L'idée d'un nouveau procédé industriel est donc d'exploiter cette voie biosynthétique naturelle en essayant de la transférer en totalité dans un micro-organisme.

Voici donc la biotransformation de rêve : on fournirait à ce micro-organisme modifié du cholestérol à partir duquel il pourrait fabriquer l'hydrocortisone comme le fait une cellule surrénale. Simple, non ?...

2.2. Un projet ambitieux : de 9 à 5 étapes en s'inspirant de la nature

La **Figure 4** présente la voie naturelle de synthèse de l'hydrocortisone dans les surrénales, avec ses 5 étapes enzymatiques et le cholestérol comme substrat de départ. Les transformations se font

à l'intérieur des deux compartiments subcellulaires des surrénales : la première et la dernière étape ont lieu à l'intérieur des mitochondries³, et les trois autres au niveau du réticulum endoplasmique⁴. Passons-les rapidement en revue.

Première et dernière étape (mitochondries)

Dans ces étapes de synthèse, deux enzymes P450 jouent un rôle clé. Il faut savoir que les P450 (**Encart : « Les protéines P450 sont des protéines complexes »**) ne peuvent pas fonctionner sans l'aide d'autres protéines qui contribuent au transport d'électrons. En l'occurrence, pour la première étape de cette synthèse, trois protéines sont nécessaires : la P450_{scc} (« *side chain cliving* »), appelée aussi CYP11A1, avec la participation de l'adrénodoxine (ADX) et l'adrénodoxine réductase (ADR). Cette P450 coupe la chaîne latérale du cholestérol d'une façon contrôlée et produit la Prénénolone, qui, ensuite, au niveau du réticulum endoplasmique, est transformée par la 3-hydroxystéroïde-déshydrogénase-isomérase (3 HSDH) – seule enzyme de la voie qui n'est pas une P450 – en progestérone. On obtient ainsi le premier produit doté d'une activité hormonale. On retrouvera ensuite les mêmes

3. Mitochondries : organites cellulaires eucaryotes possédant une double membrane. Elles sont indispensables aux réactions énergétiques d'une cellule.

4. Réticulum endoplasmique : organite cellulaire eucaryote impliqué dans la biosynthèse des protéines.

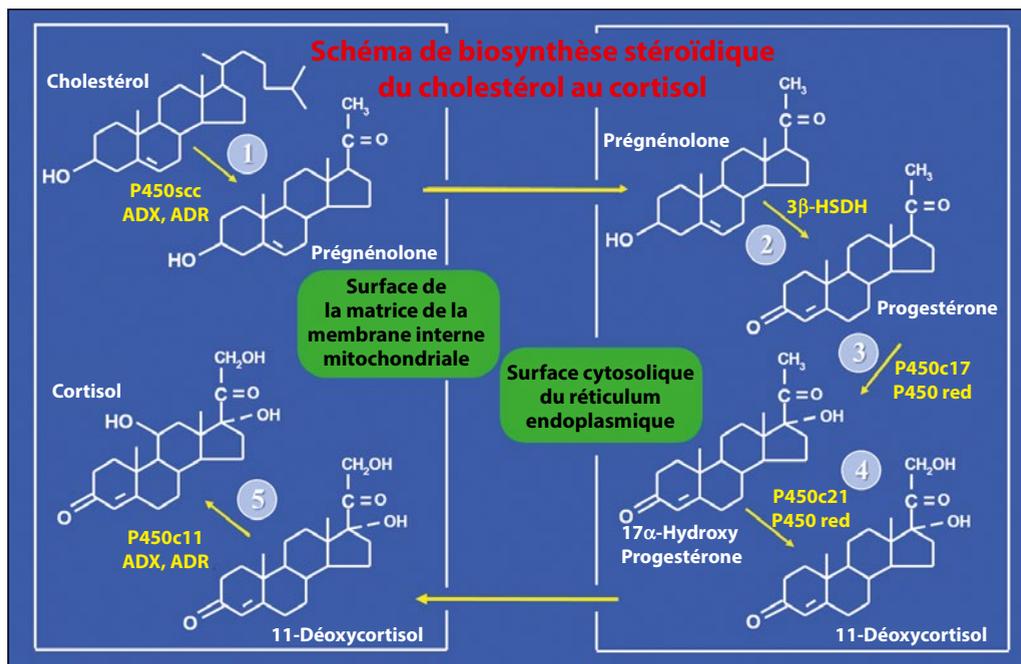


Figure 4

Biosynthèse de l'hydrocortisone à partir du cholestérol se déroulant dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique d'une cellule surrénale.

complices, ADX et ADR, au niveau de la dernière réaction avec la P450 11-hydroxylase, appelée aussi CYP11B1, qui transforme le 11-déoxycortisol en hydrocortisone.

Les trois étapes intermédiaires (réticulum endoplasmique)

L'intervention de la 3 HSDH est suivie par deux réactions d'hydroxylation prises en charge par deux P450 qui sont la P450_{c17} et la P450_{c21}, appelées aussi, respectivement, CYP17A1 et CYP21A1. Ces P450 aussi ont besoin d'un partenaire, la P450 réductase (P450 RED) et du cytochrome B5. On aboutit ainsi au 11-déoxycortisol, qui revient au niveau des mitochondries et, comme mentionné précédemment, est ici transformé

en hydrocortisone (appelée aussi cortisol) par la dernière enzyme, la P450 11 hydroxylase (P450_{c11}).

Voilà donc, en 5 étapes, et par l'intervention de 8 à 10 protéines différentes, comment l'hydrocortisone est produite dans les surrénales.

2.3. Le choix de la levure comme micro-organisme opérationnel

Pour transférer la voie de synthèse de l'hydrocortisone, on avait *a priori* plusieurs options quant au micro-organisme hôte. Notre choix s'est finalement porté sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*, et cela pour plusieurs raisons. En premier lieu, il s'agit

LES PROTÉINES P450 SONT DES PROTÉINES COMPLEXES

Les P450, qui appartiennent à la famille des oxydoréductases, ne sont pas des protéines « simples » comme le seraient une amylase¹ ou une protéase² (Figure 5). Elles sont insérées dans des membranes, que ce soit au niveau des microsomes³ ou au niveau des mitochondries ; elles ont un groupe prosthétique⁴, un hème⁵, et ont besoin d'autres protéines pour exercer leur rôle. Ici dans les microsomes (Figure 5A) se trouvent le cytochrome B5 et la P450 réductase ; au niveau des mitochondries (Figure 5B), l'adrénodoxine et l'adrénodoxine réductase, qui réalisent le transfert d'électrons pour permettre la réaction en question. Ce sont des protéines complexes.

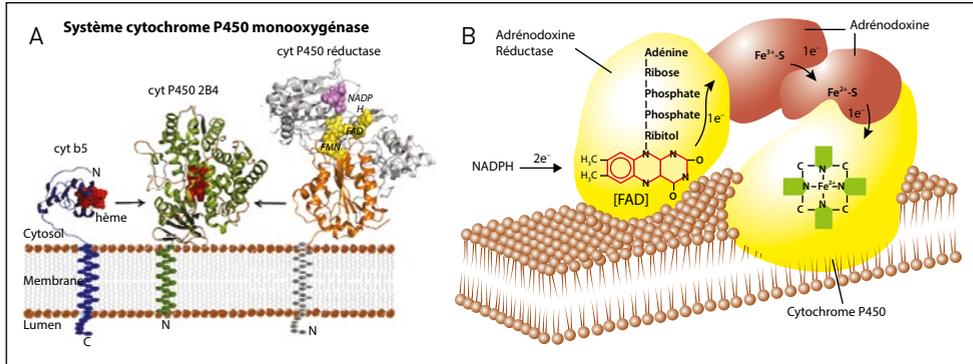


Figure 5

Insertion membranaire des protéines P450 et relation avec le cytochrome B5 et la P450 réductase au niveau des microsomes (A), ou avec l'adrénodoxine et l'adrénodoxine réductase au niveau de la mitochondrie (B).

1. Amylase : enzyme de la famille des hydrolases catalysant principalement l'hydrolyse de l'amidon.
2. Protéase : enzyme hydrolysant les protéines et les polypeptides.
3. Microsomes : minuscules vésicules cytoplasmiques présentes dans les cellules issues de la fragmentation du réticulum endoplasmique.
4. Groupe prosthétique : molécule organique non protéique maintenue dans une structure protéique au moyen de liaisons covalentes permanentes mais aussi éventuellement de liaisons faibles.
5. Hème : structure contenant un atome de fer, contenue par exemple dans l'hémoglobine des globules rouges pour le transport du dioxygène dans le sang.

bien d'un eucaryote⁵ et non pas d'un procaryote comme *Escherichia coli*. Comme tel, il possède une compartimentation subcellulaire nous permettant de cibler et répartir l'expression des différentes activités dans des compartiments qui correspondent à ceux des cellules surrénales.

Ensuite, pour faire le génie génétique nécessaire à l'introduction d'une voie de

biosynthèse entière au sein d'un micro-organisme, on a besoin d'une boîte à outil très riche. C'est ce qu'offre la levure qui permet à la fois l'intégration de gènes hétérologues⁶, ou l'expression à travers des vecteurs épisomiques⁷ à nombre de copies limité ou élevé.

6. Gènes hétérologues : gènes non présents naturellement chez l'hôte.

7. Vecteurs épisomiques : vecteurs de clonage d'origine bactérienne pour la levure *Saccharomyces cerevisiae*, maintenu comme étant une molécule d'ADN nucléaire extra-chromosomique.

5. Eucaryote : organisme caractérisé par la présence d'un noyau et d'autres organelles subcellulaires dans le cytoplasme.

Enfin, d'autres éléments sont là pour rendre l'entreprise réaliste: le génome a été séquencé complètement et la majorité des fonctions géniques a été caractérisée ; la levure possède déjà, et donc sait produire, des P450 homologues pour son propre fonctionnement, et des P450 hétérologues ont pu être exprimées, d'après la littérature scientifique, sous une forme fonctionnelle ; ensuite, la levure présente une plasticité génomique élevée, qui se traduit dans une fréquence de recombinaison⁸ élevée. Mentionnons aussi le fait qu'au-delà du génie génétique pour travailler la levure, on peut aussi utiliser la génétique traditionnelle grâce au cycle sexuel⁹ haploïde-diploïde. Ce n'est pas tout : la fermentation à grande échelle et haute densité cellulaire de la levure est bien maîtrisée, le temps de duplication d'une levure est court et on peut développer, pour la faire pousser, des milieux de fermentation peu coûteux. C'est par ailleurs un organisme dit GRAS (« *Generally Recognized As Safe* »), ce qui a permis d'ailleurs à un certain

8. Fréquence de recombinaison : phénomène conduisant à l'apparition, dans une cellule ou dans un individu, de gènes ou de caractères héréditaires dans une association différente de celle observée chez les cellules ou individus parentaux.

9. Cycle sexuel haploïde-diploïde : passage entre l'état haploïde, c'est-à-dire par une cellule ne comportant qu'un exemplaire de chaque chromosome, à un état diploïde, c'est-à-dire par une cellule comportant deux exemplaires de chaque chromosome, lors de la multiplication cellulaire.

nombre de protéines recombinantes¹⁰ thérapeutiques produites dans la levure d'être présentes sur le marché. Il y a donc là tout ce qu'il faut pour se lancer dans cette aventure, mais est-ce vraiment aussi simple que cela ?

Le simple schéma présenté plus haut dans la **Figure 4** met en jeu exactement les mêmes enzymes et les mêmes réactions que le schéma plus complexe mais plus réaliste de la **Figure 6**. La réalité est compliquée par le fait que les enzymes en question, les P450, n'ont pas une spécificité de substrat absolue ; ils peuvent reconnaître plusieurs substrats et donc agir dans un ordre différent de l'ordre que nous souhaiterions voir suivi. En clair, si on introduisait toutes ces enzymes et ces protéines dans une levure et qu'on les laissait agir d'une façon anarchique, on se retrouverait à la fin avec un affreux mélange de plusieurs produits : pas uniquement l'hydrocortisone ou cortisol que nous recherchons, mais aussi avec des minéralocorticoïdes¹¹ (corticostérone, aldostérone...) et des hormones sexuelles. Un tel mélange complexifierait considérablement la purification et conduirait à une grosse perte de rendement et un coût de production prohibitif.

Au-delà de cette difficulté, si l'on veut faire l'inventaire succinct

10. Protéines recombinantes : protéines produites dans une cellule dont le matériel génétique a été modifié par recombinaison génétique.

11. Minéralocorticoïdes : stéroïdes assurant la régulation des échanges d'eau et d'ions.

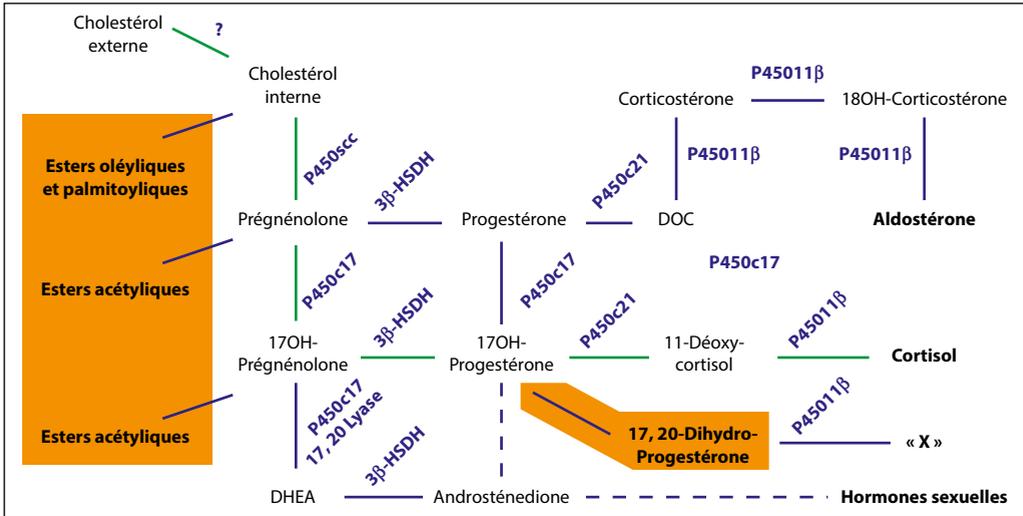


Figure 6

Biosynthèse d'hydrocortisone et de produits secondaires à partir de cholestérol chez la levure. Les autres produits seraient obtenus par des réactions secondaires (minéralocorticoïdes et hormones sexuelles) ou parasites (partie en orange) pouvant se dérouler au sein de la levure.

des principaux problèmes tels qu'ils se présentaient au départ du projet de faire synthétiser l'hydrocortisone par une levure (ou par un micro-organisme en général), on peut dresser la liste suivante :

- il fallait maîtriser l'expression fonctionnelle d'une enzyme P450, qui contient un hème, qui doit être inséré correctement dans une membrane avec un repliement correct, et avec des partenaires pour qu'il puisse fonctionner correctement ;
- il fallait cibler l'expression de chaque enzyme dans le bon compartiment subcellulaire, que ce soit les microsomes ou les mitochondries ;
- la difficulté relative à l'expression fonctionnelle d'une seule enzyme est multipliée par le fait qu'il fallait réaliser la coexpression fonctionnelle de plusieurs enzymes ;

- on se trouvera à devoir affronter des réactions secondaires liées à la voie biosynthétique et il faudra éviter ou limiter la formation de minéralocorticoïdes et des hormones sexuelles en plus de l'hydrocortisone ;
- bien que très tolérante, la levure n'est pas totalement neutre par rapport aux différents substrats et produits qu'elle va voir apparaître au cours du procédé. Cela est rappelé sur la partie orange de la **Figure 6**. Certaines des réactions parasites liées à la levure agissent sur certains substrats et produits des réactions de la voie ;
- il y a aussi le problème - un des plus sérieux qu'on a dû affronter (voir plus loin) - de l'approvisionnement en substrat initial, le cholestérol ;
- *last but not least*, on ne se contentera pas de produire

quelques milligrammes par litre d'hydrocortisone mais on vise *in fine* une productivité intéressante d'un point de vue économique et industriel.

2.4. Le problème de l'approvisionnement en substrat : le cholestérol

Saccharomyces cerevisiae est, malheureusement pour nous, imperméable aux stérols exogènes – donc au cholestérol – en conditions d'aérobiose (fonctionnement biologique en présence d'oxygène). Cependant, l'oxygène est indispensable pour le fonctionnement des P450 chargées d'effectuer les transformations du cholestérol. Pour résoudre cette difficulté sérieuse et rendre la levure perméable, plusieurs approches pouvaient être envisagées : par exemple générer des mutants adéquats et viables ; ou bien utiliser différents moyens physico-chimiques (liposomes, cyclo-dextrines...) pour favoriser la pénétration du substrat ; ou encore mettre en œuvre des conditions de culture alternant anaérobiose et aérobiose, etc. Tout cela n'est pas simple, au contraire long, compliqué et coûteux. Une voie alternative serait d'essayer de rendre la levure « autosuffisante », c'est-à-dire pouvant se passer de l'apport exogène du cholestérol : c'est bien cette dernière option que nous avons poursuivie avec succès.

Comment atteindre cette autosuffisance induite ? Partons du fait que la levure fabrique pour son propre fonctionnement un autre stérol, l'ergostérol (**Figure 7**),

en grande quantité. Celui-ci se loge à l'intérieur de ses membranes, ce qui assure leur fluidité nécessaire à la vie de la levure. Comme on le voit dans la **Figure 7**, la molécule de cholestérol n'est pas très différente de l'ergostérol. Il y a essentiellement trois points de différence structurale indiqués par une flèche : le méthyle en position 24, la double liaison en position 22-23, et la double liaison en position 7-8. Les deux premières différences peuvent être surmontées facilement parce que la P450_{scc} peut couper la chaîne latérale même en présence de ce méthyle. D'autre part, on peut facilement obtenir des mutants de levure, dénommés *erg5*, où l'enzyme qui introduit justement la double liaison 22-23, ERG5, est inactivée. La vraie difficulté résiduelle c'est la double liaison en 7-8, présente dans l'ergostérol et qui n'existe pas dans le cholestérol.

Pour mimer le cholestérol, l'idée a donc été de réduire cette double liaison 7-8 grâce à l'expression hétérologue dans la levure d'une enzyme de plante d'origine naturelle. Rappelons que tous les organismes produisent en effet un stérol et l'introduisent dans leurs membranes : pour les mammifères c'est le cholestérol, pour les plantes le sitostérol, et pour la levure l'ergostérol. Dans les voies de biosynthèse respectives, parce qu'il y a un précurseur commun, il existe une enzyme qui, chez les plantes comme chez les mammifères, réduit cette double liaison (**Figure 8**) : c'est la Δ -7 réductase, qui

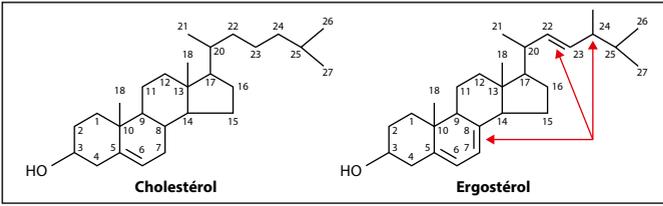


Figure 7

Différences structurales entre le cholestérol et l'ergostérol.

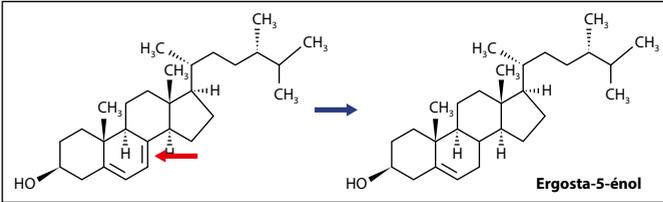


Figure 8

Réduction de l'ergostérol par la Δ -7 réductase pour aboutir à l'Ergosta 5-énol ne différant du cholestérol que par sa chaîne latérale.

catalyse donc la formation de l'Ergosta 5-énol (appelé aussi campestérol), dont la seule différence avec le cholestérol est la présence du groupe méthyle en 24.

Pour mettre ce procédé en œuvre, nous avons d'abord cloné dans la levure l'ADN¹² de la Δ -7 réductase à partir d'une bibliothèque d'expression d'*Arabidopsis thaliana* (en quelque sorte l'*Escherichia coli* des plantes). On a sélectionné des transformants contenant le plasmide¹³ et effectué une pression de sélection basée sur la résistance à la nystatine. Une analyse des stérols a ensuite été réalisée pour vérifier si effectivement l'ergostérol avait été transformé en campestérol. Pourquoi a-t-on choisi la nystatine ?

Cette dernière est un anti-fongique dont le mécanisme d'action consiste à se lier à l'ergostérol grâce, justement, de la présence de sa double liaison conjuguée (Figure 9). Cette interaction désagrège *in fine* complètement la structure de la membrane : la levure ou le champignon meurt. On prévoit donc que dans la mesure où cette double liaison ne serait plus présente du fait de l'action de la Δ -7 réductase, la souche correspondante deviendrait résistante à la nystatine. C'est le principe (très astucieux) qui nous a permis de cloner et d'exprimer sous forme fonctionnelle la Δ -7 réductase.

L'analyse du profil des stérols de la souche transformée exprimant la Δ -7 réductase (Figure 10) a bien permis de vérifier que le stérol principal n'était plus l'ergostérol mais l'ergosta 5-énol ou campestérol (E5 dans la Figure 10). On a donc bien construit une levure « végétalisée » et bien viable qui a, dans ses membranes, à la place de l'ergostérol, un stérol similaire au cholestérol que l'on peut utiliser comme

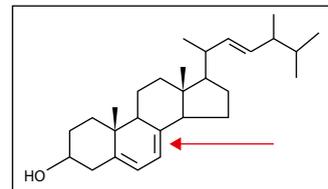


Figure 9

La spécificité et le mode d'action de la nystatine provient de l'interaction avec la double liaison conjuguée de l'ergostérol.

12. ADNc : ADN complémentaire : simple brin d'ADN synthétisé à partir d'un ARN messager représentant la partie codante de la région du génome ayant été transcrite.

13. Plasmide : une molécule d'ADN distincte de l'ADN chromosomique, capable de répllication autonome et non essentielle à la survie de la cellule.

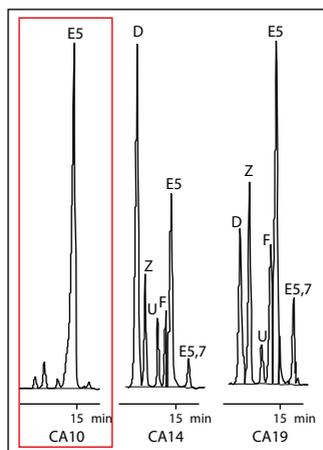


Figure 10

Analyse des stérols de différentes souches *erg5* exprimant la -7 réductase seule [CA10] ou avec d'autres enzymes comme *atf2* ou la 3β-HSDH [CA14 : 7Réductase in *erg5*, *atf2* (+SCC,...) ; CA19 : 7Réductase + 3β-HSDH in *erg5*, *atf2* (+SCC...)]. E5=campestérol

substrat « de remplacement » pour les différentes réactions de la voie biosynthétique de l'hydrocortisone. Voici un joli résultat qui nous permet de bien espérer pour la suite...

2.5. Schéma des étapes 1 et 5 de la biosynthèse effectuée dans les surrénales ou dans la levure

La **Figure 11A** donne une représentation schématique de la première étape de la synthèse de l'hydrocortisone. On reconnaît la membrane extérieure (OM) d'une mitochondrie et sa membrane intérieure (IM), la P450_{sc} (« *side-chain-cliving* »), l'adrénodoxine réductase (ADR) et l'adrénodoxine (ADX), qui sert de navette pour le transport d'électrons depuis le NADPH, via l'ADR jusqu'à la P450_{sc}. Cette enzyme peut alors transformer le cholestérol, ou dans notre cas le campestérol, en prégnénolone.

La dernière étape suit exactement le même schéma

hormis le fait que l'enzyme active est maintenant la P450 11-hydroxylase (**Figure 11B**).

2.6. Expression dans la levure des protéines nécessaires pour la biosynthèse : étape 1 seule, puis enchaînement des étapes 1 et 2. De bonnes et de mauvaises surprises...

Pour arriver à exprimer sous forme fonctionnelle la P450_{sc}, il a fallu exprimer trois protéines, donc la SCC en question (qu'on appelle CYP11A1), l'adrénodoxine et l'adrénodoxine réductase. Puisque le substrat potentiel va être synthétisé directement par la souche qui exprime la Δ-7 réductase et qu'on va le retrouver directement dans ses membranes (plus précisément au niveau de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique), on n'essaiera plus de cibler l'expression de ces protéines hétérologues au niveau des mitochondries. En éliminant du gène la séquence signal

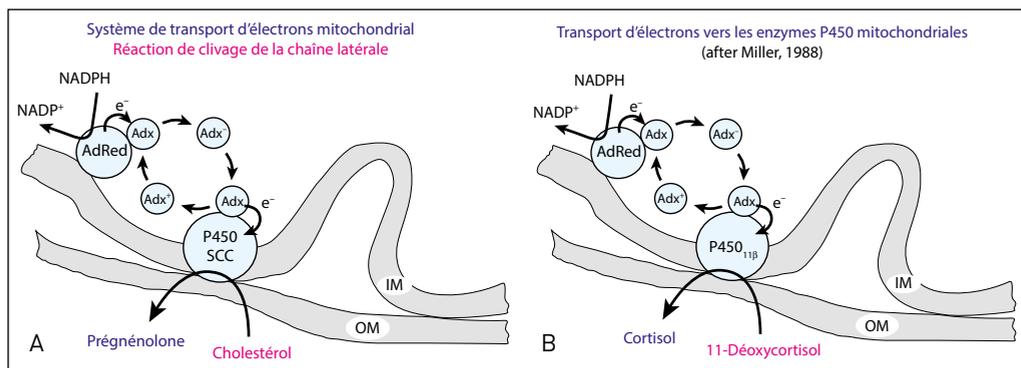


Figure 11

Chaîne de transfert d'électrons utilisant la P450_{sc}, l'adrénodoxine réductase, l'adrénodoxine et NADPH au niveau de l'enveloppe mitochondriale permettant la synthèse de la prégnénolone à partir du campestérol (A), ainsi que la synthèse du cortisol à partir du 11-déoxycortisol (B).

de ciblage aux mitochondries, on exprimera donc les trois protéines « matures » en dehors de ces organelles, notamment l'adrénodoxine, une protéine soluble, au niveau du cytosol¹⁴, l'adrénodoxine réductase au niveau du réticulum endoplasmique, et la SCC dans une localisation à préciser. Pour identifier la localisation, on a utilisé des anticorps et des marqueurs de fluorescence (Figure 12). Coup de chance : on retrouve la partie la plus importante de la P450_{scc} au niveau de la membrane plasmique (PM), donc là où se trouve la plus grande quantité de son substrat – c'est même une situation favorable.

La bonne surprise s'est accompagnée d'une mauvaise, la mise en évidence d'une réaction parasite de la levure. L'enzyme (P450_{scc} avec ADR et ADX) fonctionne bien, cependant quand on exprime cette étape individuellement dans une levure qui produit de la Δ -7 réductase, on ne retrouve pas la prégnénone comme prévu, mais l'acétyl-prégnénone (Figure 13). La réaction parasite (Figure 14) obère le bon fonctionnement de la levure et doit être éliminée.

Pour éliminer cette propriété nuisible, par une approche de biochimie classique on est arrivé à purifier l'enzyme responsable de la réaction parasite puis à la séquencer et déterminer la séquence du gène à partir de la séquence de la protéine. Connaissant la

14. Cytosol : phase liquide dans laquelle baignent les organites à l'intérieur d'une cellule.

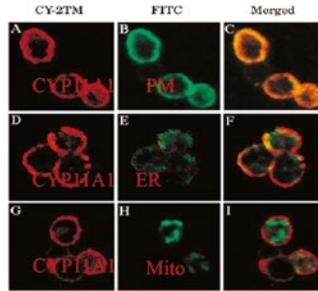


Figure 12

Identification de la localisation de la SCC en utilisant des anticorps et des marqueurs de fluorescence.

Source : Duport C., Schoepp B., Chatelain E., Spagnoli R., Dumas B. and Pompon D. (2003). Critical role of the plasma membrane for expression of mammalian mitochondrial side chain cleavage activity in yeast, *Eur. J. Biochem.*, 270 : 1502-14.

séquence du gène, on pourra l'inactiver ou le détruire.

La protéine nuisible ainsi identifiée a été appelée APAT (« Acetyl Pregnenolone Acetyl Transferase ») (Figure 15). On a trouvé un gène de la levure, Atf2, appartenant à une famille d'alcool-o-acétyl transférase, et on a vérifié que c'était bien elle la responsable en inactivant ce gène et donc l'enzyme – heureusement non essentielle à la vie de la levure.

Une fois l'enzyme en question inactivée dans cette souche, on se retrouve bien dans la souche CA14 avec la prégnénone et non plus avec l'acétylprégnénone (respectivement P et PA dans la Figure 16).

Si dans la même levure qui exprime Δ -7, P450_{scc},

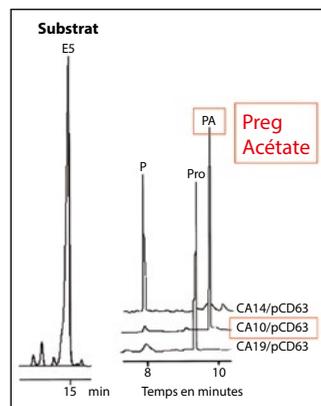


Figure 13

Analyse des produits d'une souche CA10 exprimant Δ -7, P450_{scc}, ADR et ADX, mettant en évidence la présence d'une réaction parasite.

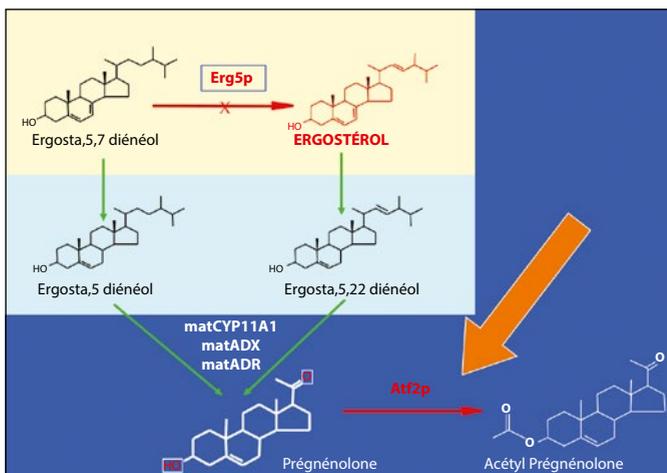


Figure 14

Réaction parasite à partir de l'Ergosta-5,7-diénol aboutissant à l'acétylprégnénolone.

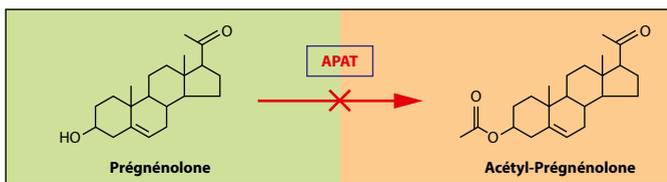


Figure 15

Identification de la protéine APAT et de son gène Atf2, responsable de la réaction parasite aboutissant à l'acétate de prégnénolone.

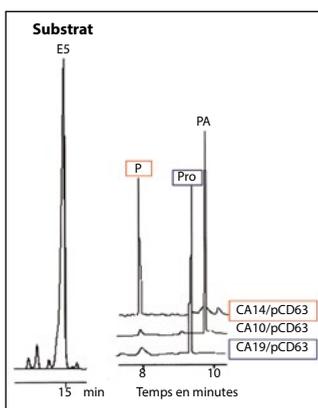


Figure 16

Analyse des produits des souches CA14 et CA19 où la protéine APAT n'est plus exprimée (mutants atf2).

adrénodoxine et adrénodoxine réductase, on exprime aussi la 3-hydroxystéroïde-déshydrogénase-isomérase (c'est donc la souche CA19 dans la Figure 16), on détecte la production de progestérone (Pro dans la même figure). On est ainsi parvenu à construire une souche qui, sans aucune supplémentation particulière sauf une simple source de carbone dans son milieu de fermentation, arrive déjà toute seule à produire une hormone. Cela est schématisé sur la Figure 17 : les deux premières étapes de la biosynthèse sont comprises, mises au point et validées.

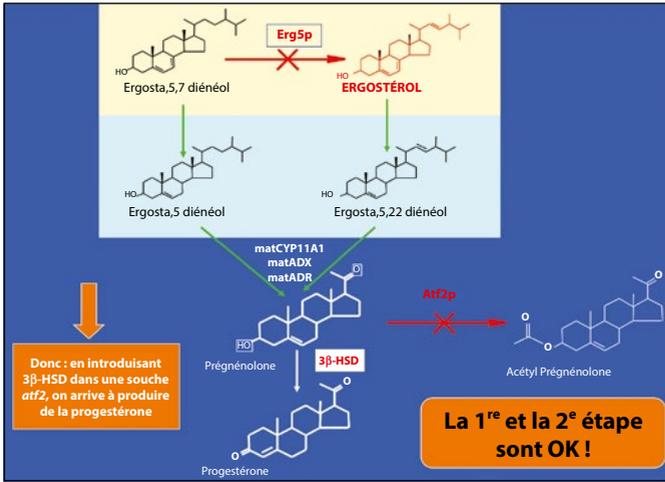


Figure 17

Production de la progestérone à partir de l'ergostérol en présence de -7 réductase, P450 SCC, adrénodoxine, adrénodoxine réductase ; on exprime aussi la 3-hydroxystéroïde-déshydrogénase-isomérase et en ayant inactivé le gène *Atf2*, responsable de la production de la protéine APAT (étapes 1 et 2 de la voie biosynthétique).

2.7. Réalisation et analyse des étapes intermédiaires (étapes 3 et 4) de la biosynthèse

Ces étapes (hydroxylations en C17 et en C21, **Figure 18**) ont lieu dans le réticulum endoplasmique et aboutissent à la formation de 11-déoxycortisol à partir de progestérone.

On rappelle ici que pour fonctionner, les P450 du réticulum endoplasmique ont besoin de la P450 réductase et du cytochrome B5. Mais la levure a ses propres P450 microsomales et ses propres P450 réductase et cytochrome B5. On pourra donc faire l'économie de l'expression de réductase hétérologue et de B5 hétérologue, en exploitant les deux protéines de la levure (**Figure 19**).

En effet, dans les souches de levure exprimant indivi-

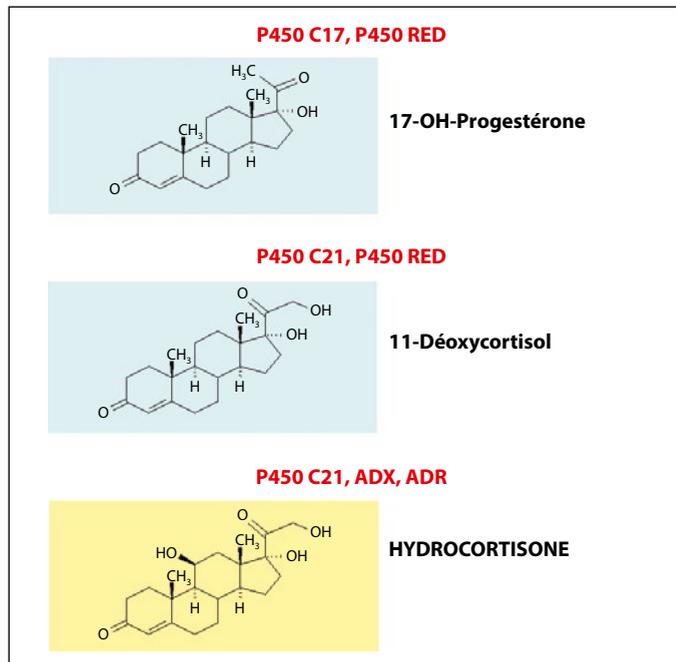


Figure 18

Synthèse d'hydrocortisone à partir de progestérone au sein du réticulum endoplasmique.

duellement la P450C17 ou la P450C21, ces deux enzymes deviennent parfaitement fonctionnelles grâce à la présence de la réductase et du cyt b5 endogènes. Mais revenons un moment aux différentes voies citées au début du chapitre dans la **Figure 6** : celles-ci mènent bien au cortisol, mais aussi aux minéralocorticoïdes et aux hormones sexuelles. Nous avons constaté expéri-

mentalement que le rapport entre ces différentes voies et donc entre les différents produits finaux peut être modulé en jouant sur le ratio d'expression entre les deux hydroxylases microsomiales. C'est ce que l'on fera pour pouvoir canaliser le maximum de la voie vers le cortisol.

On a ensuite découvert une deuxième réaction parasite, qui provient de ce que la 20-cétone est sensible à la réduction par la levure. On met en évidence au niveau de la 17-hydroxyprogesterone le fait que cette 20-cétone de la 17-OH progesterone peut être réduite en hydroxyle (**Figure 20**). Là aussi, avec exactement la même stratégie que précédemment, on est arrivé à identifier les enzymes responsables, GCYp et YPR1p, et on les a inactivées (**Figure 20**).

Avec la suppression de cette la réaction parasite, on est finalement arrivé à inactiver toutes les voies de fuite parasites des quatre premières étapes. Il reste, pour arriver au cortisol, à exprimer la dernière étape, la 11 hydroxylase qui prend place dans les mitochondries (voir la **Figure 6**).

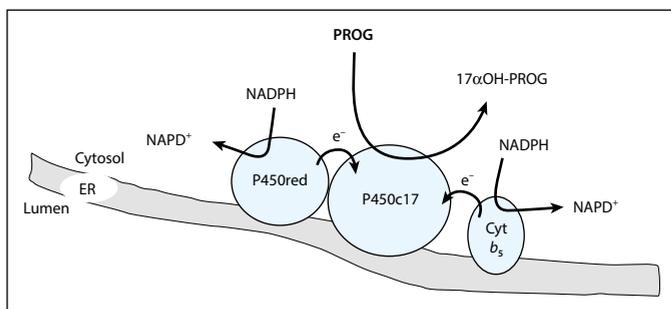


Figure 19
Chaîne de transfert d'électrons au sein de la membrane des microsomes pour les P450 nécessitant la P450 réductase et le cytochrome B5.

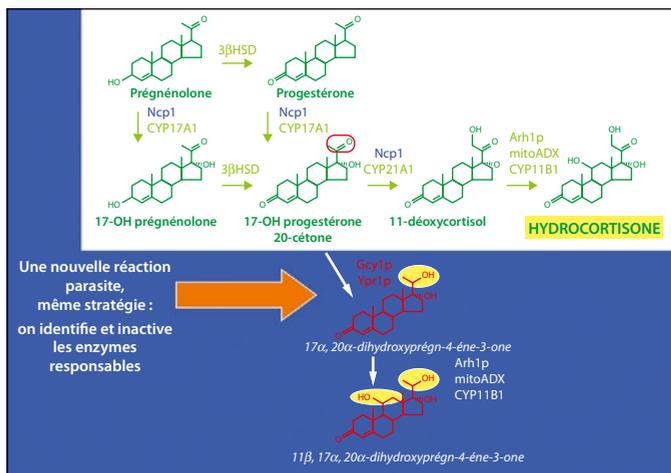


Figure 20
Identification des enzymes responsables de la réaction parasite consistant en la réduction de la 20-cétone en hydroxyle.

2.8. L'étape de biosynthèse située dans les mitochondries (étape 5)

Comme pour la P450scc, nous avons pour la P45011 une localisation intra-mitochondriale avec l'ADR dans la membrane intérieure et l'ADX dans la matrice intracellulaire. Avec les outils du génie génétique on va cette fois-ci cibler l'expression des trois protéines au niveau des mitochondries par l'utilisation de pré-séquences

adéquates en amont des gènes respectifs.

On mène ensuite des expériences testant la conversion du 11-désoxycortisol en hydrocortisone pour évaluer l'efficacité du système dans différents cas de figure (Figure 21). Si on exprime dans la levure les trois protéines à la fois, on détecte un bon taux de bioconversion, elles sont donc bien fonctionnelles ! Comme attendu, aucune conversion n'est obtenue si on exprime uniquement l'adrénodoxine toute seule ou la P45011 toute seule. Mais, ce qui est surprenant, est que l'on détecte aussi un niveau de bioconversion tout à fait correct si on exprime uniquement la P45011 et l'adrénodoxine, sans l'adrénodoxine réductase. On s'aperçoit donc que l'ADR hétérologue est en fait optionnelle ; la levure apparemment produit déjà pour ses fins, qui ne sont d'ailleurs pas connues, une protéine équivalente à l'ADR.

En résumé : la dernière étape a effectivement lieu dans la membrane interne des mitochondries, et *Saccharomyces cerevisiae* exprime une protéine analogue à l'adrénodoxine réductase de mammifère, l'ARH1p (Figure 22).

Faisons, à ce stade, le point sur le fonctionnement de la levure. On a d'abord essayé d'exprimer individuellement dans la levure chaque étape en vérifiant qu'elles étaient bien fonctionnelles. On a même réussi à enchaîner les deux premières étapes et inactivé les réactions parasites. Maintenant il s'agit de tout rassembler et d'observer le fonctionnement

global. Correspondra-t-il à nos attentes ?

Avant d'avoir la réponse expérimentale, si on compare finalement une cellule surrénale avec ce que va devenir notre levure modifiée, on voit qu'il y a certaines différences au niveau des deux P450 mitochondriales. Dans les surrénales elles sont toutes les deux exprimées au niveau des mitochondries, alors que dans notre levure, la P450scc est localisée au niveau de la membrane

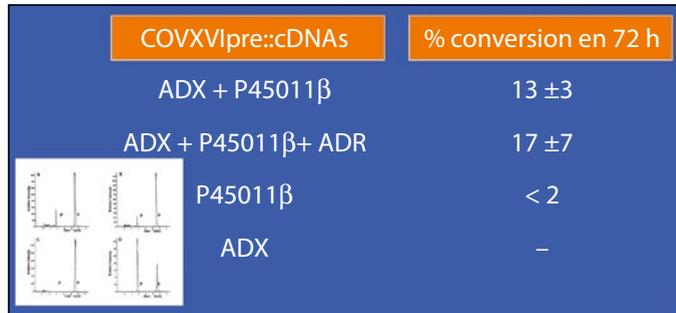


Figure 21

Conversion du 11-désoxycortisol en hydrocortisone en présence ou en absence de P45011, d'adrénodoxine (ADX) et d'adrénodoxine réductase (ADR).

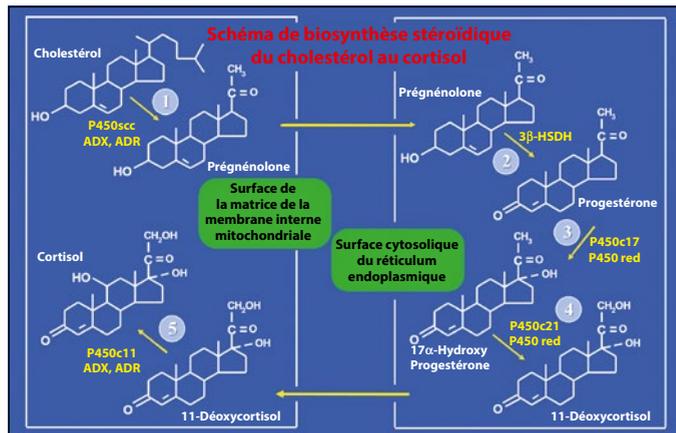


Figure 22

Voie de biosynthèse de l'hydrocortisone à partir du cholestérol.

plasmique, là où son nouveau substrat, le campestérol, est aussi localisé majoritairement, avec l'ADX au niveau du cytosol et l'ADR au niveau du réticulum endoplasmique. Pour la P450 11-hydroxylase, en revanche, on a le même compartiment que dans les cellules surrénales, mais avec une réductase de levure, ARH1p, plutôt qu'une réductase hétérologue (Figure 23).

Passons aux données expérimentales : c'est l'arrivée finale de la saison 1 de cette longue saga, de 1992 à 2000. Un tracé HPLC¹⁵ montre le succès complet (Figure 24). On a fermenté cette levure à partir

15. HPLC (« High Performance Liquid Chromatography ») : chromatographie liquide à haute performance, méthode d'analyse par séparation des constituants d'un mélange.

Figure 23
Différences entre une cellule surrénale de mammifère et une levure modifiée.

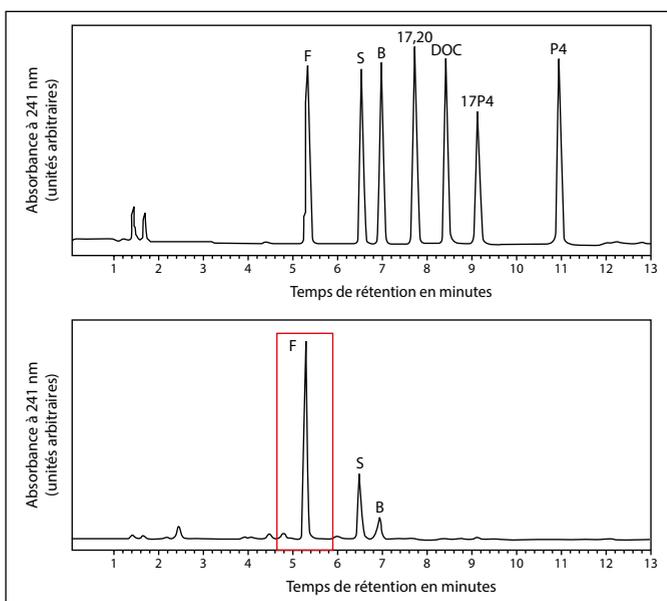
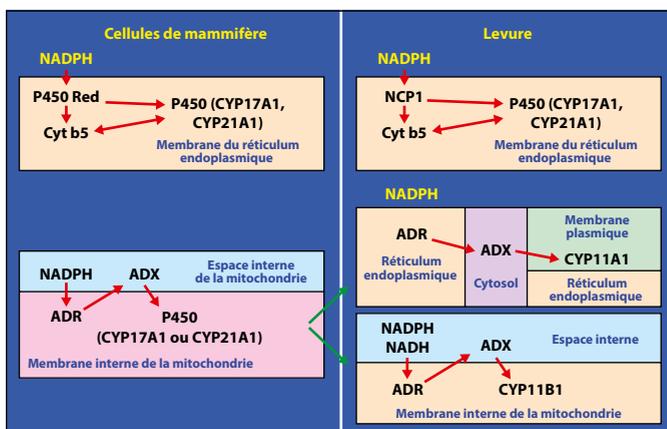


Figure 24
Mise en évidence de la production d'hydrocortisone (pic F) par la levure avec d'autres produits secondaires : 11-déoxycortisol (pic S) et corticostérone (pic B).

d'une source très simple de carbone, de l'éthanol, et on retrouve au niveau du milieu de fermentation un très joli pic correspondant à l'hydrocortisone (F). Des pics secondaires (S et B) correspondent respectivement à un substrat, le 11-déoxycortisol, qui n'est pas totalement transformé en hydrocortisone, et une petite partie de corticostérone qui appartient à la voie secondaire des minéralocorticoïdes. L'objectif de réaliser la biosynthèse de l'hydrocortisone en utilisant une levure était réussi !

3 Passage à la biosynthèse industrielle

Les résultats ont eu l'honneur de paraître sur la couverture de *Nature Biotechnology* en 2003, « *Redesigning steroid pathways in yeast* », et ont même fait les titres de la grande presse nationale.

Le journal Libération a titré « *Un champignon 13 fois transgénique !* ». Si cette synthèse journalistique fait un peu peur, pour nous c'était une grande joie ; il met bien l'accent sur la performance des transformations génétiques à des fins utiles. La **Figure 26** résume schématiquement les opérations de génie génétique réalisées au sein de la levure productrice d'hydrocortisone : on y retrouve l'expression hétérologue d'un certain nombre de protéines dont la $\Delta 7$ -stérol réductase d'origine végétale et les autres d'origine bovine : la P450_{scc} (CYP11A1) avec ses partenaires, l'adrénodoxine et l'adrénodoxine réductase, puis la 3-HSDH, la

P450 17 hydroxylase (CYP17A1) et la P450 21-hydroxylase (CYP21A1). On retrouve aussi la P450 11 β -hydroxylase (CYP11B1) mature et ses partenaires, exprimées à l'aide d'une pré-séquence COXVI qui les cible aux mitochondries. Ensuite, au-delà de l'expression hétérologue, on a aussi modulé l'expression pour en obtenir le niveau optimal, pour la réductase de levure NCP1 et pour les gènes ARH1, homologue de ADR fourni par la levure, et ATF2 – l'acétyl transférase ; on a aussi inactivé des gènes, le ERG5 de la $\Delta 22$ -désaturase qui introduit le méthyle en 24, ainsi que les gènes GCY1, YPR1 et ATF2, responsables des réactions parasites.

Dans la partie droite de la **Figure 25** on précise que, selon les cas, chaque gène a pu être intégré en simple ou en multiple copie d'une façon intragénique (en perturbant par là même un autre gène que l'on souhaitait inactiver), ou bien

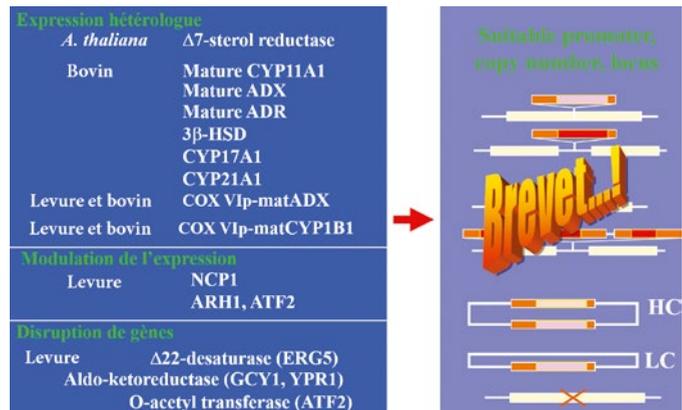


Figure 25

Récapitulatif de toutes les protéines, avec leur provenance, utilisées pour la biosynthèse d'hydrocortisone par la levure et des approches utilisées pour en moduler l'expression à des niveaux optimaux.

d'une façon inter-génique. Dans d'autres cas, l'expression de chaque protéine a pu être modulée en changeant le promoteur du gène respectif, ou bien en choisissant d'intégrer ce gène dans un plasmide à haut nombre de

copies (HC) ou à faible nombre de copies (LC). D'autres gènes ont été inactivés par différents moyens.

Toute cette construction vraiment très complexe a fait l'objet d'un brevet qui est toujours en place.

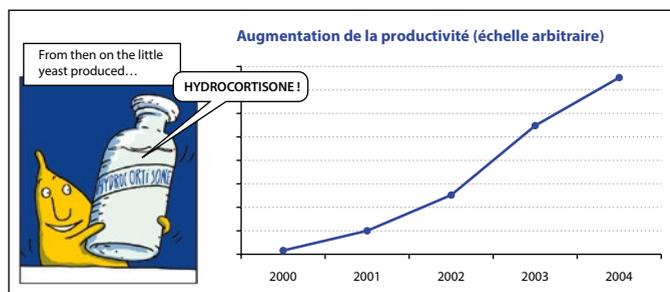
La suite de la « saga »

Dans le langage courant, le mot « saga » est souvent utilisé de manière métaphorique pour désigner une histoire passionnante qui connaît de nombreux épisodes ou rebondissements. Cela s'applique bien à l'aventure dont ce chapitre a tenté de résumer les grandes lignes. Restons dans la métaphore : tout ce qui précède, la phase de recherche, peut être appelée « saison 1 ». La saga continue jusqu'à nos jours à travers la « saison 2 », phase de développement qui a visé à passer d'une production de l'hydrocortisone de quelques dizaines ou centaines de milligrammes par litre à des niveaux compatibles avec une exploitation industrielle (**Figure 26**). Pas très facile tout cela !

En plus d'augmenter la capacité de la production, il y a eu lieu d'augmenter l'échelle de production (**Figure 27**). Cela s'est fait progres-

Figure 26

Fin de la saison 1 de la saga : la levure produit désormais de l'hydrocortisone. Évolution dans le temps de la productivité de la synthèse d'hydrocortisone sur une échelle arbitraire.



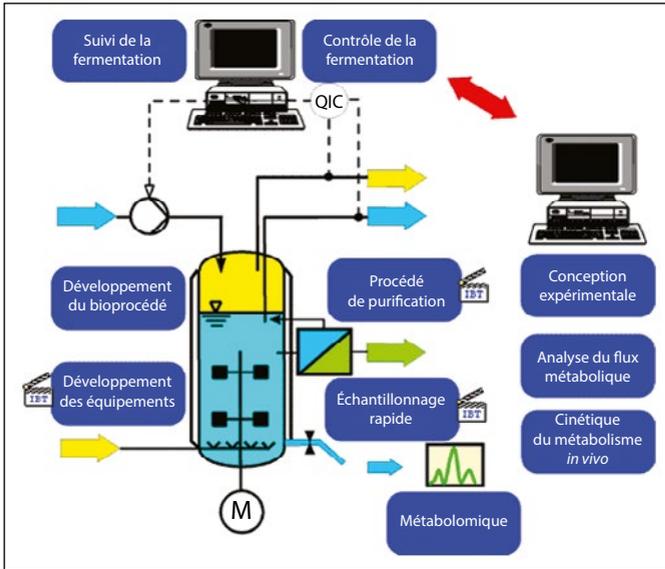


Figure 27

Vers un procédé industriel de fermentation et purification pour produire l'hydrocortisone dans l'usine.

sivement du flacon au petit fermenteur, au fermenteur pilote, au fermenteur industriel. Et tout cela avec un développement des procédés, de la fermentation, de la purification...

Nous pensons que la biosynthèse de l'hydrocortisone, telle que nous l'avons racontée, reste le seul projet de biologie synthétique de cette complexité qui soit arrivé si loin dans l'échelle industrielle, à savoir au niveau de fermenteurs de centaines de mètres cubes¹⁶.

Pour résumer, ce nouveau procédé, par rapport à l'ancien, permettrait :

- une consommation très réduite de réactifs et de solvants coûteux et polluants, car utilisant un simple milieu de fermentation avec un micro-organisme ; parallèlement, on aurait un temps de cycle plus court pour arriver jusqu'au bout (une seule étape à la place de neuf) ;

16. Dumas B., Spagnoli R. (2003). Synthèse totale de l'hydrocortisone dans la levure de boulanger, *Médecine/Sciences*, 11(19) : 1059-1061 ; Ménard Szczebara F., Chandelier C., Villeret C., Masurel A., Bourot S., Dupont C., Blanchard S., Groisillier A., Testet E., Costaglioli P., Cauet G., Degryse E., Balbuena D., Winter J., Achstetter T., Spagnoli R., Pompon D., Dumas B. (2003). Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast, *Nature Biotechnology*, 21 : 143-149.

– une disponibilité accrue du produit final qui peut laisser envisager la possibilité de l'utiliser comme intermédiaire pour produire aussi différents autres corticostéroïdes, comme la dexaméthasone, la bétaméthasone, etc. ;

– des unités opératoires plus importantes grâce à l'utilisation de fermenteurs de grand volume ;

– l'élimination de la production et stockage d'intermédiaires du procédé chimique, ce qui conduit *in fine* à un coût de production amélioré.

Le service marketing a créé en 2004 une brochure (**Figure 28**) avec en titre le slogan « *Biohydrocortisone ? Yes it's possible via the green way !* ». Bravo pour la créativité !

Toujours en 2004, au milieu du stand d'Aventis au CPhI, le salon international de l'industrie chimique pour la pharmacie, trônait une pyramide en perspex transparent qui contenait une ampoule remplie d'une poudre blanche. Ce n'était ni sel ni sucre, mais bien de l'hydrocortisone isolée à partir d'une fermentation de levure (**Figure 29**).

Pour conclure, indépendamment de toute autre considération sur l'issue finale, ce projet reste

Up to now, corticosteroids have been produced from raw materials of plant origin by a long sequence of chemical and biotechnological steps...

Aventis Global Bulk Sales

Bio-hydrocortisone - Yes, it's possible.

Technologies require constant change to keep in tune with new economical, ecological and safety requirements.

The world's first Bio-hydrocortisone

Aventis Pharma
102, route de Naisy
93235 BORMANVILLE Cedex
FRANCE
Contact :
TEL : +33 (0) 49 99 24 93
FAX : +33 (0) 49 99 38 37

Figure 28

Publicité pour l'hydrocortisone biologique, produite à partir de levures, d'Aventis (maintenant Sanofi).

Source : Aventis.



Figure 29

Stand d'Aventis au salon international CPhI de l'industrie pharmaceutique. La pyramide contient une ampoule remplie d'hydrocortisone isolée à partir d'une fermentation de levure.

Source : Aventis.

exemplaire d'une coopération réussie et d'un pari très ambitieux qui a rassemblé le secteur privé (industrie pharmaceutique et société de biotechnologie) et le secteur public (CNRS et différentes Universités). Ses résultats, nous les devons à une équipe de femmes et d'hommes motivés, tenaces, inventifs dont la « voix narrante » a été le chef de projet pendant la saison 1 et, dans cet article, le porte-parole.