

PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES DANS LES PLANTES

Dr Hélène Laparra

MERISTEM Therapeutics

8, rue des frères Lumière

63100 Clermont-Ferrand

Jusqu'à l'avènement du génie génétique, seules les protéines obtenues par extraction à partir des organismes vivants ou de cadavres pouvaient être utilisées à des fins thérapeutiques. Certaines protéines étaient si peu abondantes qu'elles ne pouvaient pas être obtenues en quantité suffisante par extraction (érythropoïétine).

Le génie génétique permet, de transférer la séquence codant une protéine dans une cellule eucaryote ou procaryote et de produire en principe cette protéine d'intérêt, ou protéine recombinante. Les bactéries, facilement transformables par des gènes étrangers et cultivées depuis longtemps à l'échelle industrielle, ont été les premières cellules sollicitées pour produire des protéines recombinantes.

C'est ainsi que désormais la majeure partie de l'insuline (traitement du diabète), la totalité de l'hormone de croissance humaine (traitement de certaines formes de nanisme) et la totalité de l'hormone de croissance bovine (augmenter la sécrétion lactée des ruminants) proviennent de bactéries recombinantes. Ces molécules ont une excellente activité biologique et elles sont plus pures que les hormones obtenues par extraction et ne présentent donc pas de risques pour les patients (cas de l'hormone de croissance humaine extraite d'hypophyses humaines qui a, dans certains cas, contaminé les patients par l'agent responsable de la maladie de Creutzfeld-Jacob).

Les bactéries, les levures et les cultures de cellules animales sont très largement utilisées pour la production de protéines recombinantes à usage thérapeutique. Cependant, ces procédés sont soit limités en productivité soit trop coûteux pour la mise en œuvre et le fonctionnement. Dans le cas de cultures de cellules animales, il est impératif de contrôler et d'assurer l'absence de pathogènes pour l'homme (virus, prions...). D'autres systèmes sont à l'étude pour la production de protéines recombinantes : les animaux transgéniques (sécrétion des protéines dans le lait) et les plantes transgéniques.

Historiquement, la première protéine obtenue à partir d'une plante transgénique à des fins médicales est l'hormone de croissance humaine en 1986. Il a été démontré par la suite que les plantes transgéniques sont aussi capables de produire des protéines plus complexes, constituées de sous-unités devant être assemblées par la cellule comme les anticorps (Ma et al, 2003). Outre les anticorps, des enzymes (digestives, protéases), des vaccins pour l'homme ou pour les animaux, des protéines plasmatiques, des allergènes, des cytokines ainsi que des outils de diagnostic ont pu être produits dans les plantes.

Différentes plantes sont utilisées pour la production de ces protéines. Des essais de culture en plein champs ont été menés avec du maïs, du riz, du carthame, de l'orge où

l'expression des protéines est ciblée dans les grains. Les essais en champs avec du tabac, de la laitue, de la luzerne ont permis d'avoir une biomasse foliaire pour extraire les protéines recombinantes. Certaines *Nicotiana* et *Brassica* ainsi que la mongette sont utilisées avec une technique de transfection virale. Les plantes suivantes ont été testées en serre : pomme de terre, tomate, tabac, banane, luzerne, Arabidopsis, soja, blé, millet, pois, betterave, colza. Les lentilles d'eau, les microalgues et la cameline sont cultivées en fermenteurs ou dérivés. De même, les suspensions de cellules isolées de tabac, de riz ou de mousse sont en cours d'étude.

La technologie la plus utilisée pour obtenir des plantes transgéniques qui pourront produire des protéines à usage thérapeutique, est celle basée sur la transformation d'explants via *Agrobacterium tumefaciens* (voir les sites suivants pour une description détaillée de cette technologie : http://www.univ-montp1.fr/biotech/Transgenese/transgenese_vegetale.htm et <http://web.ujf-grenoble.fr/PDC/OGM/Genes1.html>).

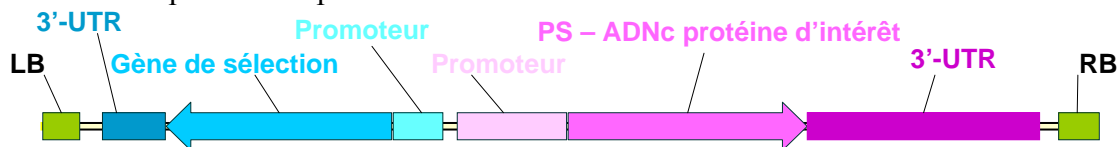
Au sein de MERISTEM Therapeutics, nous utilisons cette technologie sur nos deux plantes modèles : le tabac et le maïs.

Production de protéines recombinantes dans le tabac

Ce système de production présente les avantages suivants. Le protocole de transformation génétique du tabac est simple et rapide. Les semences produites par le tabac sont abondantes (jusqu'à 5 g de semences par plante) et permettent de semer de grandes surfaces (1 g de graines suffisent pour 1 hectare). Aucun croisement n'est possible avec des plantes alimentaires et un écimage des plantes est réalisé avant la floraison. Ainsi il n'y a pas de pollen ni des graines qui sont relâchés au champ.

En contrepartie, les taux d'expression sont en général faible (peu de protéines recombinantes par gramme de matière fraîche) et les coûts de récolte et de stockage de la matière foliaire sont très élevés (les feuilles doivent être congelées et stockées à -20°C).

Des vecteurs d'expression simples ont été créés avec des promoteurs chimériques afin d'obtenir une expression importante dans les feuilles.



Ci-dessous est schématisé par quelques photos le protocole d'obtention de tabacs transgéniques (adapté du protocole de Horsh *et al.*, 1985).



Des morceaux de feuilles (A) sont placés en contact avec l'agrobactérie portant le gène d'intérêt. Les cellules qui ont intégré l'ADN-T des agrobactéries vont se multiplier et se différencier en plantules (B). Ces plantules vont être bouturées pour favoriser le développement d'un système racinaire (C). Elles sont ensuite transférées à la serre (D). Les plantes sont criblées pour leur capacité à produire la protéine recombinante puis menées à graines (E).

Exemples de trois protéines recombinantes produites dans les plantes transgéniques de tabac

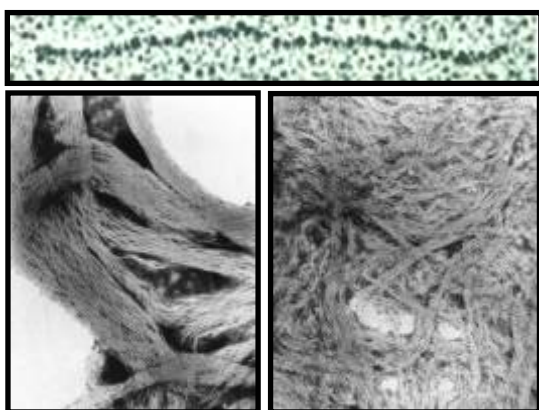
- production d'allergènes dans le tabac :

En collaboration avec Stallergènes, nous avons produit la protéine Der p 1 issue de *Dermatophagoides pteronyssinus* (acarien de la poussière). Cette protéine est la cause principale des allergies aux acariens de la poussière. Une production importante de la protéine Der p 1 recombinante est nécessaire pour envisager la désensibilisation des patients allergiques. L'allergène recombinant Der p 1 a été purifié à partir de plantes et testé *in vitro* (réactivité aux IgE, activation des cellules basophiles et prolifération de lymphocytes T issus de sera de patients sensibilisés aux acariens de la poussière). Les résultats obtenus ont montré que le Der p 1 recombinant a des propriétés similaires à celles du Der p 1 natif issu des acariens.

- Importance du ciblage des protéines au sein de la cellule végétale : cas de la lipase gastrique

Des tabacs transgéniques exprimant la lipase gastrique de chien ont été produits. La lipase est une molécule potentielle du traitement des insuffisances pancréatiques exocrines. A la chaîne codante de l'ADNc de la lipase, deux peptides signaux différents ont été ajoutés afin d'avoir une protéine localisée soit dans la vacuole soit à l'extérieur de la cellule. Dans les deux cas, une protéine recombinante active et glycosylée a été obtenue. Toutefois la maturation protéolytique et l'activité spécifique des protéines recombinantes dépendent de la compartimentation subcellulaire. En effet, en sécrétion, 70% des protéines sont matures et 30% sont délétées de trois acides aminés. Lors du ciblage dans la vacuole, aucune forme mature de la protéine n'a été détectée alors que la délétion de 4, 8 et 54 acides aminés donnent respectivement des proportions de 40, 10 et 50% des protéines recombinantes (Gruber *et al.*, 2001).

- production de collagène humain dans les feuilles de tabac



Des tabacs transgéniques exprimant le collagène ont été produits (Ruggiero *et al.*, 2000).

Le collagène produit et purifié, forme dans les conditions adéquates une triple hélice stable ($T_m = 30^\circ\text{C}$) et des fibrilles *in vitro* (voir photos ci-contre).

A partir du meilleur expresseur, des suspensions cellulaires ont été initiées. Le collagène n'a pas été détecté dans le milieu. Des expériences d'immunomarquage ont été réalisées avec les feuilles de tabacs transgéniques produisant le collagène. Nous avons ainsi montré que le collagène s'accumulait dans le cytoplasme des cellules dans des petites vésicules.

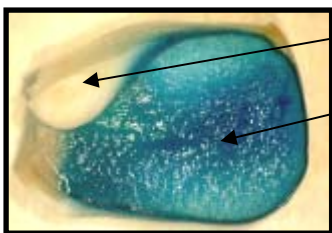
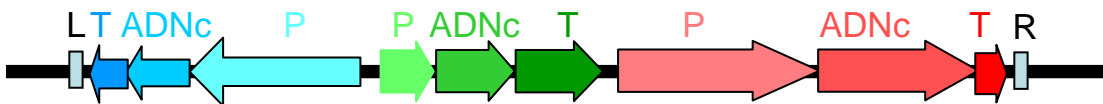
Malgré la présence d'un peptide signal qui oriente le protéine recombinante vers la voie de sécrétion, il est possible, comme c'est le cas pour le collagène, que la protéine recombinante reste à l'intérieur de la cellule.

Production de protéines recombinantes dans le maïs

Les principaux avantages de ce système de production sont les suivants : les protéines recombinantes sont produites et accumulées dans l'albumen du grain de maïs. La biomasse peut être stockée à long terme sans effet sur les protéines recombinantes (Stoger E *et al*, 2000). Les taux d'expression dans le maïs sont généralement élevés. Les pratiques culturales sont maîtrisées (utilisation de plantes mâles stériles, isolement et suivi des parcelles).

Mais ce système présente aussi des inconvénients. Le génotype utilisé dans les transformations de plantes est le génotype A188, sensible à de nombreux stress et à de nombreuses maladies. Le protocole de transformation est long et requiert un savoir-faire. Les efficacités de transformation sont faibles (peu de plantes transgéniques obtenues par rapport au nombre initial d'explants mis en contact avec les agrobactéries). De plus, pour une production à grande échelle, le transgène doit être introgressé dans des lignées élites pour augmenter la biomasse (programme de 3 ans au minimum).

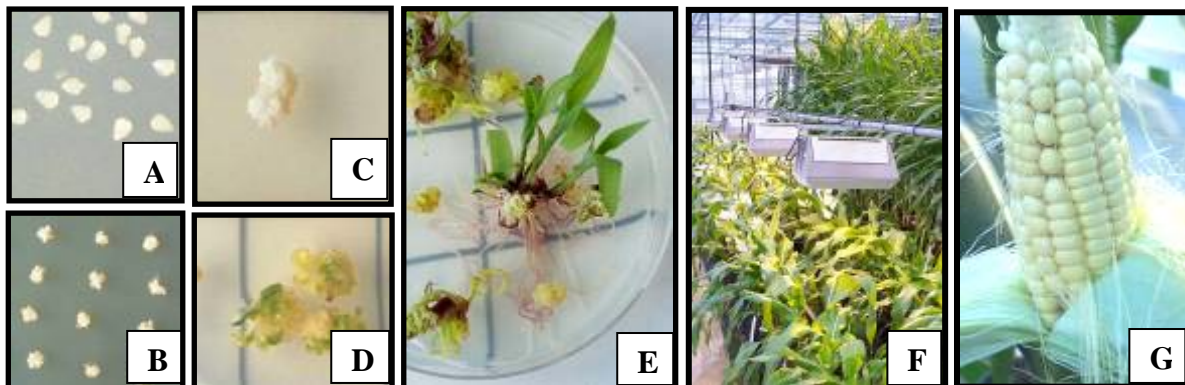
Les vecteurs d'expression ont été créés spécifiquement pour le maïs du fait de la spécificité spatio-temporelle de l'expression des protéines recombinantes dans l'albumen.



Embryon

Seul l'albumen d'une plante transgénique exprimant l'enzyme β -glucuronidase est coloré en bleu (indiquant la présence de cette protéine recombinante).

Ci-dessous est schématisé par quelques photos le protocole d'obtention de maïs transgéniques (adapté du protocole de Ishida *et al.*, 1996).



Des embryons de 1 mm de long (A) sont mis en contact avec l'agrobactérie portant le gène d'intérêt. Plusieurs étapes de repiquage sont nécessaires pour que les embryons se développent en cals embryogènes (B-C). A la suite du passage à la lumière (D), les plantules vont se développer et pourront être isolées (E). Elles sont ensuite transférées en serre (F) puis fécondées. Les albumens des épis obtenus (G) sont testés au niveau biochimique afin de trouver les meilleurs expresseurs qui sont conservés et multipliés lors des générations suivantes. Par ailleurs des analyses moléculaires sont réalisées pour identifier les plantes

ayant un seul site d'insertion de l'ADN-T.

Exemples de deux protéines recombinantes produites dans les plantes transgéniques de maïs

- production de la lipase (Merispase)

Le gène de la lipase gastrique de chien a été introduit dans le maïs. Les taux d'expression sont meilleurs que ceux obtenus avec le tabac (1 à 1,5 g de lipase par kg de grains de maïs). Le gène a été introgressé dans les lignées élite de Limagrain afin d'obtenir un hybride pour la production à grande échelle en champs.

La lipase recombinante est destinée aux patients souffrant d'insuffisances pancréatiques exocrines et par conséquent d'une mauvaise absorption des lipides. La lipase recombinante sera administrée par voie orale. Cette molécule a franchi avec succès les études toxicologiques sur animaux, les essais cliniques de phase I (volontaires sains). Ces premières phases ont montré que la molécule n'était pas toxique et ne provoquait aucun effet secondaire. Son activité a été testée lors d'une phase II sur des patients atteints de mucoviscidose.

- production d'anticorps

En collaboration avec Shantha West Inc. (Etats-Unis), nous avons produit des anticorps IgA monomériques. La cible de cette production est le traitement de certains cancers. Les tests *in vitro* sur des lignées cellulaires tumorales et des tests *in vivo* sur la souris ont montré une activité comparable de l'anticorps recombinant produit dans le maïs avec l'anticorps produit dans les cellules animales.

Conclusions

Les systèmes de production de protéines à intérêt pharmaceutique par les plantes présentent les caractéristiques et les avantages suivants :

- les cellules végétales étant des cellules eucaryotes (comme les cellules humaines), elles disposent d'un système permettant dans de nombreux cas de produire des protéines complexes ayant des propriétés thérapeutiques équivalentes aux protéines humaines ;
- le niveau actuel des biotechnologies végétales permet de cibler de façon spécifique les tissus dans lesquels s'exprimera la protéine d'intérêt. En particulier, dans le cas du maïs, la protéine peut être ciblée dans les grains, permettant un stockage efficace et facilitant l'extraction et la purification de la protéine d'intérêt ;
- l'extension de la culture des plantes productrices avec les infrastructures agricoles existantes permet une montée en puissance rapide et économique des capacités de production ;
- il n'existe pas, en l'état actuel des connaissances, de virus végétaux capables d'infecter l'animal et l'homme, éliminant ainsi le risque par exemple d'infection ou de contamination virale par les protéines produites par les plantes, à la différence des protéines produites par des cellules de mammifères ou d'animaux transgéniques.

Toutefois la production de protéines recombinantes dans les plantes présente des inconvénients (des risques) :

- l'absence de mycotoxines ou de pesticides dans le produit purifié doit être démontrée ;
- problèmes de glycosylation : même si les plantes sont capables de glycosyler les protéines avec des sucres complexes, ces sucres ne sont pas identiques à ceux des protéines animales ;
- polémique OGM et perception du public ;
- filières OGM « thérapeutiques » et chaîne alimentaire doivent être séparées ;

En conclusion, la production de protéines recombinantes par le système plante est très attractive et peut être considérée comme une réelle alternative aux systèmes conventionnels. Il conviendra cependant de développer le système de production et de purification des principes actifs en accord avec les exigences des instances réglementaire afin d'obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM)

Références

Sites sur les PMP

<http://www.cpmp2005.org/home.aspx> (voir Archive cPMP2005 avec les présentations en ligne)

Sites sur les OGM

<http://ucbiotech.org/resources/presentations/presentations.html>

<http://www.inra.fr/internet/Directions/DIC/ACTUALITES/DOSSIERS/OGM/houdme.htm>

Gruber, V *et al.* (2001). Large-scale production of a therapeutic protein in transgenic tobacco plants : effect of subcellular targeting on quality of a recombinant dog gastric lipase. *Molecular Breeding* 7, 329-40.

Horsh, RB *et al.* (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.

Ishida, Y., *et al* (1996). High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* 4, 745-750.

Ma, J *et al.* (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature reviews/Genetics*, 4, 794-805.

Stoger, E *et al.* (2000). Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant mol. Biol.*, 42 583-590.

Ruggiero, F *et al.* (2000). Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. *FEBS LETTERS*, 469, 132 – 136.