

La production de protéines à usage biopharmaceutique dans les plantes

Loïc Faye
Nathalie Landry
Patrice Lerouge
Véronique Gomord
Louis-P. Vézina

Les plantes répondent à plusieurs des critères recherchés dans les nouvelles usines cellulaires : elles ont une machinerie cellulaire complexe et sophistiquée ; elles ne sont pas porteuses des agents pathogènes couramment associés aux infections humaines ; leur contenu cellulaire, hormis la protéine recombinante, est connu de l'homme par son utilisation dans l'alimentation, en cosmétique et en pharmacie. Les plantes peuvent être propagées à l'infini, leur production à grande échelle ou en conditions contrôlées fait partie du patrimoine culturel de toutes les nations et elles représentent la biomasse la moins onéreuse à produire à ce jour par unité de volume. Certaines d'entre elles peuvent être considérées comme des sources renouvelables de molécules, sans impact négatif mesurable sur l'environnement.

Les thérapies à base de peptides font l'objet d'un développement accéléré que les systèmes de production actuels ne peuvent soutenir, ni en volume, ni en qualité. Le nombre d'études cliniques pour des thérapies fondées sur la bioactivité de peptides dépassait les 400 à la fin de 1999. Les technologies de production actuelles, utilisant des bactéries ou des levures, ont subi des améliorations importantes durant la dernière décennie, mais elles ont en même temps démontré leurs limites pour la production de protéines complexes, et des limites face au *scale-up* et à la production à grand volume. Les systèmes utilisant des cellules eucaryotes plus évoluées, entre autre ceux utilisant les cellules de mammifères, ont montré leur capacité de produire des protéines complexes humanisées qui étaient inaccessibles aux autres systèmes de production. Ces technolo-

gies sont en plein essor, bénéficient d'un effort de développement important, mais souffrent toujours des limitations inhérentes à la production en bioréacteur, limitations quant aux volumes, aux investissements importants et à un rapport coût/volume élevé, qui laisse présager un choix difficile pour les systèmes de santé sociaux et les HMO (*health maintenance organisations*). Il est aussi à prévoir que les investissements importants nécessaires pour la production à grande échelle en bioréacteurs (cellules CHO – *Chinese hamster ovarian cell* – bactéries, etc.) sont des paramètres économiques qui renforceront la position dominante des leaders mondiaux actuels du secteur pharmaceutique, et donc certaines situations de monopole.

Le développement des plantes comme usine cellulaire, mis en route au niveau technique à la fin des années 1980, a donc été poussé par la

ADRESSES

L. Faye, P. Lerouge, V. Gomord : LTI-Cnrs UMR 6037, IFRMP 23, Université de Rouen, 76821 Rouen, France. N. Landry, L.P. Vézina : Medicago Inc, 2480 Hochelaga, Sainte-Foy, G1K 7P4, Québec, Canada.

demande sans cesse croissante de capacité de production en volume, et d'une capacité de *scale-up* ajustée au besoin des essais cliniques. Elle répond aussi à une intolérance sociale croissante envers l'utilisation pharmaceutique de peptides purifiés à partir de sources potentiellement porteuses d'agents pathogènes, à une tendance globale vers la réduction du support des États pour les soins de santé et à une prise de conscience des dangers et des limitations de la monopolisation de l'industrie pharmaceutique.

Les différents systèmes végétaux de production de protéines recombinantes

La production de molécules recombinantes à l'aide des végétaux passe par la transgénèse. Les méthodes utilisées pour la transformation génétique des plantes s'apparentent à celles utilisées chez les levures ou les cellules de mammifères (par exemple, les CHO), et ne seront pas traitées dans cet article. Dans la plupart des systèmes végétaux utilisés pour la production de protéines recombinantes à grande échelle, les cellules végétales transformées ne sont pas multipliées *in vitro* dans des bioréacteurs, mais cultivées dans des conditions qui permettent la régénération de plantes mûres. Ce sont ces plantes mûres qui constituent l'« usine de production » et, à ce titre, les usines végétales se distinguent des autres systèmes de production.

Les systèmes d'expression utilisés chez les végétaux ont été adaptés aux impératifs anatomiques et physiologiques de cette grande classe d'organismes. A l'intérieur de cette grande classe, pour chacune des espèces visées, deux groupes de systèmes végétaux ont été développés pour bénéficier des sources de biomasse les plus accessibles et les plus communes, c'est-à-dire le feuillage et la graine. Chez le tabac, la luzerne et quelques autres espèces, le feuillage abondant est la cible de l'expression du transgène. Chez le maïs, le colza, le carthame, le soja et le riz, les vecteurs d'expression stimulent la production et l'accumulation des protéines recombinantes dans la graine. Chacune de ces stratégies a ses avantages et ses inconvé-

nients, et aucune d'entre elles ne semble convenir à l'expression de toutes les protéines visées. Les feuilles ont un métabolisme actif et complexe qui offre beaucoup de possibilités, mais elles ont aussi une activité protéasique importante qui limite l'accumulation de certaines protéines. Les graines présentent l'avantage d'avoir un contenu en eau moins élevé et offrent donc un milieu d'accumulation plus stable. En revanche, elles ne sont pas adaptées à la synthèse de certaines protéines complexes, et la nécessité d'attendre la floraison peut représenter un danger accru de dispersion du transgène.

Dans tout système de production hétérologue, la molécule recombinante doit être extraite et purifiée à partir de l'ensemble des protéines endogènes de l'organisme. Pour chaque système végétal faisant l'objet de développement commercial, l'enjeu de la récupération est au centre même de la rentabilisation du procédé. La purification d'une protéine recombinante compte en effet pour plus de 80 % de ses coûts de production. Lorsqu'elle est séparée de l'environnement moléculaire complexe de la cellule végétale, la protéine recombinante peut être purifiée par des méthodes traditionnelles de chromatographie ou d'électrophorèse. Ce sont les phases initiales d'extraction et de purification qui posent problème dans la plupart des cas, en particulier en raison de la protéolyse rapide qui a lieu dès l'homogénéisation des tissus. Certaines stratégies de production ont été développées pour effectuer les phases initiales de purification de façon simplifiée. Par exemple, chez certaines plantes oléagineuses, la protéine recombinante est fusionnée à une protéine qui fait partie des globules lipidiques qui s'accumulent lors de la maturation de la graine. En combinant cette fusion avec une expression ciblée dans la graine, les chercheurs ont mis au point un système d'expression/purification simple par lequel la protéine recombinante est récupérée par centrifugation avec les lipides lors d'une première homogénéisation. Ensuite, la protéine recombinante est séparée de la fusion par protéolyse dirigée, puis de la fraction lipidique lors d'une seconde séparation de phase.

Cette stratégie a été utilisée pour la production dans le colza de l'hirudine, un anticoagulant sécrété par les glandes salivaires de sangsue [1, 2]. Des systèmes similaires (visant à réduire la protéolyse des protéines d'intérêt) ont été développés pour mettre à profit les particularités des autres tissus utilisés, notamment le contenu du feuillage chez la luzerne. L'enjeu technique et économique du *scale-up* suit en importance celui de la récupération. La luzerne est probablement le système le mieux adapté aux exigences combinées des tests cliniques et de la réglementation. A la suite de la transformation génétique, le passage par le stade de cals non-différenciés engendre une masse cellulaire qui peut être multipliée rapidement *in vitro* et qui peut produire les premiers extraits qui serviront aux tests de bioactivité. Lorsqu'une lignée transgénique de luzerne est sélectionnée pour ses caractéristiques de productivité en protéine recombinante (protéine dont la bioactivité a déjà été démontrée dans des extraits cellulaires), elle peut être immédiatement régénérée et propagée par bouturage. Ce système engendre rapidement des clones identiques qui peuvent être utilisés pour la production de micro-quantités de protéines recombinantes, souvent suffisantes pour couvrir les besoins d'essais pré-cliniques. Ces plantes représentent aussi une population clonale de laquelle peuvent être dérivés des embryons somatiques qui servent à établir la biomasse nécessaire pour couvrir les besoins annuels de molécules recombinantes. Cette population constitue la biomasse qui servira à la validation du procédé et de la source pour les besoins de la réglementation. Les avantages de la luzerne sont donc sa remarquable capacité de régénération et sa pérennité. D'une part, sa capacité de régénération lui donne les qualités utilisées pour la propagation et, d'autre part, sa pérennité lui donne des avantages indiscutables pour la validation des procédés. Les plantes de départ et tous les clones obtenus par bouturage ou embryogenèse sont homologues, peuvent être conservés en serres pendant des années, et constituent une population d'une homogénéité et d'une stabilité beaucoup plus grandes que les lots de graines obtenus.

nus par rétro-croisement chez le maïs ou chez les autres plantes à graines.

Contexte industriel

La moléculaire (production de molécules recombinantes chez les végétaux) est passée en une dizaine d'années du stade de la validation de concept au stade de la production industrielle. Fait important à considérer dans ce domaine technologique et industriel, la propriété intellectuelle sur les méthodes de transgénèse et d'expression est utilisée de façon à limiter l'émergence de compétition, et donc peu de nouveaux systèmes de production sont apparus durant la deuxième moitié des années 1990.

Parallèlement, les systèmes existants ont trouvé de bonnes opportunités de développement, et plusieurs plates-formes produisent des peptides ou des protéines qui font actuellement l'objet de tests cliniques. L'industrie de la « moléculaire » est en pleine expansion, et quelques compagnies se sont dotées d'installations conformes aux normes de Bonnes Pratiques de Fabrication, permettant de satisfaire aux exigences réglementaires élevées de l'industrie pharmaceutique.

La « moléculaire » entend offrir à l'industrie pharmaceutique des alternatives aux systèmes de production actuels, et doit faire face à la résistance aux changements, manifestée par certaines sociétés pharmaceutiques. Cette résistance devrait aller en s'atténuant, avec la progression en tests cliniques des premiers composés recombinants d'origine végétale.

Versatilité et potentialité des systèmes végétaux

Au cours des dernières années, plusieurs protéines d'intérêt pharmaceutique ont été produites dans les plantes. Le *Tableau I* résume ces principales réalisations. Les quelques commentaires ajoutés à cette liste mettent en lumière les avantages des plantes dans la production des différentes catégories de protéines.

Protéines sanguines et plasmatiques

Les protéines sanguines et plasmatiques sont produites actuellement

par extraction à partir d'échantillons de sang non retenu pour des besoins de transfusion. Cette méthode comporte certaines limites qui ont des répercussions sur l'industrie du fractionnement: (1) les approvisionnements ne peuvent pas fluctuer avec la demande; et (2) la source est considérée par le public comme dangereuse et variable, et fait l'objet d'ajouts réglementaires récurrents qui rendent son approvisionnement et son coût imprévisibles. Également, la contamination possible des sources par des virus et des prions demeure une préoccupation majeure. De nombreuses protéines plasmatiques ont déjà été produites chez les plantes. Ainsi l'albumine humaine, une protéine plasmatique utilisée dans le contrôle de l'hypovolémie et de l'hypoalbuminémie survenant au cours de certaines interventions chirurgicales et comme excipient de plusieurs médicaments, a été produite avec succès dans la pomme de terre et le tabac [3]. Le marché actuel pour l'albumine est de 1,4 milliard de dollars américains et la demande annuelle excède les 100 tonnes métriques [4]. La quantité importante nécessaire pour répondre aux besoins font donc de la plante un système idéal de production. D'autres protéines du même groupe comme l'aprotinine [5], des enképhalines [6] et l'hémoglobine [7] ont été produites dans divers systèmes végétaux d'expression. Le collagène I [8], une molécule assemblée en triple hélice impliquée dans plusieurs mécanismes complexes comme l'organogénèse, l'arrimage et la prolifération cellulaire, l'hémostase et la régénération de tissus, a également été produit dans des plantes de tabac en vue d'une utilisation thérapeutique mais aussi dans l'industrie cosmétique.

Vaccins

La nature comestible des plantes représente un atout majeur dans la production de vaccins, qu'ils soient destinés à l'homme ou aux animaux. En effet, il est possible de déclencher une réponse immunitaire par administration d'un antigène par voie orale. Ainsi, dans le cas du virus de l'hépatite B – qui affecte plus de 2 milliards d'individus – un vaccin pouvant être facilement distribué et administré

dans les pays en voie de développement est hautement souhaitable. Des études menées chez la souris ont démontré que l'ingestion de pomme de terre exprimant un antigène de surface du virus de l'hépatite B déclenche une réponse immunitaire [9]. Plusieurs autres types d'antigènes, destinés à une administration orale ou parentérale, ont également été produits chez les végétaux, dans le but de vacciner contre différents pathogènes humains (*Tableau I*).

La mise au point d'un vaccin destiné à une administration orale nécessite un dosage précis de la quantité d'antigènes consommée. Des études sur l'hépatite B et sur une entérotoxine bactérienne par le *Boyce Thompson Institute* (Washington, États-Unis) permettront de mieux définir le potentiel des vaccins produits dans les plantes [9, 10]. Ce groupe, ainsi que plusieurs autres, tentent actuellement de démontrer que l'utilisation des plantes permettra de produire des vaccins peu coûteux pouvant facilement être distribués et administrés à la population tout en contribuant à diminuer les coûts globaux de vaccination.

Anticorps

La machinerie de biosynthèse et de maturation des protéines présente suffisamment d'homologies dans une cellule animale et dans une cellule végétale pour que de très nombreuses protéines à usage pharmaceutique d'origine mammifère aient été déjà produites avec succès dans des plantes transgéniques. Parmi ces succès majeurs, on peut rappeler la production de différents types d'anticorps recombinants tels que des IgG ou des IgA sécrétoires. Ces anticorps sont de plus en plus utilisés comme agents thérapeutiques et ils représentent aujourd'hui plus du tiers des protéines en cours d'essais cliniques aux États-Unis. Les anticorps sont des molécules complexes. Ainsi, les immunoglobulines de classe G sont des tétramères constitués de deux polypeptides identiques de 450 acides aminés (chaînes lourdes) et de deux polypeptides identiques de 250 acides aminés (chaînes légères). Ces quatre polypeptides constitutifs d'une molécule d'IgG sont reliés entre eux par plusieurs ponts disulfure (*figure 1*). La

Tableau I. La production de protéines à usage biopharmaceutique dans les plantes.

Catégorie	Protéine	Application et spécificité	Plante	Références
Protéines sanguines et plasmatisques	Albumine	Contrôle du volume sanguin, excipient	pomme de terre, tabac	[3]
	Aprotinine	Anti-fibrinolytique	maïs	[5]
	Collagène I homotrimérique	Agent homéostatique, scellant tissulaire et autres	tabac	[8]
Vaccins	Enképhalines	Analgésique	tabac	[6]
	Hémoglobine	Substitut sanguin	tabac	7
	Bet v 1	Traitement des allergies de type I	tabac	[38]
	Sous-unité de toxine B du choléra	Traitement du choléra	pomme de terre	[39]
	Glycoprotéine B du CMV	Traitement d'une infection par le cytomégalovirus	tabac	[40]
	Sous-unité de toxine B du choléra fusionnée avec insuline	Traitement du diabète auto-immun	pomme de terre	[41]
	Peptide D2 de la protéine B liant la fibronectine de <i>S. aureus</i>	Vaccin mucosal ne requérant pas d'adjuvant	haricot noir	[9]
	VP1	Traitement de la fièvre aphteuse	luzerne, haricot noir	[42, 43]
	Hémagglutinine	Traitement de la grippe	tabac	[44]
	Antigène de l'hépatite B	Traitement de l'hépatite B	tabac et pomme de terre	[9]
	Entérotoxine B de <i>E. coli</i>	Traitement des diarrhées	pomme de terre, tabac	[10]
	Épitope de <i>P. falciparum</i>	Traitement du paludisme	tabac	[45]
	Anticorps	Protéine de capsid du virus de Norwalk	Traitement des diarrhées causées par le virus de Norwalk	tabac, pomme de terre
Protéine G du virus de la rage		Vaccination contre la rage	tabac, épinard, tomate	[47]
Auto-antigène		Traitement du diabète auto-immun	pomme de terre	[48]
IgG C5-1		Anti-IgG diagnostique	luzerne	[13]
IgA contre <i>S. mutans</i>		Prévention de carie dentaire	tabac	[12, 48]
Hormones, cytokines et facteurs de croissance	IgG contre la créatine kinase	Anticorps diagnostique	tabac	[15]
	IgG contre l'antigène tumoral CO17-1A	Traitement du cancer du côlon	tabac	[16]
	ScFv contre antigène carcino-embryonnaire (CEA)	Traitement des cancers	céréales	[17]
	GM-CSF	Facteur de croissance hématopoïétique utilisé dans le traitement de neutropénie	tabac	[19, 49]
	Interféron β	Traitement d'hépatites B et C	tabac	[50]
	Interféron α	Traitement d'hépatites B et C	tabac	[51]
	Somatotropine (hGH)	Traitement des désordres de croissance	tabac (chloroplastes)	[14]
	Érythropoïétine	Traitement de l'anémie	tabac (cellules)	[52]
	Epidermal growth factor (EGF)	Contrôle de prolifération cellulaire	tabac	[20]
	Enzymes	Enzyme de conversion de l'angiotensine	Hypertension	tabac et tomate
Protéine c (protéase sérique)		Anti-coagulant	tabac	[21]
Glucocérébrosidase		Maladie de Gaucher	tabac	[21, 54]
Autres	α -trichosantine	Inhibe la réplication du VIH	tabac	[22]
	Hirudine	Anti-coagulant	tabac, colza	[1, 2]
	Lactoferrine humaine	Anti-microbien	tabac	[55]

complexité d'une IgA sécrétoire est encore plus grande puisque ces immunoglobulines sont constituées de quatre chaînes lourdes et de quatre chaînes légères reliées entre elles par deux polypeptides. L'assemblage d'une molécule d'IgA sécrétoire nécessite l'intervention successive de deux types cellulaires distincts chez les mammifères. Ces deux types d'anticorps ont été produits avec succès sous forme biologiquement active dans des plantes transgéniques, ce qui illustre la grande capacité de la machinerie cellulaire végétale d'assembler des protéines de mammifères, même lorsqu'elles sont extrêmement complexes.

Plus d'une centaine d'études cliniques utilisant des anticorps sont actuellement en cours dans le traitement de diverses maladies comme les dysfonctionnements du système immunitaire, les maladies inflammatoires, certains cancers, des désordres du système nerveux central et des maladies infectieuses. La plupart des applications proposées nécessitent l'utilisation d'anticorps complets. Exception faite des hybridomes, seules les cellules de mammifères, les animaux transgéniques ou les plantes transgéniques sont capables d'associer les chaînes lourdes et légères constitutives de l'anticorps par des ponts disulfure. La culture de cellules mammifères est un procédé coûteux ayant une capacité limitée. Les investissements requis pour construire et élaborer une unité de fermentation de cellules de mammifères sont importants (environ 200 millions de dollars US pour une capacité annuelle de 200 kg d'anticorps) [38], et la capacité totale annuelle de production d'anticorps monoclonaux (en hybridomes ou recombinants) ne dépasse pas 1 000 kg, tous anticorps confondus. Certaines indications, comme l'utilisation de l'anticorps Herceptin dans le traitement du cancer du sein, requièrent l'administration de plusieurs grammes d'anticorps par dose. L'immense intérêt de ce traitement fera croître la demande au-dessus du niveau des 100 kg en 2002. Une telle quantité pourrait être produite par « moléculture » pour environ le dixième des investissements de départ et des coûts de production [11].

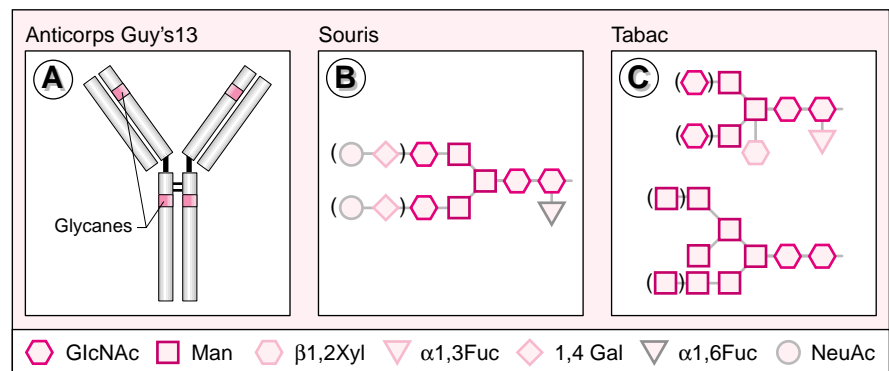


Figure 1. **Glycosylation de l'anticorps Guy's 13.** L'anticorps monoclonal Guy's 13 est une IgG1 présentant deux sites de N-glycosylation, représentés en rouge sur la chaîne lourde (A). Cet anticorps spécifique d'une adhésine de *Streptococcus mutans* a été produit sous une forme biologiquement active utilisable pour lutter contre la carie dentaire, dans des hybridomes (B) et dans des plantes de tabac (C). Les structures des N-glycanes de l'anticorps murin (B) et du planticorps (C) illustrent les différences majeures observées dans la glycosylation de cet anticorps lorsqu'il est produit dans l'un ou l'autre système.

La première démonstration de production d'anticorps dans des plantes a été effectuée en 1989 par Hiatt *et al.* [12]. Depuis, d'autres anticorps ou fragments d'anticorps à usage thérapeutique ont été produits dans divers systèmes végétaux, notamment des anticorps dirigés contre des immunoglobulines humaines [13], un antigène de *Streptococcus mutans* [12, 14], la créatine kinase [15] et un antigène tumoral d'un cancer du côlon [16]. Un fragment d'anticorps (appelé scFv) a également été produit contre l'antigène carcinoembryonnaire [17], un marqueur de croissance tumorale.

Facteurs de croissance, hormones et cytokines

Les facteurs de croissance, les hormones et les cytokines représentaient plus de 75 % des ventes totales des produits biopharmaceutiques en 1998 [18]. Les produits occupant la plus grande part de marché dans cette catégorie sont des facteurs de croissance du système hématopoïétique, l'érythropoïétine, G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*), GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) l'insuline. Plusieurs hormones et facteurs de croissance ont été exprimés dans le tabac : le GM-CSF, les interférons α et β , l'érythropoïétine et l'EGF (*epidermal*

growth factor) [19, 20]. Notons également que l'interleukine-2 a été produite dans la luzerne avec une bioactivité comparable à celle de la protéine recombinante d'origine bactérienne couramment utilisée en thérapie.

Enzymes et autres produits

Les enzymes constituent un groupe de produits biopharmaceutiques qui représentent un intérêt particulier pour le traitement de certaines maladies telles que les thromboses (urokinase), la maladie de Gaucher (algu-cérase) ou la mucoviscidose (altéplase) [18]. Les démonstrations faites chez les plantes pour la production d'enzymes à usage thérapeutique [21-23] sont concluantes au niveau de l'activité, de la sécurité, des coûts et de la capacité. Citons en exemple la glucocérébrosidase qui est actuellement produite commercialement à partir d'extraits de placentas humains. Jusqu'à 2 000 placentas sont requis pour fournir une dose standard, pour un coût de 100 000 à 400 000 dollars US par patient, sans compter les risques de contamination par les pathogènes humains. Lorsque le gène codant pour la glucocérébrosidase est exprimé dans le tabac, le contenu d'une seule feuille suffit à fournir la dose unique nécessaire. Seuls des problèmes liés à la

glycosylation de la protéine mûre retardent à ce jour l'entrée en test clinique de cette enzyme produite à partir des feuilles de tabac [4].

Conformité des protéines recombinantes produites dans les systèmes végétaux

Les quelques exemples cités précédemment montrent que les plantes offrent un très fort potentiel pour la production en masse de protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique. Cependant, sous leur forme actuelle, les plantes ne sont pas encore idéales pour la production de ces protéines parce qu'elles produisent des molécules dont la glycosylation n'est pas toujours compatible avec une application thérapeutique chez l'homme. Aussi, la modification de la capacité de glycosylation des plantes – de telle sorte que ce système d'expression soit mieux adapté à la production de glycoprotéines à usage thérapeutique – fait actuellement l'objet de très nombreux travaux de recherche.

Les « planticorps » présentent des glycanes immunogènes

Les anticorps produits chez les plantes, appelés « planticorps », devraient vraisemblablement remplacer de façon progressive les anticorps monoclonaux produits par des hybridomes pour de nombreuses applications diagnostiques ou thérapeutiques. Cependant, l'utilisation en thérapie, chez l'homme ou chez l'animal, de glycoprotéines recombinantes d'origine végétale est encore très limitée. En effet, comme cela est illustré dans la *figure 1*, chez les plantes, comme d'ailleurs chez tout autre hôte hétérologue utilisé pour la production de protéines recombinantes, la glycosylation est différente de celle observée chez les mammifères. Une étude récente de la N-glycosylation d'un anticorps produit dans un système mammifère et de son homologue produit dans des plantes de tabac illustre parfaitement ces différences. Il s'agit de l'anticorps monoclonal Guy's 13, spécifique d'une adhésine de *Streptococcus mutans*, une bactérie responsable de la carie dentaire [24]. Quand elle est

produite dans des hybridomes murins, cette IgG1 est glycosylée sur deux sites de N-glycosylation par des structures oligosaccharidiques (N-glycane) qui présentent un résidu α (1,6)-fucose et environ 10 % d'acide sialique terminal (*figure 1*). Lorsqu'il est produit sous forme recombinante dans des plantes de tabac, le planticorps Guy's 13 est également glycosylé sur les mêmes sites de N-glycosylation. En revanche, les N-glycane de ce planticorps sont de type oligo-mannosidique, des structures communes aux plantes et aux mammifères, mais aussi de type complexe. Dans ce dernier cas, leur structure est typique des végétaux. Ainsi, les N-glycane complexes associés au planticorps Guy's 13 présentent des caractéristiques structurales, telles que la présence de la β (1-2)-xylose et de l' α (1,3)-fucose, qui lui confèrent une forte immunogénicité chez certains mammifères [25], et en particulier chez l'homme. A l'issue de plusieurs études détaillées sur des anticorps produits dans des plantes transgéniques, il apparaît que ces planticorps sont fonctionnels, correctement repliés et glycosylés sur les bons sites de N-glycosylation, mais qu'ils présentent des glycanes fortement immunogènes. La présence d'oligosaccharides typiquement végétaux associés aux planticorps, comme d'ailleurs à toute autre glycoprotéine à usage thérapeutique produite dans une plante transgénique, limite leur utilisation en thérapie chez l'homme. En particulier, l'exposition prolongée à des quantités importantes de ces N-glycane végétaux immunogènes, quantités nécessaires pour certaines immunothérapies *in vivo*, aboutirait très probablement à une sensibilisation à ces antigènes de nature glucidique. Une autre difficulté associée à un usage thérapeutique des planticorps est que les N-glycane complexes végétaux sont immunogènes et participent à l'allergénicité de très nombreux allergènes glycosylés d'origine végétale [26, 27].

Vers une humanisation des glycoprotéines recombinantes d'origine végétale

Chez les plantes, comme chez les autres eucaryotes, la N-glycosylation

débuté de façon co-translationnelle dans le réticulum endoplasmique lors de l'association d'un précurseur oligosaccharidique ($\text{Glc}_3\text{Man}_0\text{GlcNAc}_2$) à certains résidus asparagine constitutifs de séquences consensus de N-glycosylation Asn-X-Ser/Thr portées par le polypeptide en cours de biosynthèse. Une fois cet oligosaccharide transféré sur la protéine néosynthétisée, de nombreuses réactions de maturation impliquant l'élimination ou l'association de résidus de sucres ont lieu dans le réticulum endoplasmique puis dans l'appareil de Golgi lors du transport de la glycoprotéine le long du système endomembranaire de sécrétion (*figures 2 et 3*). C'est seulement dans les compartiments tardifs de l'appareil de Golgi que la maturation des N-glycane diffère chez les plantes et chez les mammifères, en particulier avec l'ajout de β (1,2)-xylose et d' α (1,3)-fucose à de très nombreux N-glycane végétaux [28]. Afin d'utiliser pleinement l'énorme potentiel du système végétal pour la production de protéines à usage thérapeutique, il est nécessaire de bloquer ces maturations typiques des plantes pour obtenir des N-glycane humanisés sur les glycoprotéines recombinantes d'origine végétale. De nombreux travaux sont actuellement en cours afin de modifier la machinerie de glycosylation, non seulement chez les plantes mais aussi chez les levures, dans les cellules de mammifères ou d'insectes utilisées pour la production de protéines recombinantes. La plupart des stratégies étudiées afin d'humaniser les N-glycane chez ces différents organismes concernent l'inhibition de glycosyltransférases résidentes de l'appareil de Golgi ou l'expression de « nouvelles » glycosyltransférases dans ce compartiment. Des résultats encourageants ont déjà été obtenus grâce à ces stratégies sans pour autant qu'on ait encore réussi à produire des glycanes complètement humanisés dans aucun des systèmes utilisés pour la production de glycoprotéines recombinantes.

La rétention de la protéine recombinante dans le réticulum endoplasmique

Des informations concernant la glycosylation des protéines résidentes du

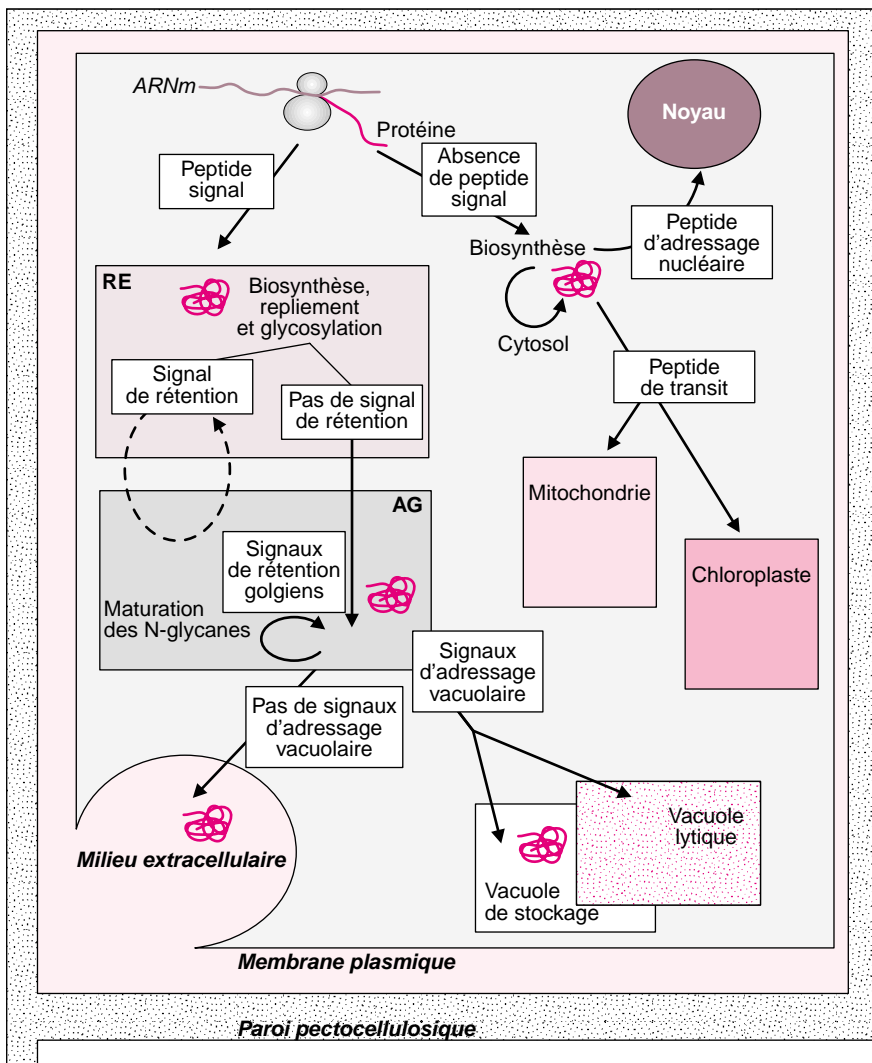


Figure 2. **Biosynthèse, transport et maturation des protéines dans la cellule végétale.** À l'exception de quelques protéines codées par le génome mitochondrial ou chloroplastique, la biosynthèse de la majorité des protéines végétales débute dans le cytosol. Pour une première population protéique qui ne présente pas de peptide signal, la biosynthèse a lieu dans le cytosol où la protéine se replie et s'accumule à moins qu'elle ne soit adressée de façon post-traductionnelle grâce à des signaux spécifiques vers le noyau, la mitochondrie ou le chloroplaste. Dans l'autre cas, la protéine présente un peptide signal, son élongation dans le cytosol s'arrête alors rapidement puis reprend lorsque la machinerie de biosynthèse s'installe sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE). La protéine est alors insérée de façon co-traductionnelle dans la lumière ou dans la membrane du réticulum endoplasmique selon qu'il s'agit d'une protéine soluble ou d'une protéine membranaire. Ces protéines vont se replier dans le réticulum endoplasmique où ont lieu des étapes essentielles de la maturation comme le clivage du peptide signal, la glycosylation et la formation de ponts disulfures. Les protéines solubles qui présentent à leur extrémité carboxy-terminale des signaux de rétention dans le réticulum endoplasmique (H/KDEL) vont s'accumuler dans ce compartiment. Une partie de cette population protéique dite « résidente du réticulum endoplasmique » échappe au réticulum endoplasmique et est recyclée vers ce compartiment en passant par l'appareil de Golgi (AG). Les protéines qui ne présentent pas de signal de rétention dans le réticulum endoplasmique sont transportées par l'intermédiaire de vésicules jusqu'à l'appareil de Golgi où ont lieu les principales étapes de la maturation des N-glycanes. Certaines protéines présentant des signaux spécifiques de rétention vont résider dans l'appareil de Golgi alors que les protéines solubles qui ne présentent pas d'autre signal d'adressage que le peptide signal sont transportées du réticulum endoplasmique jusqu'au milieu extracellulaire et la paroi pectocellulosique. En revanche, certaines protéines présentant des signaux peptidiques d'adressage vacuolaire seront triées dans l'appareil de Golgi puis transportées spécifiquement vers la vacuole de stockage ou la vacuole lytique.

partiment en passant par l'appareil de Golgi (AG). Les protéines qui ne présentent pas de signal de rétention dans le réticulum endoplasmique sont transportées par l'intermédiaire de vésicules jusqu'à l'appareil de Golgi où ont lieu les principales étapes de la maturation des N-glycanes. Certaines protéines présentant des signaux spécifiques de rétention vont résider dans l'appareil de Golgi alors que les protéines solubles qui ne présentent pas d'autre signal d'adressage que le peptide signal sont transportées du réticulum endoplasmique jusqu'au milieu extracellulaire et la paroi pectocellulosique. En revanche, certaines protéines présentant des signaux peptidiques d'adressage vacuolaire seront triées dans l'appareil de Golgi puis transportées spécifiquement vers la vacuole de stockage ou la vacuole lytique.

réticulum endoplasmique [29, 30] ont montré que ces réticuloplasmines naturelles portent des glycanes de structure oligo-mannosidique, commune aux plantes et aux mammifères, très probablement non immunogènes. Cette observation est à l'origine d'une des stratégies étudiées afin d'éviter l'association de glycanes immunogènes aux glycoprotéines recombinantes d'origine végétale. Cette stratégie consiste à stocker la glycoprotéine recombinante dans le

réticulum endoplasmique. Le stockage dans le réticulum endoplasmique est possible puisque l'ajout à l'extrémité carboxy-terminale d'une protéine recombinante d'un térapeptide de séquences K/HDEL permet sa rétention dans le réticulum endoplasmique des cellules végétales (figure 2) [31]. De plus, le stockage dans le réticulum endoplasmique présente un autre avantage puisque c'est dans ce compartiment du système endomembranaire de sécrétion que de très

nombreuses protéines recombinantes présentent leur plus grande stabilité dans la cellule végétale. Cependant, contrairement aux réticuloplasmines naturelles, la rétention de protéines recombinantes fusionnées avec une extension HDEL dépend exclusivement de l'efficacité de la machinerie de recyclage des protéines entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi [29]. En raison de ce recyclage de l'appareil de Golgi jusqu'au réticulum endoplasmique,

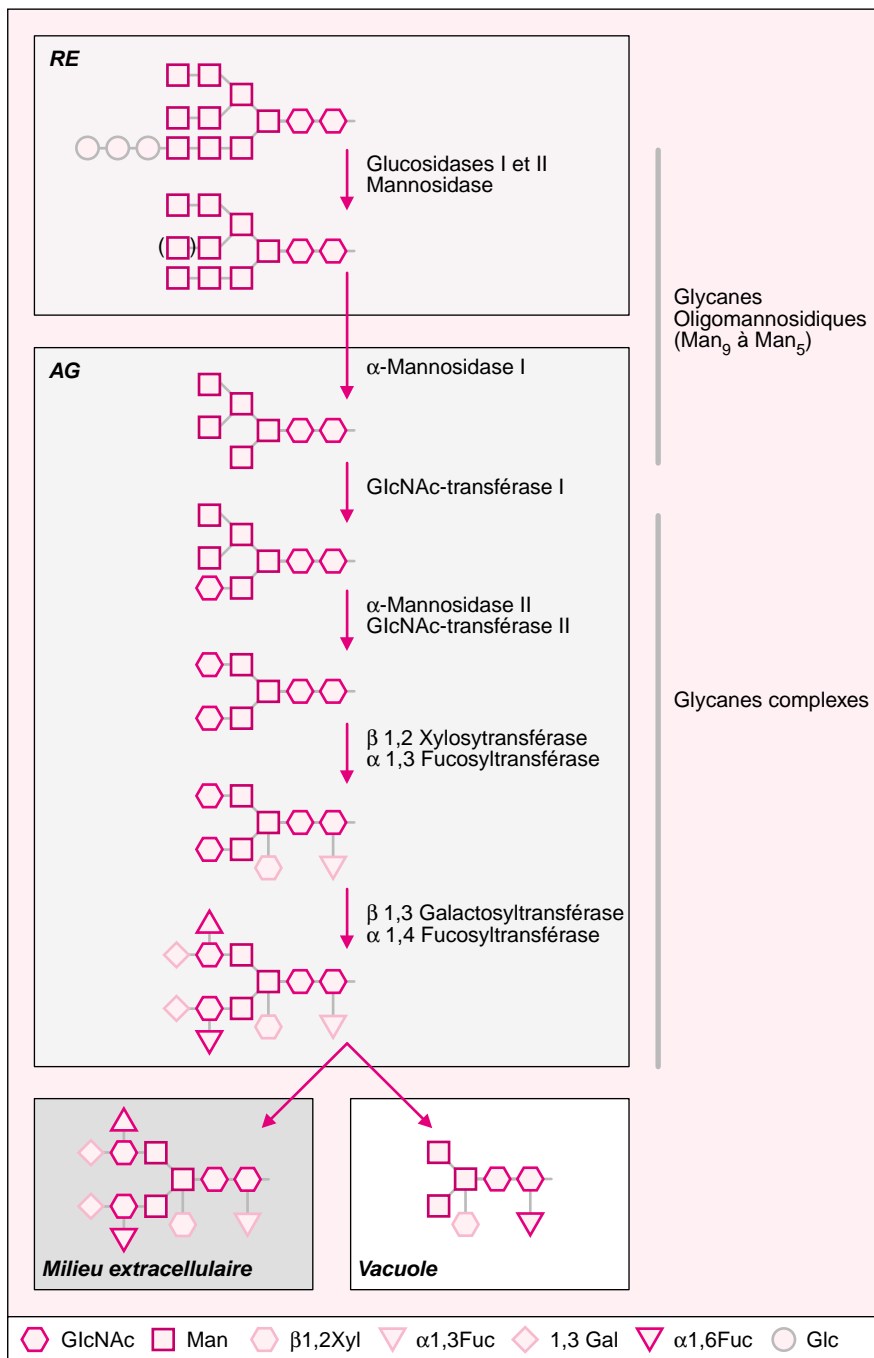


Figure 3. **Maturation des N-glycane chez les plantes.** La N-glycosylation d'une protéine débute lors de son introduction co-traductionnelle dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) avec l'association d'un oligosaccharide précurseur sur certains résidus asparagine spécifiques. Les premières étapes de la maturation de cet oligosaccharide (N-glycane) a lieu dans le réticulum endoplasmique et se poursuit au cours du transport de la glycoprotéine via l'appareil de Golgi (AG) jusqu'à sa destination finale, le milieu extracellulaire ou la vacuole. Cette maturation fait intervenir de nombreuses enzymes, comme cela est indiqué sur le schéma, et aboutit à des glycanes mûrs dont les structures sont souvent typiques des compartiments de stockage des glycoprotéines végétales.

les glycoprotéines recombinantes fusionnées avec une séquence HDEL présentent des N-glycane β (1,2)-xylosylés et α (1,3)-fucosylés [29]. Par conséquent, l'expression, chez les plantes, d'une glycoprotéine recombinante fusionnée avec une extension HDEL ne peut pas être retenue comme une approche utilisable pour obtenir une glycosylation compatible avec une utilisation thérapeutique chez les mammifères. Cette stratégie pourrait toutefois retrouver tout son intérêt si, comme le permettent de penser certains résultats récents, le recyclage de protéines recombinantes fusionnées avec la séquence KDEL est plus efficace, c'est-à-dire beaucoup plus précoce au niveau golgien que lors d'une fusion avec le signal HDEL.

L'ingénierie de la machinerie de glycosylation

Une autre stratégie utilisée dans la perspective d'une production de glycoprotéines recombinantes avec des glycanes non immunogènes est d'utiliser des plantes dépourvues d'une ou de plusieurs enzymes golgiennes impliquées dans la maturation des N-glycane. L'analyse de mutants d'*Arabidopsis* a montré que l'inactivation d'une seule glycosyltransférase golgienne – la N-acétylglucosaminyltransférase 1 (GNT I) – est suffisante pour bloquer complètement la biosynthèse de N-glycane complexes chez les plantes [32]. Cette glycosyltransférase a été récemment clonée chez plusieurs végétaux [33] et l'expression d'un antisens de GNT I dans des plantes de tabac et de pomme de terre a montré une réduction de la biosynthèse de N-glycane complexes chez ces plantes transformées [34]. De nombreuses glycosyltransférases végétales, et plus particulièrement la β 1,2 xylosyltransférase et l' α 1,3 fucosyltransférase, ont été clonées au cours des deux dernières années et le développement de nouvelles stratégies d'inhibition de ces enzymes, comme la recombinaison homologue, pourrait, dans un futur proche, permettre la production de protéines d'intérêt thérapeutique non immunogènes chez les plantes. A côté de ces approches par inactivation de glycosyltransférases, encore limitées dans leur développement par le manque d'efficacité des stratégies

antisens, une autre stratégie prometteuse pour humaniser les N-glycane végétaux est l'expression de « nouvelles » glycosyltransférases qui vont compléter et/ou inactiver par compétition la machinerie endogène de maturation des N-glycane de la cellule végétale. Plusieurs glycosyltransférases de mammifères ont été exprimées avec succès dans l'appareil de Golgi de la cellule végétale telle que la GNT I humaine [32] ou l' $\alpha(2,6)$ -sialyltransférase de rat [35]. Il a été montré que ces deux glycosyltransférases recombinantes sont adressées de façon correcte dans l'appareil de Golgi quand elles sont produites dans le système endomembranaire de sécrétion de la cellule végétale. Dans le cadre de ces stratégies de complémentarité, plusieurs laboratoires ont émis l'hypothèse selon laquelle l'expression d'une $\beta(1,4)$ -galactosyltransférase (GalT) animale dans des compartiments précoces de l'appareil de Golgi végétal pourrait permettre une humanisation partielle des glycanes végétaux et éventuellement prévenir l'association de $\beta(1,2)$ -xylose et d' $\alpha(1,3)$ -fucose qui a lieu plus tardivement dans l'appareil de Golgi médian et dans le compartiment trans-golgien [25]. En accord avec cette hypothèse, Palacpac *et al.* [36] ont montré que la GalT humaine exprimée dans des cellules de tabac en culture transfère des résidus galactose sur les résidus N-acétylglucosamine terminaux des N-glycane végétaux. Plus récemment, une immunoglobuline a été produite dans des plantes de tabac exprimant la GalT humaine. L'expression de cette enzyme humaine dans les plantes de tabac a conduit à la production d'un anticorps dont 30 % des N-glycane présentent des séquences N-acétyllactosamine terminales identiques à celles associées aux N-glycane d'anticorps produits dans des cellules de mammifère (figure 4) [37].

Perspectives

Les résultats encourageants obtenus dans le cadre des travaux d'humanisation de la N-glycosylation dans les plantes transgéniques contribuent à élargir les perspectives d'utilisation des systèmes végétaux pour la production de protéines d'intérêt thérapeutique.

Un niveau d'expression supérieur

m/s n° 8-9, vol. 17, août-septembre 2001

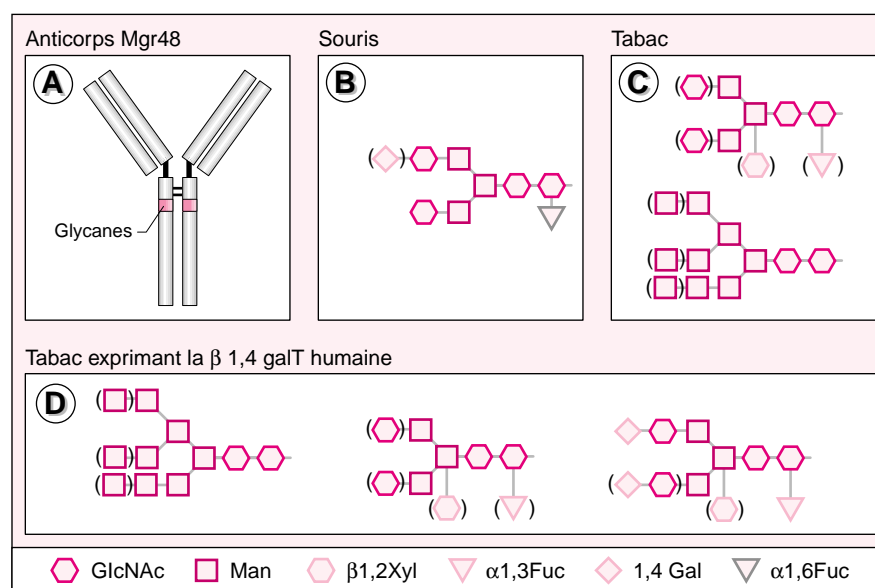


Figure 4. **Glycosylation de l'anticorps Mgr48 produit dans des hybridomes des plantes de tabac « normales » ou exprimant une galactosyltransférase humaine.** Mgr48 est un anticorps monoclonal de type IgG1 présentant un seul site de N-glycosylation (en rouge) (A). Les structures des N-glycane de Mgr48 sont présentées lorsque l'anticorps est produit dans un contexte murin (B), dans des plantes de tabac (C) et dans des plantes de tabac exprimant la $\beta(1,4)$ galactosyltransférase humaine (D). On remarquera en comparant les parties B et C du schéma que les différences structurales majeures rencontrées dans la glycosylation de cet anticorps lorsqu'il est produit dans un contexte mammifère ou végétal sont très voisines de celles observées pour l'anticorps Guy's 13 (figure 1). En revanche, lorsque Mgr48 est produit dans des plantes de tabac exprimant la galactosyltransférase humaine, 30 % des N-glycane présentent des séquences N-acétyllactosamine terminales identiques à celles associées à cet anticorps quand il est produit dans des hybridomes (D).

et/ou une localisation plus précise au niveau golgien de la GalT humaine pourrait très fortement augmenter l'efficacité des stratégies de complémentarité qui visent à la production de glycanes non immunogènes dans les cellules végétales. De tels glycanes présentant des séquences N-acétyllactosamine terminales sont d'excellents supports pour obtenir des copies parfaites des glycanes de mammifères après transfert de l'acide sialique terminal. Ces acides sialiques, absents des N-glycane de plantes, sont importants, en particulier pour la demi-vie de la majorité des glycoprotéines circulantes de mammifères.

L'obtention de N-glycane sialylés chez les plantes, en adaptant la machinerie de maturation des N-glycane végétaux, nécessiterait le transfert d'au moins cinq gènes hétérologues différents codant pour des enzymes

impliquées dans la biosynthèse de l'acide sialique dans le cytosol et son transport dans l'appareil de Golgi. Les enzymes manquantes de cette voie métabolique devraient non seulement être exprimées de façon stable mais aussi être adressées de façon correcte et enfin être actives dans la cellule végétale. Pour ces différentes raisons, la production de glycoprotéines recombinantes sialylées chez les plantes représente un nouveau défi dans le domaine des biotechnologies végétales. Dès aujourd'hui, il paraît techniquement possible d'atteindre cet objectif ambitieux ■

Remerciements

Les auteurs remercient H. Vaudry (Inserm U. 413) et A.R. Schoofs (CEB) pour leur contribution à la rédaction de cet article.

RÉFÉRENCES

1. Parmenter DL, Boothe JG, van Rooijen GJ, Yeung EC, Moloney MM. Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. *Plant Mol Biol* 1995; 29: 1167-80.
2. Boothe JG, Saponja JA, Parmenter DL, et al. Molecular farming in plants: oilseed as vehicles for the production of pharmaceutical proteins. *Drug Dev Res* 1997; 42: 172-8.
3. Sijmons PC, Dekker BM, Schrammeijer B, Verwoerd tc, van den ElzenPJ, Hoekema A. Production of correctly processed serum albumin in transgenic plants. *Bio/Technology* 1990; 8: 217-21.
4. Biopharmaceuticals from tobacco, Crop-*tech*. *ISB News Reports* 2000.
5. Zhong GY, Peterson D, Delaney DE, et al. Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds. *Mol Breed* 1999; 5: 345-56.
6. Vandekerckhove J, Damme JV, Lijsebetens MV, et al. Enkephalines produced in transgenic plants using modified 2S storage proteins. *Bio/Technology* 1989; 7: 929-32.
7. Dieryck W, Pagnier J, Poyart, et al. Human haemoglobin from transgenic tobacco. *Nature* 1997; 386: 29-30.
8. Ruggerio F, Exposito JY, Bournat P, et al. Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. *FEBS Lett* 2000; 469: 132-6.
9. Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 1167-71.
10. Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* 1998; 16: 1336-43.
11. Kusnadi A, Nikolov ZL, Howard JA. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotech Bioeng* 1997; 56: 473-84.
12. Hiatt AC, Cafferkey R, Bowdish K. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 1989; 342: 76-8.
13. Khoudi H, Laberge S, Ferullo JM, et al. Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotech Bioeng* 1999; 64: 135-43.
14. Staub JM, Garcia B, Graves J, et al. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 333-8.
15. Conrad U, Fiedler U, Artsaenko O, Phillips J. High-level and stable accumulation of single-chain Fv antibodies in plant storage organs. *J Plant Physiol* 1998; 152: 708-11.
16. Verch T, Yusibov, V, Joprowski H. Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. *J Immunol* 1998; 220: 69-74.
17. Stoger E, Vaquero C, Torres E, et al. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol Biol* 2000; 42: 583-90.
18. Therapeutic proteins 1999: a seven country analysis and forecasts to 2007. *Data Monitor* 2000.
19. James EA, Wang C, Wang Z, et al. Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells. *Prot Expr Purif* 2000; 19: 131-8.
20. Goddijn OJM, Pen J. Plants as bioreactors. *Trends Biotechnol* 1995; 13: 379-87.
21. Cramer CL, Weissenborn DL, Oishi KK, et al. Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. *Ann NY Acad Sci* 1996; 792: 62-71.
22. Kumagai MH, Turpen TH, Weinzettl N, et al. Rapid, high-level expression of biologically active alpha-trichosanthin in transfected plants by an RNA viral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 427-30.
23. Steiner UP. Assessment of the economics of transgenic technologies for biologicals. Bayer Biotechnology, Bayer Corporation. Communication dans le cadre du congrès *Production and economics of biopharmaceuticals*. 13-15 janvier 2000.
24. Cabanes-Macheteau M, Fitchette-laine AC, Loutelier-Bourhis C, et al. N-Glycosylation of a mouse IgG expressed in transgenic tobacco plants. *Glycobiology* 1999; 9: 363-72.
25. Fitchette-Laine AC, Gomord V, Chekkaï A, Faye L. Distribution of xylosylation and fucosylation in the plant Golgi apparatus. *Plant J* 1994; 5: 673-82.
26. Garcia-Casado G, Sanchez-Monge R, Chrispeels MJ, Armentia A, Salcedo G, Gomez L. Role of complex asparagine-linked glycans in the allergenicity of plant glycoproteins. *Glycobiology* 1996; 6: 471-7.
27. Van Ree R, Cabanes-Macheteau M, Akkerdaas J, et al. b(1,2)-xylose and a(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J Biol Chem* 2000; 275: 11451-8.
28. Lerouge P, Cabanes-Macheteau M, Rayon C, Fitchette-Lainé AC, Gomord V, Faye L. N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol Biol* 1998; 38: 31-48.
29. Pagny S, Cabanes-Macheteau M, Gillikin JW, et al. Protein recycling from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum in plants and its minor contribution to calreticulin retention. *Plant Cell* 2000; 12: 739-55.
30. Navazio L, Baldan B, Mariani P, Gerwig GJ, Vliegenhart JFG. Primary structure of the N-linked carbohydrate chains of calreticulin from spinach leaves. *Glycoconjugate J* 1996; 13: 977-83.
31. Gomord V, Denmat LA, Fitchette-Lainé AC, Satiat-jeunemaitre B, Hawes C, Faye L. The C-terminal HDEL sequence is sufficient for retention of secretory proteins in the endoplasmic reticulum (ER) but promotes vacuolar targeting of proteins that escape the ER. *Plant J* 1997; 11: 313-25.
32. von Schaeuwen A, Sturm A, O'Neill J, Chrispeels MJ. Isolation of a mutant Arabidopsis plant that lacks N-acetylglucosaminyl transferase I and is unable to synthesize Golgi-modified complex N-linked glycans. *Plant Physiol* 1993; 102: 1109-18.
33. Strasser R., Mucha J, Schwihla H, Altmann F, Glössl J, Steinkellner H. Molecular cloning and characterization of cDNA coding for b1,2N-acetylglucosaminyltransferase I from *Nicotiana tabacum*. *Glycobiology* 1999; 9: 779-85.
34. Wenderoth I, von Schaeuwen A. Isolation and characterization of plant N-acetylglucosaminyltransferase I (GNT I) cDNA sequences. Functional analyses in the Arabidopsis cgl mutant and in antisense plants. *Plant Physiol* 2000; 123: 1097-108.
35. Wee EGT, Sherrier DJ, Prime TA, Dupree P. Targeting of active sialyltransferase to the plant Golgi apparatus. *Plant Cell* 1998; 10: 1759-68.
36. Palacpac NQ, Yoshida S, Sakai H, et al. Stable expression of human beta1,4-galactosyltransferase in plant cells modifies N-linked glycosylation patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 96: 4692-7.
37. Bakker H, Bardor M, Molthoff JW, et al. Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 2899-904.
38. Krebitz M, Wiedermann U, Essl D, et al. Rapid production of the major birch pollen allergen Bet v 1 in *Nicotiana benthamiana* plants and its immunological *in vitro* and *in vivo* characterization. *FASEB J* 2000; 14: 1279-88.
39. Arakawa T, Chong DK, Langridge WH. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin subunit vaccine. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 292-7.
40. Tackaberry ES, Dudani AK, Prior F, et al. Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B (UL55) in seeds of transgenic tobacco. *Vaccine* 1999; 17: 23-4.
41. Arakawa T, Yu J, Langridge WH. Food plant-delivered cholera toxin B subunit for vaccination and immunotolerization. *Adv Exp Med Biol* 1999; 464: 161-78.
42. Wigdorovitz A, Carrillo C, Dus Santos MJ, et al. Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology* 1999; 255: 347-53.
43. Tacket CO, Mason HS. A review of oral vaccination with transgenic vegetables. *Microbes Infect* 1999; 1: 777-83.
44. Beachy RN. Use of plant viruses for delivery of vaccine epitopes. In *Engineering plant for commercial products and applications*. *Ann NY Acad Sci* 1996; 25: 43-9.

RÉFÉRENCES

45. Turpen TH, Reini SJ, Charoenvit Y, Hoffman SL, Fallarme V, Grill LK. Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus. *Bio/Technology* 1995; 13: 53-7.
46. Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM, Arntzen CJ. Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J Infect Dis* 2000; 182: 302-5.
47. McGarvey PB, Hammond J, Dienelt MM, et al. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Bio/Technology* 1995; 13: 1484-7.
48. Ma SW, Zhao DL, Yin ZQ, et al. Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance. *Nat Med* 1997; 3: 793-6.
49. Robinson A. Harvesting blood proteins from grain. *CMAJ* 1995; 153: 427-9.
50. Edelbaum O, Stein D, Holland N, et al. Expression of active human interferon-beta in transgenic plants. *Interferon Res* 1992; 12: 449-53.
51. De Zoeten GA, Penswick JR, Horisberger MA, Ahl P, Schultze M, Hohn T. The expression, localization, and effect of a human interferon in plants. *Virology* 1989; 172: 213-22.
52. Matsumoto S, Ikura K, Ueda M, Sasaki R. Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol Biol* 1995; 27: 1163-72.
53. Hamamoto H, Sugiyama Y, Nakagawa N, et al. A new tobacco mosaic virus vector and its use for the systematic production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitor in transgenic tobacco and tomato. *Bio/Technology* 1993; 11: 930-2.
54. Cramer C, Boothe JG, Oishi KK. Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream strategies. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 240: 95-118.
55. Salmon V, Legrand D, Slomianny MC, et al. Production of human lactoferrin in transgenic tobacco plants. *Prot Expr Purif* 1998; 13: 127-35.

TIRÉS À PART

L. Faye.
lfaye@crihan.fr

Summary

Production of proteins for biopharmaceutical applications in plants

Plants fulfill a variety of criteria that are highly valued in modern cell factories: their cellular machinery is complex and sophisticated; they are exempt of infectious human pathogens; apart from the recombinant protein, their cellular content is well known to humans since it is used for nutrition and in cosmetic and pharmaceutical applications. Plants can be propagated endlessly, their production at a large scale or under controlled conditions has been incorporated into the cultural heritage of all nations and, up to date, they represent the least expensive biomass that can be produced per unit of volume; some plant species can be considered as renewable sources of molecules that have no measurable negative impact on the environment.



Collection Sciences en questions

• La fin du "tout génétique" ?

Vers de nouveaux paradigmes en biologie
Henri Atlan
1999, 96 p., 39 F (5,95 ₣)

• Les chercheurs et l'innovation

Regards sur les pratiques de l'INRA
1998, 432 p., 90 F (13,72 ₣)

• Les usages sociaux de la science

Pour une sociologie clinique du champ scientifique
Pierre Bourdieu
1997, 80 p., 39 F (5,95 ₣)

• L'expérience et le modèle

Un discours sur la méthode
Jean-Marie Legay
1997, 112 p., 39 F (5,95 ₣)

• Société et révolution biologique

Pour une éthique de la responsabilité
Axel Kahn
1996, 96 p., 39 F (5,95 ₣)

• Entre savoir et décision, l'expertise scientifique

Philippe Roqueplo
1997, 112 p., 39 F (5,95 ₣)

• Les mondes de l'agriculture

Une recherche pour demain
Michel Sebillotte
1996, 260 p., 120 F (18,29 ₣)



• Le métier de chercheur

Regard d'un anthropologue
2^e édition revue et corrigée
Bruno Latour
2001, 108 p., 39 F (5,95 ₣)

• Les savants croient-ils en leurs théories

Une lecture philosophique de l'histoire des sciences cognitives
Jean-Pierre Dupuy
2000, 134 p., 39 F (5,95 ₣)

• Trois essais sur l'éthique économique et sociale

Christian Arnsperger, Catherine Larrère, Jean Ladrière
2001, 214 p., 59 F (8,99 ₣)

• La Loi sur la recherche de 1982

Evaluation et prospective
Jean-François Théry, Rémy Barré
2001, 136 p., 39 F (5,95 ₣)

Titres disponibles chez votre libraire

ou à **INRA Editions**, RD10, 78026 Versailles cedex - Tel. : 01.30.83.34.06 - Fax : 01.30.83.34.49