

Apport des biotechnologies végétales pour produire des vaccins et molécules thérapeutiques susceptibles de lutter contre la pandémie de Covid-19

Dominique Job
directeur de recherche émérite au CNRS
membre de l'Académie d'agriculture de France

20 mai 2020

Séance virtuelle de l'Académie d'agriculture de France



Cadre de l'intervention

➡ **Durant le confinement le plan de continuité de l'activité de l'Académie se focalise sur la crise sanitaire #covid-19**

Forum Covid-19 de l'Académie

Animateurs : Michel Dron et Philippe Kim-Bonbled

➡ **Section des Sciences de la vie de l'Académie**

➡ **Covid-19 : des vaccins et des traitements issus des biotechnologies végétales sont à l'étude**

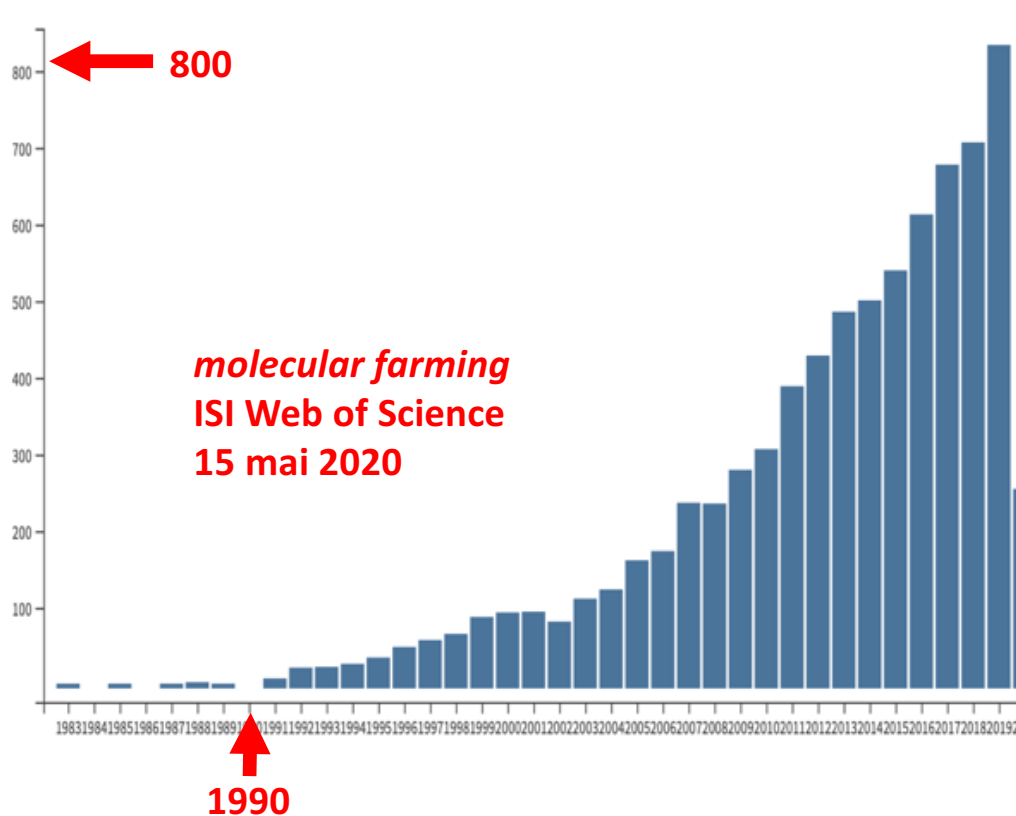
Note de l'Académie d'agriculture de France (29/04/2020)

<https://www.academie-agriculture.fr/publications/articles>

Co-auteurs

- Dominique Job
biologiste végétal, directeur de recherche émérite au CNRS
- Hubert Laude
virologue, directeur de recherche honoraire à l'INRAE
- Georges Pelletier
agronome et généticien des plantes, directeur de recherche honoraire à l'INRAE
- Agnès Ricroch
généticienne, spécialiste des biotechnologies végétales, enseignante-chercheure à AgroParisTech et à l'université Paris-Saclay

Pourquoi les plantes ?



Les plantes sont utilisées depuis plus de 30 ans comme plateforme de **production de réactifs de diagnostic** et de **protéines pharmaceutiques**, une approche qualifiée d'agriculture moléculaire ou **moléculture végétale** (*molecular farming*).

Ma, Drake, Christou (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics* **4**, 794-805
Capell, Twyman, Armario-Najera, Ma, Schillberg, Christou (2020) Potential Applications of Plant Biotechnology against SARS-CoV-2. *Trends in Plant Science*, Published: **April 24, 2020**, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.04.009>

**Pharma-Factory
est financé
pendant 4 ans
par la
Commission
européenne en
tant qu'action
d'innovation
dans le cadre
d'Horizon 2020**

novembre 2017-octobre 2021

**Delivering new and innovative
high value products using plant
molecular farming.**

14 partners, 7 countries,
5 SMEs, 3 public research
institutions and 6 universities



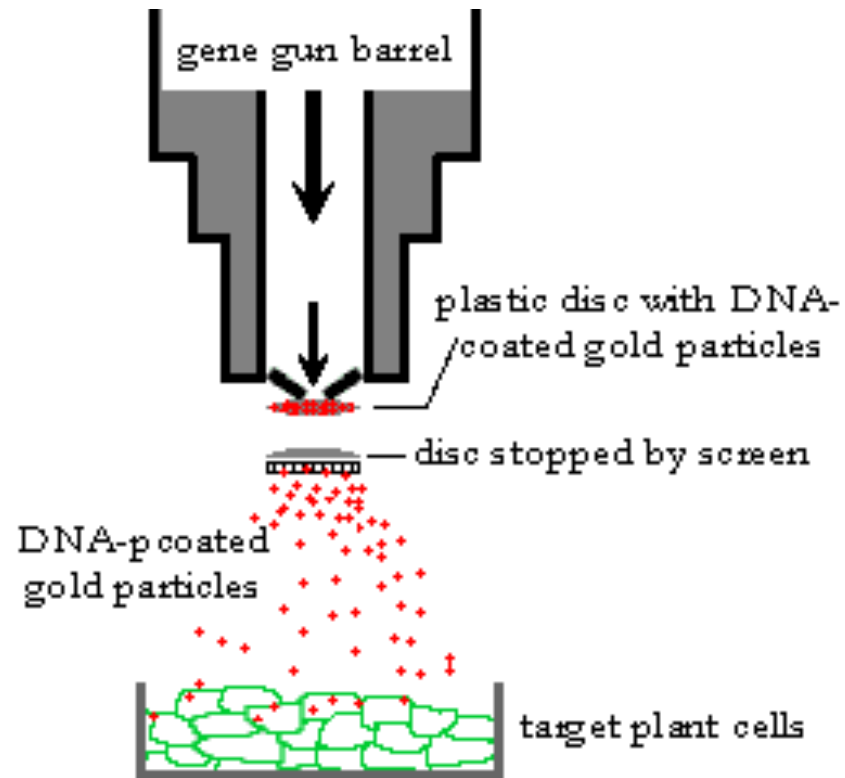
**Pharma
Factory**

<https://pharmafactory.org>

Plan de la présentation

- Historique sur le développement des biotechnologies végétales pour la production de vaccins
- Développements récents liés à la pandémie de Covid-19
- Autres biotechnologies végétales pour la production de molécules thérapeutiques
- Réflexions sur les maladies infectieuses chez les plantes : comparaison avec les pandémies humaines

Comment exprimer un gène hétérologue chez une plante



Transfert direct

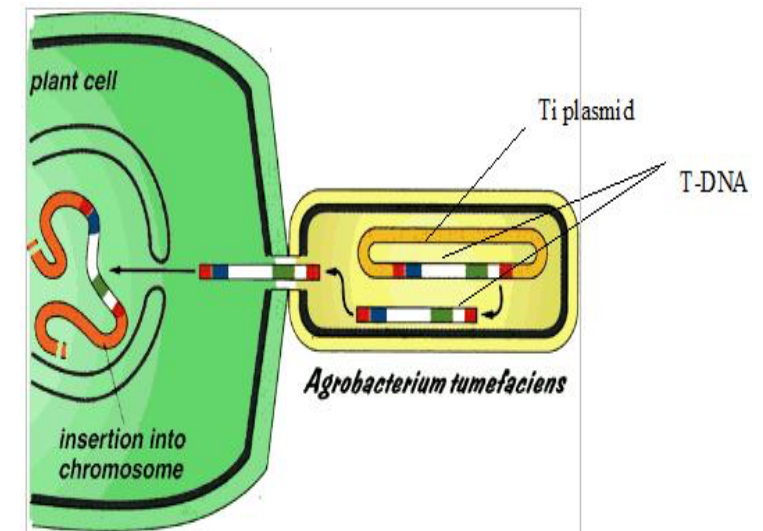
La méthode la plus utilisée est la **biolistique** qui consiste à propulser à grande vitesse sur des tissus végétaux des microbilles de tungstène ou d'or enrobées de fragments d'ADN du gène d'intérêt à l'aide d'un **canon à ADN**.

Comment exprimer un gène hétérologue chez une plante

Transfert via *Agrobacterium tumefaciens*

On utilise une bactérie du sol, responsable de la **galle du collet**, qui a la capacité d'introduire de nouveaux matériels génétiques dans une cellule végétale via son **plasmide Ti**.

Ce plasmide contient un gène de transfert (ADN-T) codant les fonctions de virulence. Découvert par **Marc van Montagu** et **Jozef Schell**, le gène de transfert a été **désarmé** pour éliminer ces gènes de virulence et les remplacer par les gènes désirés.



www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/SITEGRAPHICS/Agrotrans.GIF

Au début on utilisait une seringue pour inoculer des plantes avec les agrobactéries. Une révolution a été l'**agroinfiltration** qui consiste en l'introduction à l'aide d'une pompe à vide d'une culture d'agrobactéries dans les tissus végétaux.

Bechtold, Ellis, Pelletier. 1993. C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences, 316, 1194-1199

Clough, Bent. 1998. Plant J. 16, 735-43

Mais, à cette époque il n'y a pas que l'excellence du secteur public en France, il y a aussi l'expérience d'**industriels français**

Engineering herbicide resistance in tobacco plants by expression of a Bromoxynil specific nitrilase

B. Leroux, M. Lebrun, P. Garnier, A. Sailland, B. Pelissier & G. Freyssinet

Rhône-Poulenc Agro – Lyon

Bulletin de la Société Botanique de France 137, **1990**, 65-78

Ce tabac transgénique est devenu une première européenne

18 juin 1994

Premier organisme transgénique végétal mis sur le marché en Europe.

Expression transitoire

Mais l'agroinfiltration ne vise pas toujours à changer durablement le génome d'une plante. Elle peut aussi permettre l'**expression transitoire d'un ou plusieurs gènes hétérologues**.

Dans ces applications, l'agroinfiltration est généralement conduite dans des tissus **somatiques** (typiquement des **feuilles**), par exemple en utilisant une **pompe à vide**.

Diffusant localement, les plasmides des agrobactéries n'atteignent pas **les cellules** (étamines, pistils...) impliqués dans la **reproduction sexuée**.

La modification **n'est donc pas transmissible** à la descendance.

Nous verrons dans la suite de cet exposé que cette méthode d'expression transitoire joue un rôle crucial pour la fabrication de vaccins et protéines thérapeutiques

Développement des biotechnologies végétales pour la production de vaccins



La production de vaccins (via des protéines antigéniques déclenchant une réponse immunitaire) chez les plantes doit beaucoup aux travaux pionniers de **Charles Arntzen** (Arizona State University, USA). Dès les années 1990, son équipe a obtenu des plants de tabac et de pomme de terre transgéniques exprimant la protéine de capsid du **virus de Norwalk** responsable de gastro-entérite aiguë chez l'homme. La protéine de capsid ainsi produite s'est avérée immunogène par voie orale chez la souris.

Mason et al. 1996. PNAS 93 5335-5340

Développement des biotechnologies végétales pour la production de vaccins

D'autres vaccins **potentiels** ont été développés chez diverses plantes.

- 2004 : **tuberculose** (*Arabidopsis thaliana*)
- 2007 : **hépatite B** (tomate)
- 2009 : **dengue** (tabac)
- 2009 : **HIV** (tabac)
- 2011: **Ebola** (*Nicotiana benthamiana*)
- 2012: **Norwalk** (*Nicotiana benthamiana*)
- 2015 : **grippe** (*Nicotiana benthamiana*)

Rigano et al. 2004. Plant Cell Rep. 22, 502-8

Lou et al. 2007. Clin. Vaccine Immunol. 14, 464-9

Kim et al. 2009. Biotechnol. Bioproc. Eng. 14, 725–730

Scotti et al. 2009. Planta 229, 1109-22

Phoolcharoen et al. 2011. Plant Biotechnol. J. 9, 807-16

Lai & Chen. 2012. Plant Cell Rep. 31, 573–584

Schoji et al. 2015. Hum. Vaccin. Immunother. 11, 118–123

Nicotiana benthamiana : une plante modèle pour les interactions plantes-pathogènes



Nicotiana benthamiana est une plante indigène d'**Australie**, de la famille des Solanacées (tomate, pomme de terre, aubergine, tabac...)

- découverte en 1831 par **Benjamin Bynoe**, un assistant de Charles Darwin, lors de la seconde mission d'exploration du **Beagle**
- ainsi nommée en l'honneur du botaniste **George Bentham**, qui l'a décrite dans son ouvrage *Flora Australiensis* en 1868.

Cette plante présente un certain nombre de caractéristiques :

- croissance rapide
- **capacité naturelle à exprimer des gènes d'autres espèces**



Cette capacité naturelle résulte de l'inactivation du gène codant l'**ARN polymérase ARN-dépendante** qui joue un rôle essentiel dans la protection du génome des plantes contre les virus. Ce dysfonctionnement fait de cette plante un **excellent hôte pour l'expression génique transmise par les virus**.

Bally et al. (2018) The rise and rise of *Nicotiana benthamiana*: a plant for all reasons. Annu. Rev. Phytopathol. 56, 405–426

The background of the slide is a close-up photograph of tobacco leaves. The leaves are a vibrant green and have several small, circular spots of various colors (pink, yellow, orange, and blue) scattered across their surfaces, which likely represent genetic markers or specific plant characteristics.

**Le projet Newcotiana est financé
par l'Union européenne dans le
cadre du programme Horizon 2020**

NEWCOTIANA

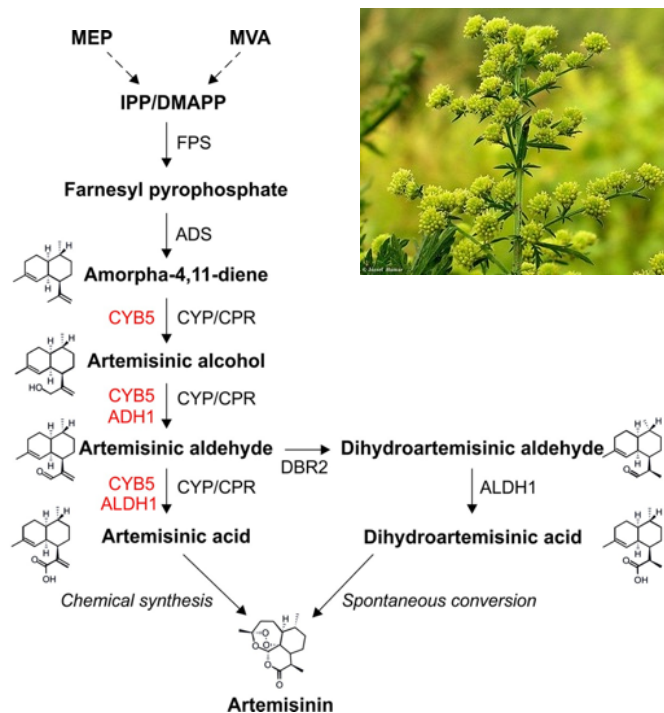
Breeding Tobacco for Health

**19 industrial and academic partners from
8 European countries and Australia**

<https://newcotiana.org>

2018-2023

Apport de la **biologie de synthèse** pour la production de molécules thérapeutiques



Un exemple spectaculaire concerne l'**artémisinine**,

- un médicament antipaludéen très efficace
- produit par l'**armoise annuelle** (*Artemisia annua*) **mais en abondance relativement faible**.

Pour obtenir des quantités plus importantes, la stratégie a consisté à utiliser la **biologie de synthèse** pour **surexprimer dans la levure l'ensemble de la voie présente chez l'armoise, soit 14 gènes**.

C'est une révolution car jusqu'à présent les applications portaient sur l'expression d'un seul gène.

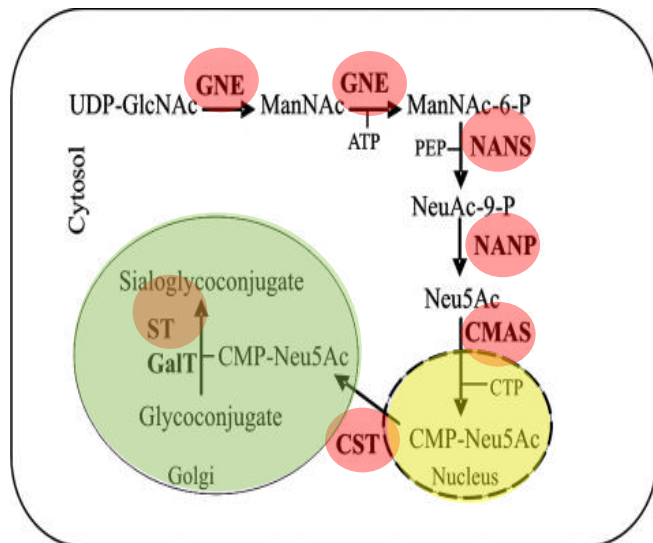
Récemment, une stratégie similaire a été utilisée pour produire de l'artémisinine dans les **chloroplastes de tabac**.

Fuentes et al. 2016. A new synthetic biology approach allows transfer of an entire metabolic pathway from a medicinal plant to a biomass crop. eLife 5, e13664

Apport de la **biologie de synthèse** pour la production de molécules thérapeutiques

Une fois synthétisées, les protéines subissent de nombreuses modifications affectant leur fonction. L'une d'entre elles consiste en l'ajout de **N-glycanes sialylés**.

Les acides sialiques sont importants, en particulier pour la demi-vie des glycoprotéines circulantes de mammifères.



Mais les acides sialiques sont absents dans les plantes. Leur production a été obtenue par **biologie de synthèse** afin d'**humaniser** les protéines hétérologues exprimées chez les plantes. Une telle humanisation a été obtenue grâce à l'introduction d'une **voie entière** de biosynthèse des mammifères (**six enzymes**) dans *Nicotiana benthamiana*.

Castilho et al. 2010. J. Biol. Chem. 285, 15923-15930

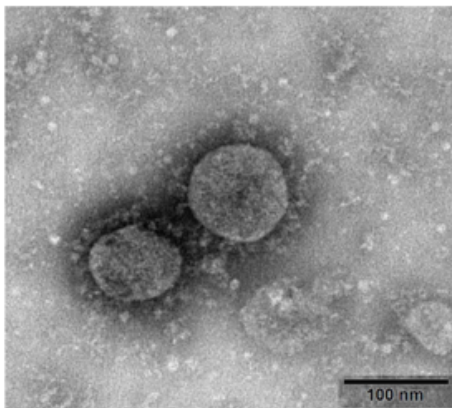
Développements récents



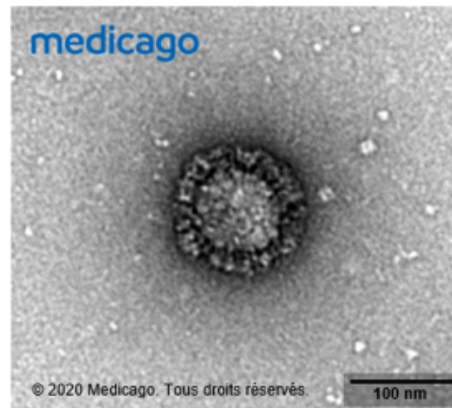
En avril 2020, la société canadienne **Medicago** a annoncé le développement d'un vaccin potentiel contre le SARS-Cov-2.

Leur stratégie repose sur l'obtention de **particules pseudo-virales** qui constituent une voie privilégiée pour le développement de vaccins.

Celle-ci est obtenue par **agroinfiltration** de plants de *Nicotiana benthamiana*.



Coronavirus (SARS-CoV-2)
Source: Centre chinois de contrôle et de
prévention des maladies



Particule Pseudo-Virale (PPV) de
SARS-CoV-2 produite sur plantes
par Medicago

Ces particules pseudo-virales, dont l'organisation ressemble à celle d'un virion, sont **reconnues efficacement par le système immunitaire**.

Ce candidat vaccin est actuellement en cours **d'essais précliniques**.

Medicago annonce le **14 mai** que son vaccin candidat a induit une réponse anticorps 10 jours après injection dans la souris.

<https://www.medicago.com/fr/portefeuille/>

Développements récents



www.kentuckybioprocessing.com

En avril 2020, la société biopharmaceutique **Kentucky BioProcessing** (KBP ; Etats-Unis) a également fait état de ses travaux sur le développement chez *Nicotiana benthamiana* d'un vaccin potentiel contre le SARS-CoV-2.

Le vaccin fait actuellement l'objet **d'essais précliniques**.

KBP a été un acteur majeur dans le développement de la technologie **Zmapp**, qui est sans doute l'exemple le plus connu d'un médicament expérimental produit par les plantes.

Conçu pour traiter la maladie à virus **Ebola**,

- il est composé de **trois anticorps monoclonaux** chimériques exprimés chez *Nicotiana benthamiana*, et
- il a été testé chez l'homme au cours de l'épidémie de fièvre hémorragique Ebola en Afrique de l'Ouest en 2014.

Développements récents

Autre projet d'envergure : aux États-Unis et en Chine, les entreprises **iBio Inc.** (Newark) et **Beijing CC-Pharming Ltd** (Pékin) collaborent dans le but de développer un vaccin contre le SARS-CoV-2.

Pour ce faire, elles utilisent la technologie FastPharming System™ d'iBio Inc. Les tests cliniques ont débuté fin mars 2020.

La technologie **FastPharming**™ d'iBio Inc. combine **l'agriculture verticale** et **l'agroinfiltration** automatisées à haut débit pour fournir rapidement, en quelques semaines, des quantités en grammes d'anticorps monoclonaux, de vaccins et d'autres protéines.



<https://www.ibioinc.com/technology/fastpharming>

Développements récents

En **Espagne**, le **Centre national espagnol de Biotechnologie** coordonne actuellement les recherches sur le développement de technologies chez *Nicotiana benthamiana* mais également chez la laitue et les levures.

Les lignes d'action de ce vaste programme comprennent plus d'une **quinzaine de projets portés par plus de 200 groupes de recherche** de spécialités différentes.

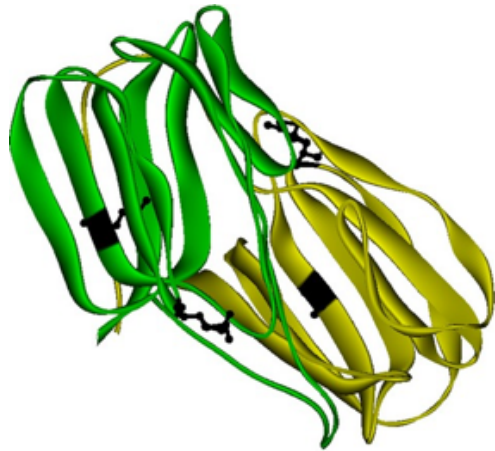
- Développement de vaccins contre le SRAS-CoV-2
- Criblage à très haut débit de composés antiviraux
- Validation préclinique des agents thérapeutiques
- Développement d'anticorps
- Dosages pour l'identification d'individus séropositifs
- Protéomique SARS-CoV-2
- Biologie structurale du SRAS-CoV-2



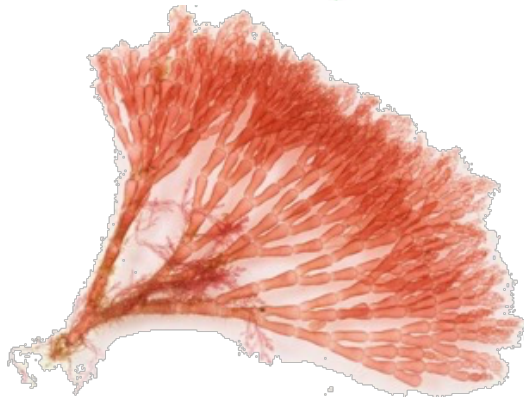
<http://www.cnb.csic.es/index.php/en/research/sars-cov2-research>

Développements récents

Une stratégie différente de la production de vaccins



La **Griffithsine**, une lectine dérivée des **algues rouges**, se lie à la surface de diverses glycoprotéines virales, dont la glycoprotéine 120 du VIH (protéine de surface du VIH) et la **glycoprotéine de spicule du SARS-CoV2** (une protéine du virus ancrée dans l'enveloppe virale), **ce qui bloque l'entrée du virus dans la cellule hôte**.



Elle présente également une activité antivirale contre le virus Ebola.

Des équipes américaines ont produit cette protéine chez *Nicotiana benthamiana* et l'ont testée dans des études de phase I pour la prévention du VIH chez la souris et le macaque rhésus.

De nouvelles approches en biotechnologie végétale pour produire des molécules d'intérêt thérapeutique

La société de biotechnologies végétales **PAT** (Plant Advanced Technologies) basée à Vandœuvre-lès-Nancy annonce le démarrage de tests préliminaires contre le virus SARS-CoV-2 pour deux de ses principes actifs en développement. Il s'agit de **métabolites excrétés par les plantes** et qui présenteraient une capacité à réguler l'inflammation générale ainsi qu'une capacité antivirale sur des virus respiratoires.



<https://www.plantadvanced.com>

L'entreprise PAT développe des « **plantes à traire** » sur la base d'une technologie mise au point par l'INRAE de Nancy. Les plantes poussent **hors sol** sans dommage pour ces plantes. Le long des racines, se forment de **petites gouttes de ces métabolites**.

Elles sont récoltées tous les mois, d'où cette image de plantes à traire.

A close-up photograph of several green rice panicles, showing the individual grains and the sheaths. The background is a soft, out-of-focus green.

**Et si des maladies infectieuses aussi
invasives que la Covid-19 s'abattaient
sur les principales cultures vivrières ?**

Quelles leçons à tirer en agriculture ?

Les épidémies des maladies végétales



Parmi les pathologies touchant les végétaux, on ne peut pas ne pas citer le **mildiou de la pomme de terre** qui, de 1846 à 1851, a causé la grande famine en Irlande, provoquant la mort de plus d'un million de personnes mais également d'importantes migrations irlandaises vers les Etats-Unis.

Les parasites émergents des cultures sont actuellement en forte progression.

En France métropolitaine, le nombre d'arthropodes ravageurs d'importance agronomique est passé en moyenne de **1,6** par an sur la période 1960-2000 à **7** espèces par an sur la période 2005-2014.

Les épidémies des maladies végétales



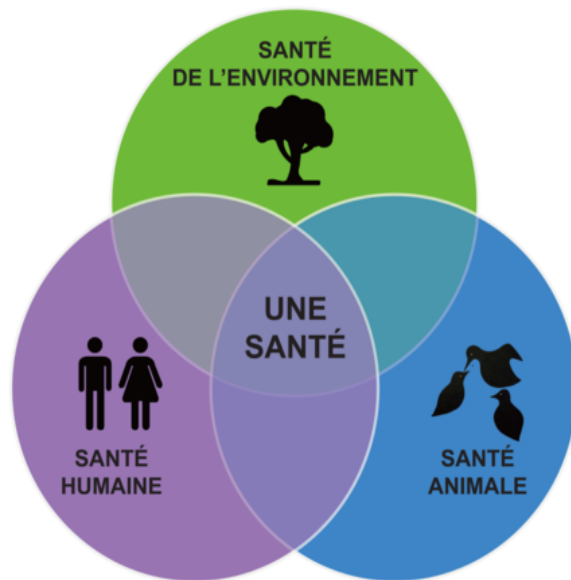
Quelques invasions remarquables :

- *Drosophila suzukii*, mouche ravageuse des arbres fruitiers
- *Candidatus liberibacter*, une maladie bactérienne mortelle des agrumes (maladie du dragon jaune)
- *Xylella fastidiosa*, bactérie tueuse des oliviers provoquant leur dépérissement
- virus du fruit brun et rugueux de la tomate

Epidémies des maladies végétales vs pandémies humaines

Parmi les **actions comparables** on peut noter :

- la mise en place d'une agence **nationale** (**ANSES - Santé et protection du végétal**), d'agences **régionales** (**DRAAF**, Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt) et d'un **réseau d'épidémiosurveillance** mis en place par le Ministère de l'agriculture et de l'alimentation
- les méthodes de « **confinement** », notamment pour les exploitations agricoles
- le **traçage des contacts**
- le **dépistage précoce des maladies**, notamment utilisant le téléphone portable, télédétection, télésurveillance
- la mise en place d'outils d'**aide à la décision** pour optimiser les traitements



On peut espérer que ces comparaisons et les enseignements que l'on peut en tirer nourriront l'initiative européenne *One Health* (Une Seule Santé) qui vise à mieux affronter les maladies émergentes à risque pandémique

<https://onehealthejp.eu/about/>

Mais il n'y a pas que des problèmes alimentaires !

Sensibilité des citoyens aux paysages



Maladie des platanes

La maladie est due à un champignon ascomycète, le **chancre coloré**,

- qui est spécifique du platane
 - arrivé en France à Marseille en 1945, lors du débarquement en Provence des troupes américaines (bois des caisses de munitions).
- Les platanes sont atteints dans toute la France.**

Mais il n'y a pas que des problèmes alimentaires !

Sensibilité des citoyens aux paysages



Maladie des palmiers dans le Sud de la France



En dix ans, le **charançon rouge**, un gros coléoptère originaire du sud-est asiatique a déjà **détruit la moitié des palmiers de la Côte d'Azur.**

Le charançon rouge du palmier, baptisé tueur de palmiers, fait partie des organismes de quarantaine.

Mais il n'y a pas que des problèmes alimentaires !

Émergences de maladies chez les arbres forestiers

Quelques exemples en Europe

- oïdium des chênes
- graphiose de l'orme
- chalarose des frênes



Cécile Robin - Marie-Laure Desprez-Loustau. 2018. Émergences de maladies chez les arbres forestiers : définitions, concepts et recommandations. Revue Forestière Française LXX

http://documents.irevues.inist.fr/bitstream/handle/2042/70305/RFF_2018_70_6_569_Robin.pdf?sequence=1

Conclusion

Grâce aux systèmes d'expression transitoire, des progrès fulgurants ont récemment été obtenus dans l'amélioration de l'accumulation de protéines recombinantes chez les plantes. De manière convaincante, de nombreux exemples ont été décrits pour permettre la production **en masse** de protéines vaccinales et de protéines thérapeutiques.

Conclusion

Fait majeur, les plantes utilisées comme bioréacteurs ont été optimisées pour produire des protéines avec les modifications post-traductionnelles correctes (par exemple la glycosylation), de manière « **humanisée** ».

Cela a été accéléré par les outils de la **biologie de synthèse**.

Conclusion

Cependant, il n'y a toujours pas de vaccin d'origine végétale autorisé pour un usage humain.

Cela résulte principalement d'obstacles techniques et réglementaires qui restent à surmonter :

incertitude sur la **conformité réglementaire des processus de production** (eg, confinement)

manque de démonstration que des produits dérivés de plantes répondent aux normes requises en matière de **pureté**.

Conclusion

Enfin, il y a une **crainte de la société de voir une dissémination dans l'environnement des plantes** utilisées dans ces applications.

La culture de ces plantes doit donc être conduite dans le **confinement le plus strict.**

Merci de votre attention

20 mai 2020

Séance virtuelle de l'Académie d'agriculture de France

