

Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France

Academic Notes of the French Academy of agriculture

Authors

Louis-Marie Houdebine

Title of the work

production de protéines thérapeutiques par des animaux transgéniques

Year 2016, Volume 2, Number 9, pp. 1-16

Published online:

15 December 2016,

<https://www.academie-agriculture.fr/publications/notes-academiques/n3af-editorial-pourquoi-levaluation-par-les-pairs-simpose-why-peer>

<https://doi.org/10.58630/pubac.not.690522>

[Production de protéines thérapeutiques par des animaux transgéniques](#) © 2016 by Louis-Marie

Houdebine is licensed under [Attribution 4.0 International](#) 

Note de conjoncture

Production de protéines thérapeutiques par des animaux transgéniques

Production of therapeutic proteins by transgenic animals

Louis-Marie Houdebine

Directeur de recherche honoraire à l'Inra, France

Correspondance :

louis.houdebine@inra.fr

Résumé

Les protéines exercent de multiples fonctions chez les organismes vivants. Lorsqu'elles font défaut, on peut les administrer aux patients ou aux animaux. Les protéines sont des macromolécules qui ne peuvent pas être synthétisées massivement par voie chimique. Il est parfois possible d'obtenir des quantités substantielles de protéines thérapeutiques par extraction à partir d'organes. Cela a été le cas pendant plusieurs décennies pour l'insuline de porc. Les techniques de génie génétique ont permis de produire de l'insuline humaine à partir de bactéries génétiquement modifiées, puis d'autres protéines. Une bonne proportion des protéines des mammifères doit subir des modifications post-traductionnelles pour être biologiquement actives, ce que ne savent pas faire les bactéries. C'est le cas des glycosylations (l'addition de sucres ajoutés en certains points de la chaîne polypeptidique). Des lignées de cellules CHO (*Chinese hamster ovary*) sont actuellement la principale source de protéines thérapeutiques humaines recombinantes. La principale limite des cellules de mammifères en culture est qu'elles ne synthétisent que des quantités parfois insuffisantes de protéines recombinantes et à un coût élevé. Le recours à des mammifères

transgéniques capables de sécréter en abondance dans leur lait des protéines thérapeutiques a été couronné de succès mais encore pour un nombre très limité de protéines.

Abstract

Proteins have multiple functions in living organisms. The missing proteins may be administered to patients. Proteins are macromolecules that cannot be chemically synthesized at an industrial scale. Some proteins like pig insulin may be extracted from porcine pancreas. It is now produced by genetically modified bacteria. A number of human proteins must be post-translationally modified. It is the case for glycosylation (the addition of carbohydrates in specific sites of the polypeptide chain). Bacteria are unable to achieve most of the post translation. Cultured genetically modified mammalian cells like CHO (*Chinese hamster ovary*) are the source of most recombinant therapeutic proteins. The major limit of CHO cells is that the quantity of the proteins is in some cases insufficient and produced at a high cost. It has been shown that the milk of transgenic animals may contain large quantities of highly

Note de conjoncture

active therapeutic proteins. For various reasons this method is developing slowly.

Keywords

therapeutic proteins, milk, transgenic mammals

Mots clefs

Protéines thérapeutiques, recombinantes, cellules en culture, lait, animaux transgéniques

Introduction

Les protéines ou polypeptides sont parmi les acteurs moléculaires les plus importants des organismes vivants. Certaines protéines sont des enzymes qui permettent de catalyser des réactions biochimiques. D'autres sont des molécules qui entrent dans la constitution des cellules et des organes. D'autres encore sont des hormones, des facteurs de croissance, des médiateurs nerveux, des facteurs sanguins, ou encore des anticorps et des protéines nutritives du lait et des œufs, etc. Certaines maladies héréditaires ou induites sont dues à l'absence ou à la mutation de gènes particuliers, ce qui se traduit par le dysfonctionnement des protéines correspondantes.

Plusieurs milliers de maladies génétiques ont été identifiées, et leur nombre va croissant, au fur et à mesure que des mutations de gènes sont mises en évidence. Pour tenter de traiter ces maladies plusieurs approches sont en principe possibles.

On peut théoriquement remplacer un gène muté par une version non pathogène du même gène. Les avantages théoriques de cette approche sont que la maladie est effectivement enrayerée tant que le gène transféré est présent et fonctionnel. La difficulté majeure est de transférer le bon gène au bon endroit.

Les outils récemment inventés permettant le transfert ciblé de gènes (par exemple, l'édition génomique) sont prometteurs (Ran *et al.*,

2013 ; Quétier, 2016). Les progrès dans la connaissance des cellules souches laissent envisager des protocoles fondés sur l'utilisation de cellules souches d'organes. A cette fin, des modifications génétiques peuvent être effectuées dans ce type de cellules. Le gène thérapeutique est alors apporté à l'organe par la transplantation des cellules souches d'organes génétiquement modifiées.

Une autre possibilité consiste à se procurer la protéine qui est déficiente chez le patient et à lui administrer. Cette voie, qui est suivie depuis des décennies, comporte des avantages et des limites. Il faut, tout d'abord, disposer de protéines humaines à l'échelle industrielle. Il faut, d'autre part, prendre en considération le fait que les protéines sont digérées lorsqu'elles sont administrées par voie orale, et donc inactivées. Les protéines doivent donc être injectées aux patients. Beaucoup de protéines ont une demi-vie courte, ce qui impose des injections répétées. Il est également important de prendre en compte le fait que la plupart des protéines injectées ne pénètrent pas spontanément dans les cellules et n'ont donc pas d'effet direct sur des pathologies qui concernent des mécanismes intracellulaires.

La première protéine thérapeutique utilisée en santé humaine a été l'insuline (hormone protéique produite par certaines cellules du pancréas qui a pour effet de maîtriser le taux de glucose dans le sang), que les diabétiques s'injectent quotidiennement. L'insuline a d'abord été d'origine porcine, car on ne disposait pas de pancréas humains en quantité suffisante. Il est progressivement apparu souhaitable d'utiliser des protéines recombinantes (synthétisées par des organismes vivants ou par des organes qui ne sont pas ceux d'où proviennent les protéines natives). Cette approche promettait de disposer de quantités considérables, et à un coût raisonnable, de protéines non contaminées par des prions ou d'autres agents pathogènes. Au niveau international, il

Note de conjoncture

a donc été décidé de ne plus utiliser des protéines thérapeutiques extraites d'organes humains, sauf lorsqu'il n'y avait pas d'autres sources de protéines.

L'intervention du génie génétique

Les protéines sont composées de 20 sortes de résidus d'acides aminés, formant des chaînes comportant de quelques unités à des centaines de milliers d'unités. L'enchaînement des résidus d'acides aminés des protéines détermine directement leur activité biologique. Cet enchaînement est déterminé par la structure de l'ADN des gènes. L'ADN est composé de quatre bases (adénine, thymine, guanine et cytosine), qui se suivent dans un ordre précis. Trois de ces bases qui se suivent déterminent la nature et la position d'un acide aminé dans une protéine. C'est ce que l'on nomme le code génétique, qui est le même dans toutes les espèces vivantes et qu'il ne faut pas confondre avec le patrimoine génétique des organismes vivants. La suite des bases d'un fragment d'ADN codant une protéine permet donc de déduire l'enchaînement des résidus d'acides aminés de la protéine correspondante, et l'inverse est en grande partie vrai.

L'ADN constitue donc un ensemble de messages codés, les gènes. Les gènes sont transcrits en ARN (acide ribonucléique), les ARN messagers ou transcrits, qui engendrent les protéines correspondantes à chaque gène. Les organismes vivants contiennent un nombre de gènes variable selon les espèces. Cet ensemble de gènes constitue le patrimoine de chaque organisme vivant. Les gènes sont présents dans la totalité des cellules de l'organisme. Le patrimoine génétique humain contient 25 000 gènes dont 22 000 codent des protéines ; les autres dirigent la synthèse d'ARN qui exercent diverses fonctions dans l'organisme. Les 22 000 gènes peuvent diriger la synthèse d'au moins 100 000 protéines, par exemple via des épissages divers des

fragments de transcrits primaires (les ARN messagers sont souvent synthétisés sous forme de précurseurs immatures, les pré-ARN messagers, comportant deux types de segments, les exons conservés dans l'ARN messenger mature final et les introns excisés lors du processus d'épissage), ce qui augmente considérablement la diversité des transcrits et ainsi des protéines correspondantes.

Un bon nombre de protéines subissent, de plus, des modifications post-traductionnelles (clivage, repliement, glycosylation, phosphorylation, association diverse de fragments de la protéine etc.). Ces modifications biochimiques ont lieu après la traduction des ARN messagers en protéines qui acquièrent de manière réversible ou pas des activités diverses plus ou moins différentes de celles des protéines natives.

Le corps humain est constitué d'environ 250 types de cellules, qui sont au service de l'organisme entier. Dans chaque type de cellules, 2000 à 3000 gènes seulement sont fonctionnels, et la moitié de ces gènes est active dans toutes les cellules, assurant les opérations de base de toutes les cellules. Environ 1500 à 2000 gènes participent à l'expression des fonctions spécifiques de chaque type cellulaire.

A titre d'exemple, on peut citer l'albumine sérique, qui est synthétisée en permanence dans les cellules hépatiques et est sécrétée dans le sang ; sa fonction est essentielle pour le maintien de la pression osmotique indispensable à la bonne répartition des liquides entre les vaisseaux sanguins et les tissus ou le milieu interstitiel. Un autre exemple est celui du lait dont les composants nutritifs ne sont synthétisés que dans les cellules mammaires, et seulement lorsqu'elles sont stimulées par les hormones de la lactation. Un tout autre cas est celui des cellules musculaires, qui contiennent des protéines qui, en se contractant, permettent d'assurer de nombreuses fonctions dont la locomotion.

Note de conjoncture

L'activité (l'expression) des gènes est réglée au cours du développement et tout au long de la vie. Les mécanismes qui assurent ces régulations sont en partie connus. Chez toutes les espèces vivantes, la région de l'ADN contenant un gène est précédée par une région régulatrice (ou promoteur) qui contient des signaux codés totalement différents de ceux du code génétique.

A titre d'exemple, on connaît en partie la séquence des régions régulatrices des gènes des protéines du lait. En absence de prolactine (la principale hormone de la lactation), les promoteurs des gènes des protéines du lait n'activent pas leurs gènes. Sous l'influence de la prolactine, des protéines régulatrices des cellules mammaires sont phosphorylées et ainsi activées. Elles se fixent alors sur l'ADN, au niveau des promoteurs, ce qui a pour effet d'induire la transcription des gènes des protéines du lait en ARN messagers, puis la synthèse des protéines correspondantes.

Les techniques du génie génétique permettent de séparer divers fragments d'ADN et de les associer dans un ordre nouveau. On peut également obtenir des gènes fonctionnels par synthèse chimique. Un gène codant une protéine possédant des propriétés thérapeutiques peut ainsi être placé sous la dépendance du promoteur d'un tout autre gène de la même espèce ou pas. La protéine en question sera alors synthétisée par l'organe où le promoteur est actif (Figure 1). Cette démarche est valable pour des espèces très différentes.

La synthèse chimique de protéines est possible, mais réservée aux molécules contenant au maximum quelques dizaines d'acides aminés. Au-delà, le rendement de la synthèse devient de plus en plus faible, et excessivement onéreuse. La synthèse biochimique de petites quantités de protéines à des fins de recherche est possible *in vitro* dans des tubes à essais contenant les éléments cellulaires nécessaires à la synthèse de protéines (ARN messager, ribosomes, ARN de transfert, etc.) (Takai *et al.*, 2010). Les

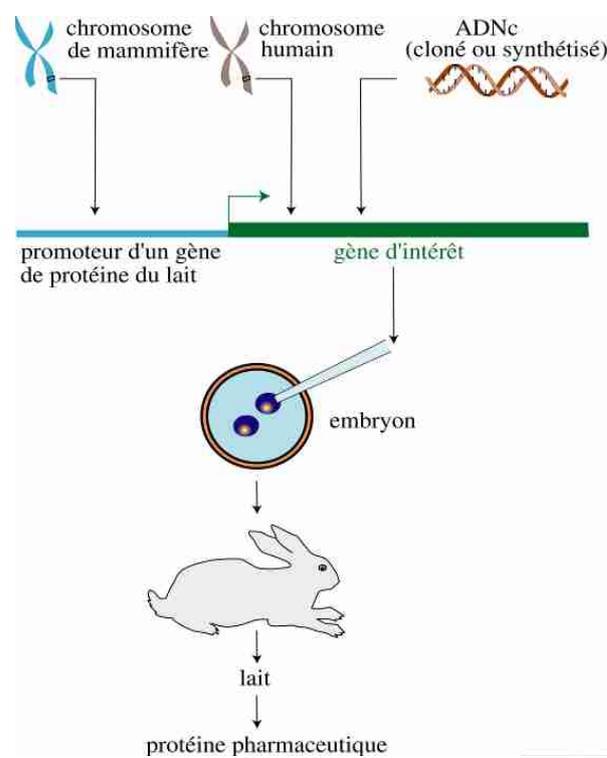


Figure 1. Représentation schématique de la construction de gènes recombinants capables de diriger la sécrétion de protéines thérapeutiques dans le lait.

protéines synthétisées de cette manière ne bénéficient pas de modifications post-traductionnelles. Pour disposer de protéines thérapeutiques en quantités suffisantes, il est donc nécessaire de procéder à des biosynthèses (la synthèse par des systèmes vivants : cellules en culture, animaux ou plantes transgéniques).

Les différents systèmes de production

Au début des années 1980, le transfert de gènes dans des bactéries était bien maîtrisé, et la production d'insuline humaine par des bactéries génétiquement modifiées a donc pu être tentée. A cette fin, le gène de l'insuline humaine a été placé sous la dépendance du

Note de conjoncture

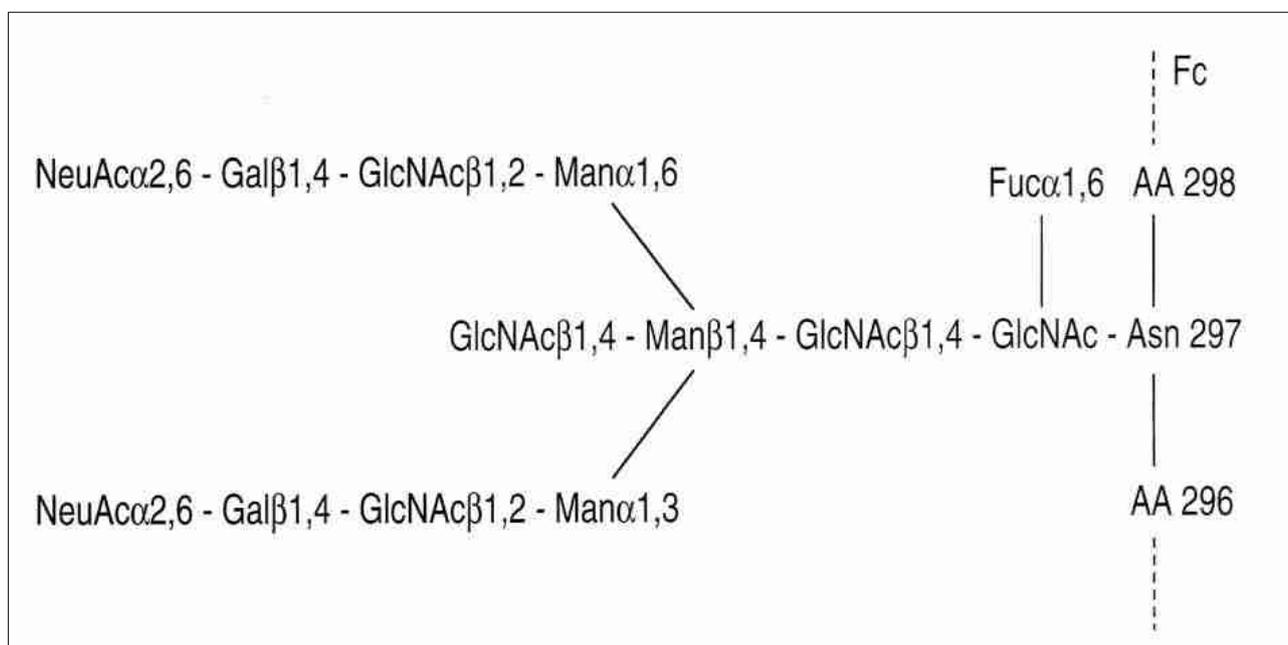


Figure 2. Structure des groupes glucidiques ajoutés aux protéines (ici au résidu de l'acide aminé asparagine 297 d'un anticorps) après leur biosynthèse. L'acide neuraminique terminal est indispensable pour augmenter la durée de vie des protéines dans le sang. L'absence de fucose augmente fortement la réaction ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) des anticorps (Olivier et Mehtali, 2009).

promoteur d'un gène bactérien. Le gène artificiel ainsi obtenu a été transféré dans des bactéries. Ce fut un succès (Villa-Komaroff *et al.*, 1980). L'insuline ainsi produite pour la première fois en 1978 s'est révélée posséder une excellente activité biologique, et elle fut approuvée pour une mise sur le marché en 1982 (Johnson, 1983). Elle est, depuis ce temps-là, utilisée à la place de l'insuline de porc, qui pourtant n'avait été à l'origine d'aucun problème particulier.

Le même protocole a été appliqué en 1984 pour l'hormone de croissance humaine (polypeptide de 191 résidus d'acides aminés), afin de disposer de plus grandes quantités de cette molécule (Chang *et al.*, 1987). Ce système devait surtout permettre d'éviter la transmission aux patients recevant des extraits d'hypophyses humaines (la région du cerveau où est synthétisée l'hormone de croissance)

d'être contaminés par des prions (agents pathogènes de nature protéique qui, chez les mammifères, sont les agents responsables des encéphalopathies spongiformes transmissibles ; Prusiner, 1982). Cette opération fut aussi un succès. Le même procédé a alors été appliqué à l'hormone de croissance bovine (Seeburg *et al.*, 1983). L'administration de cette hormone augmente la production laitière des vaches de 15 %. Il n'y avait pas d'autre moyen pour se procurer cette molécule en grandes quantités, car le nombre d'hypophyses de vaches était beaucoup trop faible pour répondre à la demande. L'hormone de croissance bovine, connue sous le nom de BST (bovine somatotropine), est utilisée dans certains élevages, notamment en Amérique du Nord, mais pas dans l'Union européenne.

D'autres tentatives pour produire des

Notes de conjoncture

Tableau 1. Représentation schématique de la construction de gènes recombinants capables de diriger la sécrétion de protéines thérapeutiques dans le lait.

	Systèmes de production					
	Bactéries	Levures	Baculovirus	CHO	Plantes	Animaux
Rendement	+++	+++++	+++	++	+++++	+++++
Investissement	+++	+++++	++	+	++++	+++
Coût de production	+++	+++++	++	++	+++++	++++
Souplesse	+++	+++++	++	+	+++++	++++
Conservation des lignées	+++	+++++	+++	+++	+++++	+++++
Stabilité des lignées	+++	+++++	++++	+++	+++++	++++
Développement	+++	+++++	++	+	+++++	++++
Collecte	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	++++
Modifications post-traductionnelles	+	++	+++	++++	+++	++++
Glycosylation	+	++	+++	++++	++	++++
Purification	+++	+++	+++	++++	+++	+++
Contamination par pathogènes	+++	+++++	+++++	++++	+++++	++++
Propriété intellectuelle	+++	+++	+++	++	+++	+++
Produits sur le marché	+++	+++	+++	+++++	+	+++

protéines pharmaceutiques se sont soldées par des échecs. Ce fut le cas pour l'alpha 1-antitrypsine humaine (inhibiteur des protéases le plus abondant dans le sérum humain). Cette

molécule produite par des bactéries recombinantes était parfaitement active *in vitro*, mais pas *in vivo* (Massoud *et al.*, 1990). D'autres outils ont donc dû être mis en œuvre. La raison pour laquelle l'alpha 1-antitrypsine

Note de conjoncture

recombinante était inactive *in vivo* a été identifiée. Beaucoup de protéines, et surtout celles qui sont sécrétées dans le sang, contiennent des groupes glucidiques (composés de sucres) attachés le long de la chaîne d'acides aminés (Figure 2).

Les protéines non glycosylées de manière appropriée (ne contenant pas à leur extrémité l'acide neuraminique ; Figure 2) sont captées par le foie et éliminées. Les bactéries ne disposent pas de gènes codant les enzymes permettant la glycosylation des protéines. Cela explique pourquoi l'alpha 1-antitrypsine produite par des bactéries n'est pas active après administration à des patients. En revanche, la molécule extraite du sang humain est glycosylée, ayant une demi-vie longue et une bonne activité *in vivo* (Massoud *et al.*, 1990). La composition des groupes glucidiques au sein des protéines peut avoir des effets délétères. Les acides neuraminiques peuvent être associés au motif N-glycosyle comme c'est le cas des protéines sécrétées dans le lait de chèvre mais pas dans les protéines humaines natives. Ces motifs glucidiques peuvent induire des réactions de rejet chez les patients (Lubon, 1998 ; Olivier & Mehtali, 2009).

D'autres événements doivent souvent avoir lieu pour qu'une protéine soit pleinement active. C'est le cas pour le repliement des protéines, processus physique par lequel une protéine se replie dans sa structure tridimensionnelle caractéristique dans laquelle elle est fonctionnelle. Les anticorps sont composés de quatre protéines glycosylées qui sont associées pour adopter une structure dans l'espace nécessaire à leur activité. Les bactéries sont incapables d'effectuer le repliement de toutes les protéines et en particulier des anticorps. Par ailleurs, certaines protéines sont dans leur état natif des pré-pro-protéines (forme précurseur d'une protéine, ou pro-protéine, comportant un peptide signal d'adressage à un compartiment subcellulaire, ou pré-pro-protéine), qui doivent perdre de courtes régions (dont le peptide signal) pour être actives. D'autres modifications post-

traductionnelles des protéines, telle la gamma-carboxylation (la fixation d'un groupe acide carboxylique COOH à un acide aminé comme l'acide glutamique), sont essentielles pour que certaines protéines soient actives (Lubon, 1998).

Il convient donc de choisir le ou les systèmes de production de protéines au cas par cas pour obtenir des protéines fonctionnelles. Il est indispensable de prendre en compte l'ensemble des facteurs et, en premier lieu, le niveau de production souhaité pour chaque protéine. D'autres paramètres, résumés dans le Tableau 1, concernent l'activité biologique, les modifications post-traductionnelles, la stabilité des organismes producteurs, le coût de production, la facilité à passer d'une démonstration au laboratoire à une production industrielle, etc.

La capacité et les limites des bactéries pour synthétiser des protéines thérapeutiques ont été discutées ci-dessus. Les levures (champignons unicellulaires) sont faciles à cultiver et les rendements en protéines peuvent être élevés (Demain & Vaishnav, 2005). Elles sont capables d'effectuer les repliements de beaucoup de protéines, mais ne les glycosylent pas ou de manière inappropriée.

Les baculovirus (virus qui infectent certains insectes) porteurs de gènes codant des protéines d'intérêt peuvent infecter des lignées de cellules d'insectes et synthétiser ainsi les protéines correspondantes (Kost *et al.*, 2005) qui ne sont pas complètement glycosylées. Cet outil est utilisé pour la recherche et peut occasionnellement permettre de disposer rapidement de protéines utilisables comme vaccins.

Il a donc été postulé que seules des cellules de mammifères pouvaient effectuer toutes les étapes de la synthèse de protéines destinées à des patients. Les cellules CHO (*Chinese hamster ovary* ; lignée cellulaire issue d'ovaires de hamster de Chine), très utilisées pour de nombreux projets de recherche et d'applications de génie génétique, sont

Note de conjoncture

devenues l'outil de référence pour produire des protéines pharmaceutiques (Houdebine, 2009 ; Bertolini *et al.*, 2016).

La plupart des modifications post-traductionnelles des protéines souhaitées sont effectuées par ces cellules. Des modifications génétiques ont permis d'améliorer leurs capacités à ajouter les glucides aux protéines (Houdebine, 2009 ; Olivier & Mehtali, 2009). Les limites des cellules CHO sont leur incapacité à synthétiser de grandes quantités de protéines et le coût élevé de leur production. Dès le début des années 1980, la transgénèse est apparue comme un outil possible pour produire des protéines thérapeutiques (Palmiter *et al.*, 1983). En effet, que ce soit pour les plantes ou pour les animaux, le nombre de cellules portant un gène étranger par individu est très élevé par comparaison avec les cellules en culture. De surcroît, les transgènes se trouvent dans une situation métabolique optimale, contrairement aux cellules en culture. Les plantes se prêtent bien à des productions massives, mais elles sont incapables de procéder à toutes les modifications post-traductionnelles qui ont lieu chez les protéines humaines. Les plantes contenant des protéines ayant des activités biologiques (par exemple croisement entre espèces apparentées) doivent par ailleurs être confinées d'une manière ou d'une autre (Houdebine & D'Aoust, 2011).

Les animaux transgéniques ont rapidement été sollicités. Dès l'année 1983, il a été observé que des souris transgéniques portant un gène d'hormone croissance de mammifères étaient plus grosses que les souris de référence et que leur sang contenait des microgrammes par millilitre de la molécule codée par le transgène (Palmiter *et al.*, 1983). Le sang d'animaux transgéniques pouvait donc être une source de protéines thérapeutiques. Des lapins portant un transgène codant le gène de l'alpha 1-antitrypsine humaine associé au promoteur d'un gène fortement exprimé dans leur foie ont été obtenus. Le sang de ces animaux contenait des quantités équivalentes d'alpha 1-antitrypsine humaine et de lapin.

Cette protéine humaine était parfaitement glycosylée et active *in vivo* (Massoud *et al.*, 1990). Ce résultat n'a pas été poursuivi par une application industrielle, car la purification de la protéine humaine, non contaminée par la protéine de lapin, aurait nécessité un investissement trop important. Par ailleurs, le succès remporté avec les lapins ne signifiait pas que le sang était une source idéale de protéines thérapeutiques. En effet, beaucoup de protéines ne sont pas stables dans le sang. C'est le cas des hormones de croissance, dont la demi-vie est de l'ordre de 15 minutes, qui ne s'accumulent pas dans le sang. Par ailleurs, les protéines humaines présentes dans le sang des animaux, contrairement au lait et au blanc d'œuf, risquent de perturber le métabolisme de leur hôte.

Un audacieux programme en cours consiste à inactiver les gènes codant les anticorps chez des vaches, porcs, lapins ou poulets, puis à transférer à ces animaux les gènes codant les anticorps humains. Lorsque ces animaux sont immunisés, ils sécrètent dans leur sang des anticorps purement humains, qui peuvent être administrés à des patients sans provoquer des réactions de rejet. Des anticorps polyclonaux humains dirigés contre le virus Ebola (virus très dangereux chez l'homme provoquant des fièvres souvent hémorragiques) et obtenus à partir de vaches transgéniques ont ainsi eu des effets positifs chez des patients. Il paraît raisonnable d'imaginer que ce procédé permettra de disposer d'anticorps variés contre des pathogènes humains (Houdebine, 2011).

Le sang peut donc être une source de protéines thérapeutiques recombinantes, mais dans des situations particulières seulement. Il a donc fallu trouver d'autres outils, et les meilleurs d'entre eux sont des organes naturellement producteurs de grandes quantités de protéines destinées à l'alimentation de la progéniture. C'est ainsi que le lait et le blanc d'œuf (voir ci-dessous) ont été retenus comme sources potentielles de protéines pharmaceutiques.

Note de conjoncture

Tableau 2. Temps pour obtenir des protéines recombinantes de lait.

	Lapin	Porc	Mouton	Chèvre	Vache
Gestation (mois)	1	4	5	5	9
Maturité sexuelle (mois)	5	6	8	8	15
Transfert du gène-première lactation (mois)	7	16	18	18	33
Nombre de descendants	8	10	1-2	1-2	1
Production annuelle de lait (litres)	15	300	500	500	8000
Protéines par femelle et par an (kg)	0,02	1,5	2,5	4	40

L'obtention, en 1985 (Hammer *et al.*, 1985), d'animaux transgéniques de ferme - des moutons, des porcs et des lapins, en mettant en œuvre les techniques mises au point chez la souris en 1980, a laissé penser que ce projet n'était pas utopique. La validation de cette méthode a eu lieu en 1987 avec la naissance de souris sécrétant dans leur lait des quantités faibles, mais bien réelles, d'une protéine humaine parfaitement active : le tPA (*tissue plasminogen activator*, ou activateur tissulaire du plasminogène, une protéase intervenant dans la dissolution des caillots sanguins ou fibrinolyse) (Gordon *et al.*, 1987). Ce pas franchi a incité les industriels à créer des entreprises travaillant en coopération avec des laboratoires de recherche académique. C'est ainsi que, au cours des années qui ont suivi, ont été créées quatre entreprises : en Grande Bretagne, *PPL Therapeutics* ; aux États-Unis, *Genzyme Transgenics Corporation* ; aux Pays-

Bas, *Pharming Group NV* ; en France, *BioProtein Technology*, utilisant respectivement des moutons, des chèvres et des porcs, des vaches et des lapins.

Les premiers résultats ont été suffisamment encourageants pour que l'on puisse faire les prédictions suivantes : sachant que les vaches, les chèvres, les moutons, les porcs et les lapins produisent respectivement 8000, 800, 500, 300 et 15 litres de lait par an et par femelle (Tableau 2), cela signifiait que ces mêmes animaux pouvaient produire respectivement 40, 4, 2,5, 1,5 et 0,02 kg de protéines pharmaceutiques par femelle et par an. Ainsi, pour répondre à la demande annuelle du marché, il faudrait 5 400 vaches pour produire les 100 000 kg attendus d'albumine, 4 300 moutons pour produire 5 000 kg d'alpha 1-antitrypsine, 58 chèvres pour produire 100 kg d'anticorps monoclonaux, 43 chèvres pour produire 75 kg d'anti-thrombine-III, 4 porcs pour

Note de conjoncture

produire 2 kg de facteur IX de coagulation et 50 lapins pour produire 1 kg d'inhibiteur de l'estérase C-1 (Tableau 3). Pour frapper les esprits, une des entreprises annonçait que le lait d'une seule chèvre produisait par an autant d'anti-thrombine-III que 90 000 prélèvements de sang humain (*Genzyme Transgenics Corporation*) !

Diverses erreurs techniques et managériales, des promesses non tenues et le peu d'enthousiasme des grandes entreprises de la

Tableau 3. Quantités potentielles de protéines à produire dans le lait.

Protéines	kg/par an	Espèces	Nombre d'animaux
Albumine sérique	100 000	Vache	5400
Alpha-1-antitrypsine	5000	Mouton	4300
Anticorps monoclonaux	100	Chèvre	58
Anti-thrombine-III	75	Chèvre	43
Facteur-IX	2	Porc	4
Inhibiteur-G-1	1	Lapin	50

pharmacie qui sont inévitablement dans la chaîne pour mener à bien les tests de validation des protéines ont ébranlé ce bel édifice. L'entreprise des USA (*Genzyme Transgenics Corporation*) a été rachetée par une grande entreprise française de la préparation de facteurs sanguins (LFB : *Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies*), l'entreprise britannique (*PPL Therapeutics*) a fait faillite et l'entreprise française (*BioProtein Technology*) a dû rejoindre l'entreprise hollandaise (*Pharming Group NV*) à la suite du non-respect d'un contrat passé avec le LFB, son principal partenaire. Pendant ce temps, les Argentins, les Chinois et quelques autres

groupes dont *ProGenetics* (USA ; <http://www.progenetics.co.il/index.php/about-us>) suivent leur chemin avec succès !

Autres systèmes possibles de production

Le blanc d'œuf : La mise en œuvre du blanc d'œuf comme source de protéines thérapeutiques a eu lieu plus tardivement que celle du lait. La raison principale de ce délai vient du fait que les techniques de transgénèse couramment utilisées pour les mammifères, les vertébrés inférieurs et les invertébrés n'étaient pas opérationnelles chez les oiseaux. Il a fallu attendre la mise au point des vecteurs rétroviraux et des cellules souches de gonades pour que l'obtention de poulets transgéniques devienne une réalité (Kamihira *et al.*, 2005). Dans un premier cas, les gènes à transférer sont introduits dans des vecteurs rétroviraux utilisés pour infecter des cellules embryonnaires. Dans un deuxième cas, les gènes sont introduits dans des cellules souches de gonades (organes reproducteurs), qui sont transférées dans des embryons précoces, donnant naissance à des animaux chimères et mosaïques pour le transgène. Dans cette situation le transgène n'est présent que dans une partie des cellules de l'animal chimère. La transmission du transgène est alors inférieure à 50 % mais elle suit les lois de Mendel dans les générations suivantes (Houdebine, 2013).

Plusieurs protéines thérapeutiques ont été obtenues dans le blanc d'œuf à des niveaux relativement modestes (Bertolini *et al.*, 2016). Des améliorations des vecteurs de transgénèse sont donc nécessaires. Une enzyme, l'alpha sélipase, produite dans le blanc d'œuf par *Alexion Pharmaceuticals* a été adoptée par la FDA (*Food and drug administration*). La production d'autres enzymes dont une destinée à traiter les déficiences de lipase lysosomiale acide ainsi que la maladie du stockage d'ester de cholestérol est en cours de préparation avec les mêmes outils pour traiter des maladies humaines. Un point positif est le fait que,

Note de conjoncture

contrairement de la plupart d'autres systèmes de production de protéines, le blanc d'œuf ne contient pas de protéases susceptibles de détruire les protéines d'intérêt. Un point négatif est le fait que certains patients traités par des protéines issues du blanc d'œuf ont développé des réactions anaphylactiques (Sheridan, 2016).

Des anticorps monoclonaux anti-tumeurs ont été produits dans le blanc d'œuf. Toutefois, ces protéines ne sont pas complètement glycosylées, ce qui réduit leur demi-vie *in vivo* et oblige à en administrer des quantités relativement élevées aux patients. Par ailleurs, les anticorps monoclonaux produits dans le blanc d'œuf ne contiennent pas de fucose (Figure 2), ce qui les rend plus aptes à stimuler les cellules tueuses des patients et à induire une involution des tumeurs ciblées (Olivier & Mehtali, 2009).

L'urine et le plasma séminal : Il a été montré que l'urine de souris transgéniques pouvait contenir de l'hormone de croissance humaine fonctionnelle. Des quantités notables de protéines thérapeutiques pourraient être produites à partir de gros animaux. Le plasma séminal de porcs transgéniques peut également contenir des protéines thérapeutiques. Les glandes séricigènes des vers à soie et les larves de drosophile sont aussi des systèmes potentiels de production de protéines thérapeutiques (Houdebine, 2009 ; Bertolini *et al.*, 2016).

Le lait : Le laps de temps qui s'écoule entre le transfert de gènes pour obtenir des animaux transgéniques et les premières mesures des concentrations des protéines dans le lait va de quelques mois à plusieurs années, selon les espèces (Tableau 2).

Afin de raccourcir ce temps, il est possible de procéder à des inductions de lactation artificielles chez des animaux (des vaches) matures sexuellement (entre 9 et 12 mois) en leur administrant pendant quelques semaines des œstrogènes, de la progestérone, des glucocorticoïdes, de la prolactine et de

l'hormone de croissance. Ce procédé permet de mesurer le taux de protéines recombinantes dans le lait et d'analyser leurs propriétés biologiques. Ces informations permettent de prendre la décision de développer ou pas chacune des lignées d'animaux transgéniques.

Un autre procédé consiste à injecter dans les trayons d'animaux en lactation des vecteurs adénoviraux portant le gène codant la protéine d'intérêt. Le lait de ces animaux, collecté pendant les quelques jours qui suivent le transfert de gènes, peut contenir jusqu'à 3-4 mg/mL de protéine thérapeutique (Bertolini *et al.*, 2016). Cette opération peut être répétée plusieurs fois. Ce procédé est laborieux, et il nécessite de respecter les consignes de confinement et de bien-être animal.

Enfin, le clonage des animaux transgéniques permet de plus d'accélérer la constitution de troupeaux producteurs de protéines thérapeutiques.

Conclusion

Force est de constater qu'il s'est passé 19 ans entre la naissance des premières souris sécrétant une protéine humaine dans leur lait (Gordon *et al.*, 1987) et la mise sur le marché de la première protéine issue de lait de chèvre, l'antithrombine-III (en 2006 aux États-Unis), et quatre ans de plus pour l'inhibiteur de l'estérase C-1 produit dans le lait de lapin (*Pharming Group NV*). Ce temps est relativement long, ce qui a quelque peu dissuadé les investisseurs et les grandes entreprises pharmaceutiques de collaborer avec les entreprises (start up ou spin up) concernées.

Les commissions de sécurité des États-Unis et de l'Union européenne chargées d'évaluer les bienfaits attendus et les risques d'un ensemble de procédés nouveaux ont dû faire face à la situation nouvelle que représente la biosynthèse de protéines médicaments par les animaux transgéniques. Tout bien pesé, les 19

Note de conjoncture

ans d'attente ne sont pas beaucoup plus longs que le temps nécessaire pour évaluer la plupart des médicaments classiques.

Il y a aujourd'hui 24 projets connus en cours, dont trois concernent des facteurs sanguins de coagulation VII, VIII et IX destinés aux hémophiles et qui sont en phase III d'évaluation (Bertolini *et al.*, 2016). Ces projets concernent des protéines très variées. Il paraît très probable que la majorité des projets auront dans le futur pour objet de produire des anticorps monoclonaux dirigés contre des tumeurs. Le lait est une source qui répond bien à cette demande compte tenu du fait que les quantités d'anticorps nécessaires sont relativement élevées.

Plusieurs projets ont pour but de modifier la composition du lait en lui apportant par transgénèse des protéines antibactériennes à large spectre dont deux, la lactoferrine et le lysozyme (une hydrolase acide capable de détruire la paroi bactérienne) (Cui *et al.*, 2015) sont présentes en abondance dans le lait humain mais pas dans le lait de vache. La lactoferrine est de surcroît porteuse de fer, qui fait défaut dans le lait des ruminants d'élevage. La troisième protéine, la lysostaphine (une métallo-endopeptidase), qui est d'origine bactérienne a pour but de freiner le développement des mammites (Wall *et al.*, 2005). Ces protéines ne sont pas au sens strict des médicaments mais elles sont par nature capables de prévenir des épidémies par des administrations orales ou mammaires.

La transgénèse permet également de modifier la composition du lait de manière à améliorer la santé des consommateurs : sécrétion d'anticorps monoclonaux dirigés contre des virus ou des bactéries, diminution du taux de lactose lequel cause une intolérance chez les consommateurs de divers pays, suppression d'allergènes (bêta-lactoglobuline, caséines), diminution des acides gras saturés et augmentation des oméga-3.

Il semble que certaines grandes entreprises pharmaceutiques n'étaient pas et ne sont peut-être toujours pas pressées d'adopter les

protéines-médicaments issues d'animaux transgéniques. C'est sans doute le cas pour les facteurs sanguins de coagulation et les anticorps monoclonaux dirigés contre des tumeurs. Ces protéines provenant actuellement de cellules CHO sont une source de bénéfices certains pour ceux qui les produisent. L'EPO (érythropoïétine, une hormone stimulant la formation et la croissance des globules rouges), et le facteur VII (qui intervient dans le processus de coagulation du sang) sont vendus au prix de 1 M€/g. Du facteur VII a été obtenu par *BioProtein Technology* dans le lait de lapins à la concentration de 3 mg/mL. Le prix de revient brut des protéines provenant du lait est en moyenne sept fois plus faible que celui des mêmes protéines issues de cellules CHO (Bertolini *et al.*, 2016). Il convient toutefois d'interpréter ces données en prenant en compte le fait que la purification des protéines et leur validation représentent la majeure partie du coût de production, quel que soit le procédé mis œuvre pour obtenir les protéines. Pendant les 19 dernières années, qui ont été nécessaires pour produire commercialement la première protéine thérapeutique, les techniques de transgénèse se sont très notablement améliorées. Une amélioration est la mise en œuvre du clonage. Pour ce faire le gène à transférer est introduit dans des cellules fœtales qui sont utilisées comme donneuses de noyaux pour le clonage (Schnieke *et al.*, 1997). Cette méthode qui conduit à la naissance de clones transgéniques est appliquée régulièrement pour les gros animaux de ferme.

Une autre amélioration attendue est l'usage des outils (CRISPR-Cas9) permettant une intégration ciblée des gènes directement dans le génome (Quétier, 2016) pour remplacer les gènes de protéines du lait par ceux codant les protéines thérapeutiques (Ran *et al.*, 2013). De tels outils permettraient des succès moins versatiles que les techniques mettant en œuvre des vecteurs d'expression classiques (Houdebine, 2014).

Note de conjoncture

Il est probable que les nouveaux outils seront capables de diminuer l'expression non strictement mammaire des transgènes, expression qui se traduit parfois par la présence de protéines thérapeutiques dans le sang des animaux et exerçant sur eux des effets délétères (Massoud *et al.*, 1996).

Les techniques de transgénèse n'infligent pas aux animaux producteurs de protéines thérapeutiques des souffrances particulières, sauf exception, comme dans le cas de la production d'EPO (Massoud *et al.*, 1996). Les animaux producteurs de protéines thérapeutiques sont des organismes génétiquement modifiés. Il est notable que l'opinion publique ne s'oppose que modérément à de telles pratiques tant il est clair que les enjeux concernent la santé humaine (PEGASUS. 2014).

Le cas du taureau Herman fait exception. Ce taureau transgénique a été obtenu en 1990 par *Gen Pharm* (devenue *Pharming Group NV*) pour produire de la lactoferrine humaine dans le lait (Krimpenfort *et al.*, 1991). Ce projet a été contesté aux Pays Bas pour des raisons éthiques (voir *Herman the bull* dans la liste des références). Le gouvernement néerlandais a donné son autorisation en 1992 pour que Herman puisse se reproduire afin de permettre l'étude des effets du transgène, mais pas en vue de développer un troupeau destiné à la production de lactoferrine.

Le lait des femelles descendantes de Herman contient comme attendu de la lactoferrine humaine mais en quantité relativement faible. Ce projet a été repris avec un meilleur succès par un laboratoire chinois qui a utilisé des vecteurs contenant le gène de la lactoferrine humaine entouré des deux régions d'ADN génomique humain (Yang *et al.*, 2008). Après la naissance de 83 veaux, Herman n'a plus été utilisé. Il a été euthanasié au cours de sa 13^e année, car il souffrait d'arthrite considérée comme naturelle.

Les animaux en question sont élevés dans des conditions ne permettant pas leur infection par des agents pathogènes ni leur évasion ou la

dissémination intempestive de leurs transgènes (EFSA, 2013). Une attention particulière est portée pour que les animaux ne souffrent pas de maladies à prions. Sur ce point, les lapins présentent particulièrement peu de risques, car ils ne développent pas spontanément de maladies à prions (Sarradin *et al.*, 2015). La viande des animaux sacrifiés après la fin de leur service est soigneusement tenue hors des circuits de l'alimentation humaine.

Les différents systèmes de production de protéines thérapeutiques sont fonctionnels à des degrés divers. Les plus importants (lait, blanc d'œuf, plantes, levures, cellules CHO) sont en cours d'amélioration sur essentiellement deux points : le niveau de production et la capacité à effectuer les modifications post-traductionnelles. Pour atteindre le second de ces buts, des gènes favorisant la glycosylation, le clivage des protéines, la gamma-carboxylation, etc. (Lubon, 1998) sont transférés à divers animaux et à d'autres systèmes qui acquièrent ainsi la capacité de produire diverses protéines dont les modifications post-traductionnelles sont satisfaisantes. Cela laisse supposer que la demande de protéines thérapeutiques sera mieux satisfaite dans l'avenir, en particulier dans les pays en développement, qui ne peuvent que difficilement se payer, par exemple, des anticorps monoclonaux anti-tumeurs.

Après trois décennies il apparaît que la production de protéines thérapeutiques par les animaux transgéniques est moins simple que ce que l'on imaginait. Il est clair qu'il n'existe pas de systèmes universels pour obtenir dans de bonnes conditions toutes les protéines désirées. Il est probable que les différents outils disponibles et en cours d'amélioration seront choisis au cas par cas en tenant compte de toutes les contraintes spécifiques de chaque situation. Il est probable que le lait d'animaux transgéniques restera une des sources pour la production de protéines thérapeutiques.

Note de conjoncture

Références

- Bertolini LR, Meade H, Lazzarotto CR, Martins LT, Tavares KC, Bertolini M, Murray JD. 2016. The transgenic animal platform for biopharmaceutical production. *Transgenic Research*, 25(3), 329-343.
- Chang CN, Rey M, Bochner B, Heyneker H, Gray G. 1987. High-level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli*. *Gene*, 55(2-3), 189-196.
- Cooper CA, Brundige DR, Reh WA, Maga EA, Murray JD. 2011. Lysozyme transgenic goats milk positively impacts intestinal cytokine expression and morphology. *Transgenic Research*, 20(6), 1235-1243.
- Cui D, Li J, Zhang L, Liu S, Wen X, Li Q, Zhao Y, Hu X, Zhang R, Li N. 2015. Generation of bi-transgenic pigs overexpressing human lactoferrin and lysozyme in milk. *Transgenic Research*, 24(2), 365-373.
- Demain AL, Vaishnav P. 2005. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297-306.
- EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). 2013. Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified animals. *The EFSA Journal*, 11(5), 3200.
- Gordon K, Lee E, Vitale JA, Westphal H, Hennighausen H. 1987. Production of human plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Bio Technology*, 5, 1183-1187.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 315, 680 - 683.
- Herman the bull (<http://www.redorbit.com/reference/herman-the-bull/>)
- Houdebine LM. 2009. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32, 107-121.
- Houdebine LM. 2011. Production of human polyclonal antibodies by transgenic animals. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2, 138-141.
- Houdebine LM, D'Aoust MA. 2011. La production de protéines biosynthétiques à usages thérapeutiques. In Ricoch A, Dattée Y, Fellous M (eds) *Biotechnologies végétales. Environnement, alimentation, santé*. Editions Vuibert, Paris, 223-231.
- Houdebine LM. 2013. *Les animaux transgéniques*. <http://urlz.fr/4wuX>.
- Houdebine LM. 2014. Design of vectors for optimizing transgene expression. In Pinckert CA (ed) *Transgenic Animal Technology. A Laboratory Handbook*. Elsevier, 489-507.
- Johnson IS. 1983. Human insulin from recombinant DNA technology. *Science*, 219(4585), 632-637.
- Kamihira M, Ono KI, Esaka K, Nishijima KI, Kigaku R, Komatsu H, Yamashita T, Kyogoku K, Iijima S. 2005. High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. *Journal of Virology*, 79(17), 10864-10874.
- Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 23(5), 567-575.

Note de conjoncture

- Krimpenfort P, Rademakers A, Eyestone W, van der Schans A, van den Broek S, Kooiman P, Kootwijk E, Platenburg G, Pieper F, Strijker R, De Boer H. 1991. Generation of transgenic dairy cattle using 'in vitro' embryo production. *Biotechnology (NY)*, 9(9), 844-847.
- Lubon H. 1998. Transgenic animal bioreactors in biotechnology and production of blood proteins. *Biotechnology Annual Review*, 4, 1-54.
- Massoud M, Bischoff R, Dalemans W, Pointu H, Attal J, Schultz H, Clesse D, Stinnakre MG, Pavirani A, Houdebine LM. 1990. Production of human proteins in the blood of transgenic animals. *Compte Rendus de l'Académie des Sciences série III*, 311, 275-280.
- Massoud M, Attal J, Thepot D, Pointu H, Stinnakre MG, Theron MC, Lopez C, Houdebine LM. 1996. The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reproduction Nutrition Development*, 36, 555-563.
- Olivier S, Mehtali M. 2009. Les systèmes alternatifs de production d'anticorps monoclonaux thérapeutiques. *Médecine/Science*, 25(12), 1163-1168.
- Palmiter RD, Norstedt G, Gelinas RE, Hammer RE, Brinster RL. 1983. Metallothionein human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science*, 222(4625), 809-814.
- PEGASUS. 2014. *Final Report*. http://cordis.europa.eu/result/rcn/58569_en.html.
- Prusiner SB. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216(4542), 136-144.
- Quétier F. 2016. The CRISPR-Cas9 technology: Closer to the ultimate toolkit for targeted genome editing. *Plant Science*, 242, 65-76.
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281-2308.
- Sarradin P, Viglietta C, Limouzin C, Andréoletti O, Daniel-Carlier N, Barc C, Leroux-Coyau M, Berthon P, Chapuis J, Rossignol C, Gatti JL, Belghazi M, Labas V, Vilotte JL, Béringue V, Lantier F, Laude H, Houdebine LM. 2015. Transgenic rabbits expressing ovine PrP are susceptible to scrapie. *PLoS Pathogens*, 11(8), e1005077.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KH. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 9, 278(5346), 2130-2133.
- Seeburg PH, Sias S, Adelman J, de Boer HA, Hayflick J, Jhurani P, Goeddel DV, Heyneker HL. 1983. Efficient bacterial expression of bovine and porcine growth hormones. *DNA*, 2(1), 37-45.
- Sheridan C. 2016. FDA approves "farmaceutical" drug from transgenic chickens. *Nature Biotechnology*. 34(2), 117-119.
- Takai K, Sawasaki T, Endo Y. 2010. Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos. *Nature Protocols*, 5(2), 227-38.
- Villa-Komaroff L, Broome S, Naber SP, Efstratiadis A, Lomedico P, Tizard R, Chick WL, Gilbert W. 1980. The synthesis of insulin in bacteria: a model for the production of medically useful proteins in prokaryotic cells. *Birth Defects Original Article Series*, 16(1), 53-68.
- Wall RJ, Powell AM, Paape MJ, Kerr DE, Bannerman DD, Pursel VG, Wells KD, Talbot N, Hawk HW. 2005. Genetically enhanced cows

Note de conjoncture

resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nature Biotechnology*, 23(4), 445-451.

Yang P, Wang J, Gong G, Sun X, Zhang R, Du Z, Liu Y, Li R, Ding F, Tang B, Dai Y, Li N. 2008. Cattle mammary bioreactor generated by a novel procedure of transgenic cloning for large-scale production of functional human lactoferrin. *PLoS One*, 3(10), e3453.

Reçu

20 octobre 2016

Accepté

12 décembre 2016

Publié

15 décembre 2016

Citation:

Houdebine LM. 2016. *Des protéines thérapeutiques produites par des animaux transgéniques*. Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture, 11, 1-16. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a435750>

Edité par

Dominique Job, membre de l'Académie d'agriculture de France.

Rapporteurs

1. Marcel Kuntz, directeur de recherche au CNRS, Grenoble, France
2. Francis Quétier, professeur émérite des Universités, Génopole, Evry, France.
3. Jean-Paul Renard, directeur de recherche honoraire à l'Inra, membre de l'Académie d'agriculture de France.

Rubrique

Cet article a été publié dans la rubrique «Notes de conjoncture » des *Notes académiques de l'Académie d'agriculture de France*.



Louis-Marie Houdebine est directeur de recherche honoraire à l'Inra et membre de l'Académie d'agriculture de France.