

## Les plantes transgéniques pour la production de molécules à effets thérapeutiques



Assoumane Aïchatou  
Rekima Samah  
Tap Julien

2005-2006

Université Pierre et Marie Curie – Paris VI  
M2GGB - Master 2ème année mention biologie moléculaire et cellulaire  
Spécialité génétique  
Parcours professionnel Génétique et Gestion de la Biodiversité

# Les plantes transgéniques pour la production de molécules à effets thérapeutiques

Assoumane Aïchatou  
Rekima Samah  
Tap Julien

2005-2006

## Résumé

Le génie génétique permet, en principe, de faire synthétiser n'importe quelle protéine à partir d'un gène isolé et transféré dans une cellule qui prend en charge son décodage et le plus souvent la sécrétion de la protéine en question. Dans le cas des plantes, plusieurs techniques de transgénèse ont été développées. Les **plantes transgéniques** peuvent être ainsi utilisées comme des **plates-formes de production** de molécules thérapeutiques soit par voie directe dans le cadre de la production d'anticorps ou de lipase gastrique soit par voie indirecte dans le cadre de la synthèse de terpène (ginkgolides). 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. Les plantes transgéniques ne sont pas les seules sources de molécules thérapeutiques. Elles sont en effet en compétition avec d'autres formes de productions qui utilisent, des bactéries, des levures, des cellules de mammifères ou encore des animaux transgéniques.

L'exemple, ici développé, de la production des ginkgolides pose la question des **détenteurs des ressources génétiques**. En effet, les universités et les laboratoires pharmaceutiques déposent de moyen légaux pour s'approprier le vivant à travers le brevet du gène isolé et le COV pour la création d'une nouvelle variété végétale. Dès lors, les **communautés autochtones** des pays riches en biodiversité ne peuvent pas protéger leurs ressources génétiques par manque de moyens légaux et financiers. Malgré le passage d'un concept qui était établi que les ressources génétiques sont un patrimoine commun de l'humanité à un concept de souveraineté nationale dans la **Convention de la Diversité Biologique**, les savoirs locaux sont difficilement définissables de part leur nature et leur voie de transmission.

Néanmoins le problème se situe aussi en amont au moment de la **bioprospection dans un but pharmaceutique** où il serait utile de définir un cadre plus concret. Ce cadre comprendrait d'une part une rémunération pour la transmission du savoir mais aussi une implication plus importante pour la recherche publique. Pour finir, le vrai défi pour les pays est de pouvoir ajouter eux-mêmes de la valeur à leurs ressources génétiques brutes plutôt que de les exporter vers d'autres pays où seront développés les produits finis et, en fin de compte, réalisés les plus importants profits.

Mot clés : **plantes transgéniques, plates-formes de production, glycosylation, détenteurs des ressources génétiques, communautés autochtones, Convention de la Diversité Biologique, bioprospection dans un but pharmaceutique.**

# Sommaire

## RESUME

## SOMMAIRE

|   |           |
|---|-----------|
| INTRODUCTION.....   | 1         |
| <b>I. LES PLANTES TRANSGENIQUES : DES PLATES-FORMES DE PRODUCTION POUR BIOPHARMACEUTIQUES.....</b>                                | <b>3</b>  |
| A. LES TECHNIQUES DE TRANSGENESE VEGETALE .....   | 3         |
| 1. <i>Historique</i> : .....  | 3         |
| 2. <i>Définition</i> : .....  | 4         |
| 3. <i>Les techniques de transfert de gènes chez les végétaux</i> .....  | 4         |
| 4. <i>Avantages et inconvénients des différentes techniques de transfert de gènes</i> .....                                       | 10        |
| B. COMPARAISON ENTRE LES DIFFERENTES FORMES DE PRODUCTION DE MOLECULES THERAPEUTIQUES....   | 11        |
| 1. <i>Production de protéines recombinantes par les bactéries</i> .....   | 11        |
| 2. <i>Production de protéines recombinantes par les levures</i> .....   | 13        |
| 3. <i>Production de protéines recombinantes par les cellules de mammifères</i> .....  | 13        |
| 4. <i>Production de protéines recombinantes par les animaux transgéniques</i> .....   | 14        |
| 5. <i>Comparaison des différents systèmes d'expression</i> .....  | 16        |
| C. L'EMERGENCE DE PLATES-FORMES DE PRODUCTION POUR LES BIOPHARMACEUTIQUES .....   | 18        |
| 1. <i>Potentialité des espèces végétales</i> .....  | 18        |
| 2. <i>Production d'anticorps dans les plantes transgéniques</i> .....   | 21        |
| 3. <i>La production de lipase gastrique dans le tabac</i> .....   | 22        |
| 4. <i>Le riz pour exprimer les terpènes du ginkgo</i> .....   | 24        |
| <b>II. LA PRODUCTION DES MOLECULES A EFFETS THERAPEUTIQUES : LA QUESTION DES DETENEURS .....</b>                                  | <b>27</b> |
| A. L'APPROPRIATION DES RESSOURCES GENETIQUES.....   | 27        |
| 1. <i>Droit de propriété intellectuelle</i> .....   | 27        |
| 2. <i>Croissance des brevets dans le domaine du vivant</i> .....  | 29        |
| 3. <i>L'appropriation du vivant permise par l'affaiblissement des critères classiques de la brevetabilité</i> 31                  |           |
| 4. <i>Les revers du brevet pour la recherche</i> .....  | 32        |
| B. SITUATION DES DETENEURS DES RESSOURCES GENETIQUES .....  | 34        |
| 1. <i>L'évolution du cadre international : de la liberté totale de l'accès à l'affirmation de la souveraineté nationale</i> ..... | 34        |
| 2. <i>Les droits des communautés autochtones</i> .....  | 35        |
| C. LA BIO PROSPECTION A BUT PHARMACEUTIQUE .....  | 37        |
| <b>CONCLUSION .....</b>   | <b>40</b> |
| <b>TABLES DES ILLUSTRATIONS</b>   |           |
| <b>BIBLIOGRAPHIE</b>  |           |

## Introduction

Les ressources biologiques ont de tout temps été exploitées par l'Homme pour différents usages. Dans le domaine thérapeutique, les vertus curatives ou au contraire la toxicité des plantes ont été très tôt utilisées. Aujourd'hui, à côté des médicaments fabriqués uniquement par synthèse chimique, d'autres sont obtenus par traitement chimique de substances naturelles, végétale le plus souvent, animales ou micro-organismes. Il existe également des remèdes purement naturels qui sont rarement d'origine animale (comme le miel) ou minérales (comme la tourbe médicinale) mais qui proviennent presque exclusivement de plantes.

Les molécules issues de ces organismes peuvent être utilisées comme réactifs dans un but de diagnostique ou de thérapie. Dans un premier temps, ces molécules étaient extraites d'organismes vivants, c'était le cas notamment de l'insuline à partir des pancréas de porc. Ces systèmes ne permettent pas une production suffisante en terme de quantité ce qui implique un coût élevé d'extraction d'autant plus que les risques sanitaires ne sont pas négligeables. Pour pallier à ces inconvénients, le génie génétique a permis la production de ces molécules thérapeutiques dans des organismes hétérologues.

C'est ainsi que des fermenteurs microbiens ou des cultures de lignée cellulaire de mammifère ont été utilisés pour mieux contrôler la production. Cependant ces systèmes ont des désavantages en termes de coûts et de sécurité, ce qui a conduit la recherche vers d'autres alternatives. Dans le but d'éliminer les risques de contamination par des endotoxines ou de pathogènes, des vaccins candidats ont pu être exprimés dans des organites de plantes transgéniques. Le génie génétique permet, en principe, de faire synthétiser n'importe quelle protéine à partir d'un gène isolé et transféré dans une cellule qui prend en charge son décodage et le plus souvent la sécrétion de la protéine en question. Une protéine ainsi obtenue en dehors de sa cellule d'origine est dite recombinante.

Depuis le développement du génie génétique l'utilisation des plantes à radicalement changé, elle est passée du statut de matière première à celui de plates-formes de production. L'utilisation des plantes transgéniques à des fins thérapeutiques peut elle être considérée comme un outil pour la valorisation des ressources génétiques ? Quels sont les impacts sur les détenteurs des ressources génétiques ?

Afin de répondre à cette problématique, nous traiterons dans une première partie des plantes transgéniques en tant que plates-formes de production pour les biopharmaceutiques, en étayant par des exemples concrets et une comparaison avec les autres modes de production. Dans une seconde

partie, nous traiterons la question des détenteurs des ressources génétiques avec les problèmes liés à l'appropriation du vivant et la situation actuelle des détenteurs des ressources génétiques.

# I. Les plantes transgéniques : des plates-formes de production pour biopharmaceutiques

Les produits biopharmaceutiques sont élaborés à partir de macromolécules complexes créées par la manipulation génétique d'organismes vivants en utilisant des technologies complexes.

Dans le cas des plantes, plusieurs techniques de transgénèse ont été développées. Il conviendra d'analyser l'émergence de l'utilisation des plantes transgéniques comme plates-formes de production pour biopharmaceutiques en la comparant avec les autres organismes génétiquement modifiables. Les plantes transgéniques peuvent être ainsi utilisés pour la production de molécules thérapeutiques soit par voie directe dans le cadre de la production d'anticorps ou de lipase gastrique soit par voie indirecte dans le cadre de la synthèse de terpène..

## A. Les techniques de transgénèse végétale

Après avoir illustré le principe de la transgénèse, les avantages et les inconvénients de chaque technique seront traités.

### 1. Historique :

La "galle du collet" (ou crown gall) est une maladie qui atteint de nombreuses plantes cultivées suite à des lésions. Le grossissement démesuré de la tige des espèces végétales atteintes est l'un des symptômes caractéristiques facilement observable. En l'état, ceci se traduit par le dépérissement de la plante. [10]

Au début du siècle, le phytopathologiste américain, Erwin Smith identifia l'agent de cette maladie : une bactérie du sol, *Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie affecte naturellement les dicotylédones.[38] Entre 1960 et 1970, Georges Morel et ses collaborateurs de l'INRA de Versailles, ont montré que la tumeur induite par ces bactéries sur les plantes sensibles fait que celles-ci synthétisent des substances particulières, les opines. Ces substances spécifiques, absentes des cellules végétales saines, sont synthétisées par les cellules tumorales. Cette découverte conforta l'idée que l'acquisition de la propriété de synthétiser des opines par les cellules tumorales résultait d'un transfert d'information génétique de la bactérie à la cellule végétale. [16]

Cette hypothèse, qui fut validée en 1974 grâce aux travaux de l'équipe de Jeff Schell et Marc Van Montagu en Belgique, montra que cette transformation génétique des cellules végétales était l'oeuvre de plasmides présents dans les souches virulentes de *Agrobacterium*. Dans le cas de la galle du collet ce plasmide est appelé Ti (pour Tumor inducing).[16]

Enfin, en 1977, Mary Dell Chilton en association avec une équipe américaine, montrait que la transformation de cellules végétales par *Agrobacterium tumefaciens* résulte de l'intégration dans leur génome d'un fragment d'ADN (appelé ADN-T pour ADN transféré) issu des plasmides Ti. Les gènes portés par l'ADN-T ne s'expriment pas dans *Agrobacterium*, mais seulement dans le noyau des cellules végétales ; présents sur le plasmide Ti, ils apportent des signaux de régulation de type eucaryote. [38]

## **2. Définition :**

La transgénèse - ou transfert de gènes - est l'addition d'un gène étranger, appelé transgène, mais aussi dans d'autres cas le remplacement d'un gène par recombinaison homologue et de le faire fonctionner dans un être vivant. L'organisme ou la cellule, qui reçoit alors l'ADN étranger, est susceptible de réagir en fonction de l'information génétique qui lui est transmise, par exemple en fabriquant une protéine non synthétisée naturellement. [16]

## **3. Les techniques de transfert de gènes chez les végétaux**

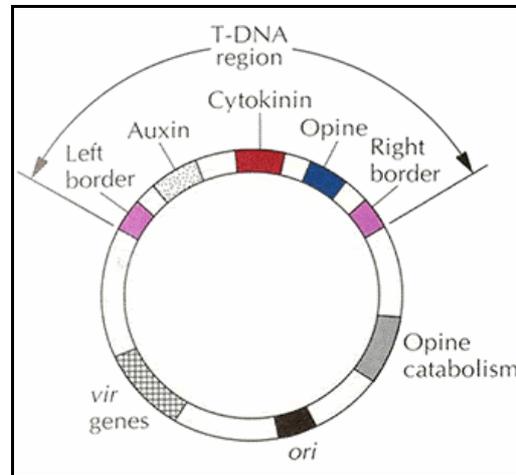
Les plantes peuvent être régénérées assez facilement à partir d'une cellule somatique. Cette capacité découle de la propriété de totipotence des cellules végétales lui conférant *in vitro* la faculté de régénérer une plante entière. La cellule végétale est donc apparue comme l'unité fondamentale dans le processus de la création d'une lignée de végétaux transgéniques. En revanche, la paroi pectocellulosique cellulaire rigide (absente chez les cellules animales) constitue un obstacle au transfert de gène, qui peut être contourné par l'utilisation des bactéries du genre *Agrobacterium*. [16]

L'existence d'espèces végétales insensibles à cette bactérie a incité les chercheurs à mettre au point d'autres méthodes. Aussi, actuellement deux familles de techniques sont réalisées pour la transformation génétique de cellules végétales : l'une consistant à utiliser les propriétés de *Agrobacterium*, l'autre faisant intervenir des méthodes physiques ou chimiques qui permettent la pénétration de l'ADN directement dans les cellules végétales. [19]

### **a) La transformation de cellules végétales par *Agrobacterium* :**

L'exemple de la transformation d'un plant de tabac par un gène résistant à la kanamycine est une bonne illustration pour expliquer les différentes étapes de la transgénèse par *Agrobacterium*. Le principe de la transgénèse repose sur les caractéristiques du plasmide Ti natif (Figure 1) portée par *Agrobacterium tumefaciens* qui est alors utilisé comme un vecteur. Le plasmide natif est responsable de la tumorigénèse des cellules végétales mais grâce à une modification génique, il peut être utilisé pour la transgénèse. Les gènes ONC (Auxine, Cytokinine et Opine) possèdent des

fonctions oncogènes pour les cellules végétales. Ils sont supprimés de l'ADN-T et sont remplacés par le gène d'intérêt. Ceci a pour effet de désarmer le plasmide tout en conservant la possibilité de transférer le gène de la bactérie vers le noyau de la cellule végétale par l'intermédiaire des gènes VIR. [38]



**Figure 1: Carte simplifiée du plasmide Ti natif**

De manière simplifiée, quatre étapes peuvent être décrites pour obtenir des plants de tabac transformés. [16] Dans un premier temps, la construction génique réalisée en laboratoire associe trois parties :

- la séquence codante du gène d'intérêt. Le gène d'intérêt, identifié et isolé, est ici une séquence codante conférant la résistance à la kanamycine (néomycine phosphotransférase NPT);
- un promoteur NOS (nopaline synthétase) de l'ADN-T d'*Agrobacterium* ;
- un terminateur NOS de ce même ADN-T.

Les deux dernières parties constituent des parties du plasmide Ti de la bactérie et sont nécessaires pour pouvoir faire fonctionner le gène associé dans un environnement nouveau, la cellule végétale.

Dans un deuxième temps, la bactérie transformée est incubée avec des fragments découpés de feuille de tabac. Les cellules végétales blessées permettent de stimuler le transfert de gène par *Agrobacterium*. Les fragments de feuilles sont ensuite incubés en présence de kanamycine et seules les cellules transformées proliféreront et formeront des cals.

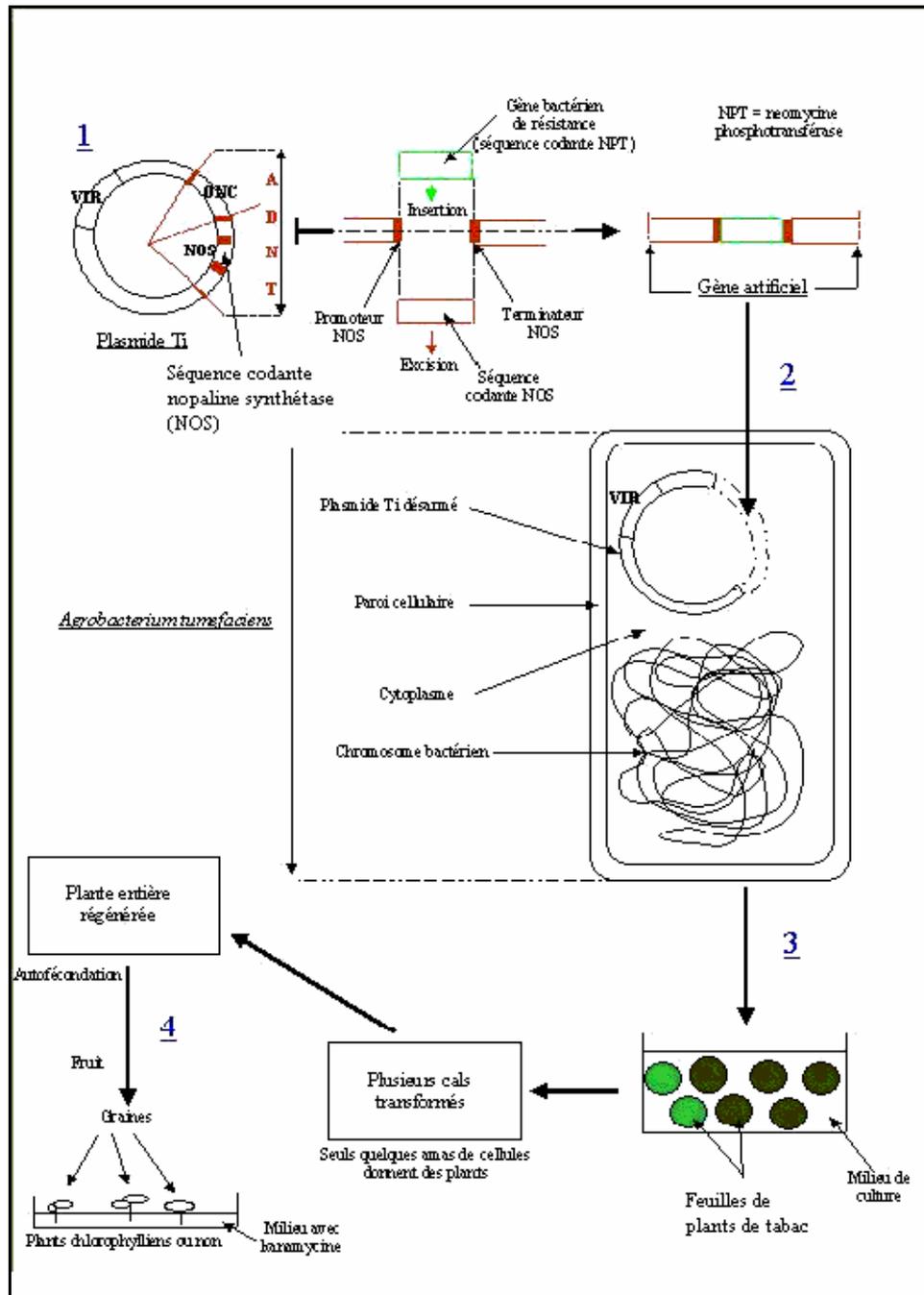
Dans une troisième étape, ces cals sont mis en cultures sur des milieux appropriés contenant des phytohormones. Certaines des cellules donneront des bourgeons, qui s'enracineront ensuite pour régénérer des plantes entières.

Pour finir, afin de vérifier que les plantes régénérées sont bien transformées, leurs graines obtenues par autofécondation sont semées sur un milieu contenant de la kanamycine. Statistiquement, 1/4 des

plantes ne possèdent pas le gène de résistance : c'est la proportion attendue pour un gène quelconque. [16] Plusieurs possibilités se présentent :

- Soit des plantes dépourvues de chloroplastes car la kanamycine interfère avec leurs développements. Ces plantes sensibles sont blanches et leur développement est alors arrêté.
- Soit des plantes chlorophylliennes normales et dans ce cas, ces dernières sont résistantes à l'antibiotique, et assure la mise en place de chloroplastes fonctionnels nécessaires à la poursuite du développement.

Ce gène introduit se conduit comme n'importe quel autre gène : il fait alors partie du patrimoine génétique de la plante qualifié alors de transgénique. Cependant pour être qualifiée de transgénique il faut que toutes les cellules de la plante possèdent le transgène sinon, il s'agit d'une plante chimère. Des analyses moléculaires au niveau de l'ADN sont aussi pratiquées pour vérifier le transfert du gène (Southern blot, Northern blot, PCR). [16]



**Figure 2 : Transfert du gène de résistance à la kanamycine dans une cellule de plant de tabac. [18]**

(1) Réalisation d'une construction génique ou gène artificiel. (2) Recombinaison puis insertion du fragment d'ADN dans le plasmide Ti désarmé (privé de la séquence ONC, fonction oncogène) puis introduction du plasmide Ti modifié dans la bactérie hôte. (3) Transfection du plasmide modifié dans des feuilles, par *Agrobacterium* (4) Contrôle de l'efficacité du transfert et sélection des organes exprimant le gène transféré.

### b) Le transfert direct de gènes :

Il existe des techniques de transfert direct d'ADN, par des méthodes chimiques, physiques ou faisant appel à des impulsions électriques. Une fois éprouvées sur des cellules animales, ces méthodes ont été testées sur des protoplastes.

### Transformation de protoplastes : [16]

- par méthode chimique, en utilisant le polyéthyléneglycol (PEG), une molécule capable d'induire la déstabilisation de la membrane plasmique et qui permet le transfert d'ADN à travers celle-ci ;
- par méthode physique, en réalisant la fusion entre des protoplastes et des liposomes (vésicules artificielles de phospholipides encapsulant l'ADN à transférer) ;
- par méthode faisant appel à des impulsions électriques, elle consiste à soumettre un mélange de protoplastes et d'ADN à une série de chocs électriques de courte durée et de tension élevée. Le champ électrique provoque la déstabilisation de la membrane plasmique par polarisation des phospholipides qui la constituent et induit alors la formation de pores à travers desquels les molécules d'ADN peuvent transiter.

### Transformation directe de cellules, de tissus, ou d'organes :

Cette méthode permet dans ces différents cas de palier aux limites de la transformation de protoplastes pour les espèces dont la régénération des plantes en culture in vitro n'est pas maîtrisée. La pénétration de l'ADN peut être forcées à travers la paroi pectocellulosique des cellules végétales, par l'intermédiaire d'un canon à particules (Voir figure 3). Le principe consiste à projeter sur le tissu à transformer de toute petites billes d'or ou de tungstène enrobées d'ADN. Ces billes projetées ont suffisamment d'énergie cinétique pour traverser la paroi et la membrane des cellules sans leur infliger de dommages irréparables. L'ADN est ainsi introduit dans des tissus comme des embryons ou des méristèmes qui vont directement générer une plante. [19]

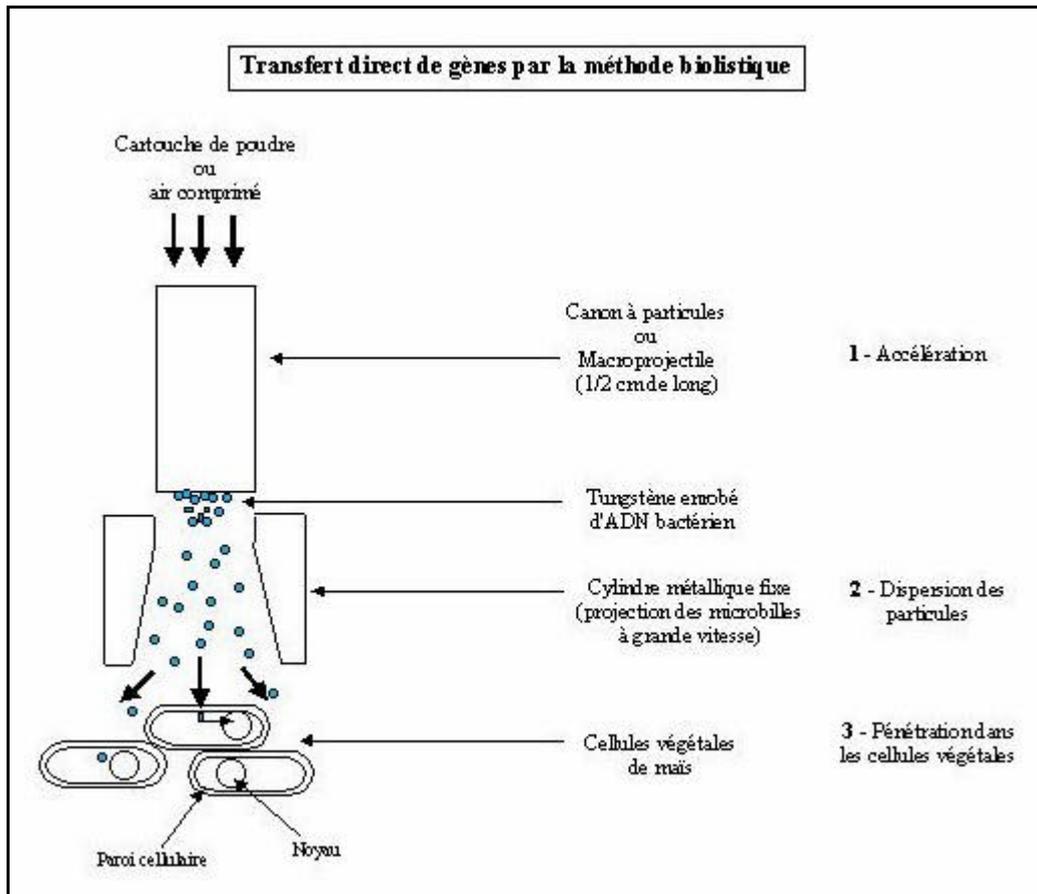


Figure 3 : L'exemple du transfert d'un gène bactérien dans du maïs par la méthode du canon à ADN[19]

#### 4. Avantages et inconvénients des différentes techniques de transfert de gènes

Le succès de la transgénèse végétale repose sur la conjonction de plusieurs conditions qui doivent être réunies simultanément :

- pénétration de l'ADN étranger jusque dans les noyaux des cellules végétales ;
- intégration dans le génome de l'hôte, c'est à dire dans un des chromosomes afin que le transgène puisse se répliquer et devenir stable au sein du génome nucléaire et ainsi être transmis aux cellules filles ;
- aptitude des transgènes à être exprimés, suite à la transcription en ARN dans le noyau et à la traduction en protéine dans le cytoplasme ;
- sélection et régénération de plantes entières à partir des cellules génétiquement modifiées. La sélection s'effectue grâce à un gène marqueur conférant la résistance à un antibiotique toxique (ou à un herbicide) pour la cellule végétale transformée.

Comme la majorité des productions de protéines recombinantes est basée sur l'intégration du transgène dans le génome nucléaire ce qui demande une étape relativement longue dans la production de plantes transgéniques, d'autres systèmes alternatifs ont été étudiés pour faciliter les étapes de production. En effet, plusieurs études ont montré que l'infiltration d'un transgène par la technique classique *Agrobacterium tumefaciens* possède une autre limite importante, celle d'une chute tendancielle du taux de protéines recombinantes au bout de quelques jours. Ceci serait en partie dû à un gène d'extinction (« silencing »). Ainsi pour le tabac, une technique alternative basée sur des vecteurs d'expression contenus sur des virus de plante connu est utilisée pour la transgénèse. L'avantage de la production basée sur les virus est d'une part l'expression rapide du transgène due à la dispersion systémique du virus qui permet la production dans chaque cellule et d'autre part l'utilisation de plusieurs vecteurs d'expression autorisant la fabrication de protéines multimériques.

[16]

Les techniques de transfert par protoplastes présentent quelques limites. En effet, les techniques appliquées aux protoplastes végétaux sont actuellement applicables uniquement chez les espèces dont la mise en culture et la régénération des plantes à partir des protoplastes sont maîtrisées. Néanmoins ces techniques de transformation par protoplastes sont intéressantes pour les plantes insensibles à *Agrobacterium*. C'est le cas des céréales monocotylédones de grande culture, telles que le riz, le maïs ou l'orge qui ont été transformées pour la première fois par ces méthodes. D'autres techniques de transfert direct sont aussi en cours d'étude comme la transformation du

pollen, la sonication de tissus, la micro injection d'ADN dans les tissus conducteurs ou encore l'imbibition d'embryons et même des systèmes de fibres carbonées où l'ADN est adsorbé. [19]

La transgénèse du chloroplaste est une autre variante prometteuse. L'avantage principal de cette technique est l'absence de gène d'extinction. De plus les gènes peuvent être exprimés en opéron et s'accumuler dans le chloroplaste limitant la toxicité pour la plante hôte. Le transgène intégré dans le génome chloroplastique n'est pas transmis par le pollen. La transformation chloroplastique a été utilisée pour la fabrication de fragment de toxine tétanique et de sérum albumine. Par ailleurs la transformation de chromoplaste chez la carotte et la tomate offre des perspectives intéressantes pour la production de sous unités de vaccin. [40]

A l'heure actuelle, la plupart des plantes de grande culture (soja, maïs, blé, riz, coton tournesol, pomme de terre, colza, tomate) sont accessibles à la transformation génétique. [19]

## ***B. Comparaison entre les différentes formes de production de molécules thérapeutiques***

Jusqu'à l'avènement du génie génétique, seules les protéines obtenues par extraction à partir des organismes vivants pouvaient être utilisées à des fins thérapeutiques. C'était le cas notamment de l'insuline extraite des pancréas de porc, des facteurs VIII et IX de coagulation extraits du sang humain, des anticorps etc. Cependant, certaines protéines sont si peu abondantes qu'elles ne peuvent pas être obtenues en quantité suffisante par extraction.[14]

### **1. Production de protéines recombinantes par les bactéries**

#### **a) Les bactéries : des usines de production**

L'utilisation de micro-organismes pour la production de protéines a été l'une des premières applications envisagées par le génie génétique. Elle permet de s'affranchir des problèmes liés à la difficulté de purifier ces protéines à partir de leurs producteurs naturels (l'homme par exemple), de s'assurer de l'absence de contaminants redoutés (virus, prions entre autres) et, pour un industriel, de maîtriser totalement la chaîne de production. [29]

Les bactéries, facilement transformables par des gènes étrangers et cultivées depuis longtemps à l'échelle industrielle, ont été les premiers organismes sollicités pour produire des protéines recombinantes. C'est ainsi que désormais la majeure partie de l'insuline utilisée pour soigner le diabète provient de bactéries recombinantes, et non plus de pancréas de porc. La totalité de l'hormone de croissance humaine utilisée pour soigner certaines formes de nanisme, et la totalité de l'hormone de croissance bovine, utilisée pour augmenter la sécrétion lactée des ruminants, proviennent également de bactéries. Ces molécules ont une excellente activité biologique et sont

plus pures que les hormones obtenues par extraction. D'autres production utilisant des bactéries lactiques (exemple les lactocoques) fournissent des médiateurs biologiques (hormones ou interleukines) associées à la prévention d'attaques virales et leur présence induit une résistance des cellules aux pathogènes. [29]

Trois laboratoires à l'INRA ont contribué à développer des outils qui permettent de contrôler le niveau de production des protéines, leur localisation, après production, ainsi que leur mode de libération (sécrétion ou éclatement des cellules). [29]

### **b) Les bactéries : des vecteurs de molécules thérapeutiques**

Il existe une grande diversité de bactéries lactiques, ce qui se traduit par une grande variété de comportements, tant au niveau technologique qu'au niveau de la survie et du développement de ces micro-organismes dans le tractus digestif après ingestion. [29]

Certaines espèces de bactéries lactiques peuvent subsister plusieurs jours dans le tractus digestif. Dans ce cas, il serait nécessaire de faire produire les substances à effet thérapeutique à l'extérieur de la cellule puisque les bactéries ne libéreront pas leur contenu. L'emploi de telles bactéries pourrait être souhaité dans le cas de traitements nécessitant une action à long terme. Cependant, il faut s'assurer de l'absence d'effet secondaire lié à la multiplication de la bactérie pendant ce long laps de temps.[22]

Dans d'autres cas, il pourrait être préférable de choisir des souches rapidement éliminées après l'ingestion. Les lactocoques correspondent à cette catégorie. Il est même possible de modifier les bactéries de manière à accélérer leur destruction par autolyse. Ces bactéries ne seraient donc que des vecteurs des molécules produites avant ingestion. Ces bactéries, pourraient, à terme, être utilisées comme vecteur de molécules thérapeutiques. Les formules sous lesquelles ces bactéries pourraient être administrées sont diverses, comme par exemple des comprimés ou des gélules contenant les bactéries lyophilisées. Le faible coût de production de tels médicaments devrait permettre de réduire certaines dépenses de santé. .[22]

Gageons que les bactéries lactiques génétiquement modifiées permettront à plus ou moins long terme de nous protéger contre certaines pathologies digestives aussi variées que les déficiences enzymatiques ou les infections bactérienne ou virale, ou même les allergies.[22]

### **c) Les limites de la production par les bactéries**

Les bactéries présentent cependant plusieurs limitations dues aux différences physiologiques fondamentales qui existent entre la machinerie cellulaire d'une bactérie et celle d'une cellule humaine : les protéines produites ne subissent pas toutes les modifications caractéristiques des

protéines humaines, ce qui peut amener à leur rejet par le système immunitaire, réduire leur durée de vie dans l'organisme voire leur activité biologique. Il est par ailleurs souvent difficile d'obtenir leur exportation de la cellule bactérienne dans le milieu de culture, ce qui complique leur purification [29].

## **2. Production de protéines recombinantes par les levures**

L'utilisation d'autres organismes producteurs non bactériens comme les levures vise à pallier le cas échéant ces limitations. Les levures occupent une place particulière car elles offrent les mêmes facilités expérimentales ou industrielles que les bactéries, en particulier culture aisée en fermenteurs à haute densité cellulaire, tout en possédant une machinerie cellulaire proche de celle d'une cellule humaine.

Le premier vaccin recombinant, contre le virus de l'hépatite B, a été produit dès 1981 par *Saccharomyces cerevisiae*, et agréé peu après pour la vaccination humaine. Ce vaccin est depuis très largement utilisé à travers le monde, et en Europe en particulier.

Malgré ce succès précoce, *S. cerevisiae* a rapidement montré elle aussi des limites. Les niveaux de production restent souvent peu élevés (de l'ordre de 100mg à 1g de protéine recombinante par litre de milieu de culture), les modifications des protéines sont souvent anormales, et surtout de nombreuses protéines ne peuvent être exportées dans le milieu extérieur.

L'exploration d'autres espèces de levures, comme *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis* ou *Yarrowia lipolytica*, qui présentent les mêmes avantages technologiques pour la production que *S. cerevisiae* et les mêmes garanties sanitaires, s'est développée considérablement au cours des dix dernières années. Ces organismes semblent plus efficaces que *S. cerevisiae*, c'est à dire qu'ils produisent plus de protéines dans le milieu extracellulaire, et ces protéines sont plus proches des protéines naturelles. *P. pastoris*, par exemple, est largement utilisée par les laboratoires pour obtenir rapidement les protéines d'intérêt à des fins de recherche, ce qui témoigne de sa simplicité d'usage et de sa fiabilité. Ces levures sont cependant aussi incapables que *S. cerevisiae* de réaliser des modifications caractéristiques de protéines humaines. Leur usage se limite donc à la production des protéines pour lesquelles ces modifications sont inutiles, et plus particulièrement à celles qui doivent être produites en larges quantités. [12]

## **3. Production de protéines recombinantes par les cellules de mammifères**

La culture de cellules de mammifères est le système standard de production de protéines recombinantes complexes telles que les anticorps monoclonaux. Ces systèmes d'expression

cellulaire permettent d'obtenir des protéines recombinantes correctement repliées et modifiées. Cependant le faible rendement par rapport au coût de production est un sérieux désavantage et ce mode de production est relativement peu efficace et peu souple. [3]

#### **4. Production de protéines recombinantes par les animaux transgéniques**

La sécrétion dans le sang des protéines étrangères a été envisagée en premier lieu. Des lapins ayant dans le sang de l'alpha-1 antitrypsine humaine à la concentration de 1mg/ml ont ainsi été obtenus il y a plusieurs années par l'INRA. Le sang ne peut qu'exceptionnellement être une source de protéines étrangères. Ces protéines n'ont en effet que peu de chance de pouvoir s'accumuler dans le sang car elles sont rapidement éliminées par le foie et le rein. Beaucoup d'entre elles peuvent par ailleurs agir directement sur l'animal et altérer sa santé. Le lait a donc été retenu en second lieu comme source presque idéale de protéines recombinantes. Un tel but peut être atteint assez aisément en transférant le gène codant pour la protéine d'intérêt sous le contrôle de la région régulatrice d'un des gènes de synthèse de protéines du lait qui va diriger celle-ci spécifiquement dans la glande mammaire puis sa sécrétion dans le lait. [14]

La glande mammaire est un organe qui produit naturellement de grandes quantités de glycoprotéines complexes (en moyenne 140g de protéines totales par litre de lait pour le lapin). Ces protéines assurent principalement un rôle nutritif pour les nouveaux nés. En plus les cellules épithéliales de la glande mammaire possèdent la machinerie cellulaire nécessaire à la synthèse, au repliement et à l'assemblage de glycoprotéines complexes. Elles peuvent notamment réaliser les modifications post-traductionnelles telles que les glycosylations ou les gamma-carboxylations. Pour de nombreuses protéines recombinantes d'origine humaine, ces modifications post traductionnelles sont indispensables pour garantir son activité biologique et des caractéristiques pharmacocinétiques appropriées. [3]

Une nouvelle branche de l'industrie pharmaceutique basée sur ce procédé est en train de naître. Plusieurs protéines sont actuellement soumises à des tests cliniques de phase I, II et III et devraient être mises sur le marché dans les années qui viennent. Sont actuellement en cours de développement l'uricase pour le traitement de l'hyper-uricémie, la lactoferrine (aux propriétés anti-bactériennes), une antitrypsine (déficiency congénitale en antitrypsine), un thrombolytique (tPA)...[14]

Les travaux réalisés à l'INRA sur les gènes de protéines du lait ont permis de mettre en oeuvre ce procédé. La région régulatrice des gènes des protéines du lait de lapin a été brevetée à cet effet. Plusieurs protéines ont ainsi été produites dans le lait de souris et de lapin.

Les animaux transgéniques représentent dès lors une excellente solution alternative pour produire des vaccins recombinants ou des protéines thérapeutiques complexes, correctement glycosylées et repliées. Ils permettent en effet de combiner à la fois les niveaux d'expression rencontrés dans les systèmes bactériens et les modifications post-traductionnelles obtenues en culture cellulaire, tout en offrant des coûts de production plus faibles que les systèmes d'expression cellulaires. Ils sont les seuls qui pourraient permettre la production d'anticorps recombinants à des coûts aussi faibles que ceux estimés pour les plantes transgéniques. [3] L'efficacité de ce système de production est largement documentée puisqu'une centaine de protéines recombinantes ont déjà été produites dans le lait d'animaux transgéniques [10]

La maîtrise des cellules souches embryonnaires de poulet acquise récemment par l'INRA laisse envisager la possibilité de préparer des protéines recombinantes dans le blanc d'oeuf.[13] D'autres procédés peuvent conduire à la synthèse de protéines recombinantes. C'est le cas notamment des cellules d'insectes infectées par un baculovirus portant le gène qui code pour la protéine d'intérêt. [3]

#### **a) L'exemple de production dans le lait de lapine :**

Le lapin est phylogéniquement plus proche des primates que ne le sont les rongeurs, ils ont des faibles coûts d'élevage. Ceci permet aux sociétés comme « BioProtein Technologies » de réduire significativement le coût de production des protéines thérapeutiques. Il n'existe pas de maladies sérieuses connues chez le lapin qui soient transmissibles à l'homme. Toutes ces propriétés font du lapin un système d'expression plus sûr que la vache, la chèvre ou la brebis. Les lapins constituent dès lors un formidable bio-réacteur permettant de produire dans des délais très compétitifs des protéines recombinantes à usage thérapeutique. [3]

La production d'une protéine dans le lait peut être obtenue en transférant chez le lapin un transgène associant le gène codant la protéine d'intérêt et un promoteur spécifique de la glande mammaire (promoteur du gène WAP Whey Acidic Protein). D'autres éléments régulateurs comme des amplificateurs et des isolateurs sont associés et participent au contrôle du taux d'expression du gène. Le transgène est par ailleurs protégé par une licence exclusive de l'INRA.[29]

Les lapins transgéniques sont obtenus par une méthode de micro-injection, où le vecteur d'expression est directement injecté dans le pro-noyau d'un ovocyte unicellulaire fertilisé. Les embryons transgéniques sont alors transplantés dans une femelle lapine receveuse et les animaux transgéniques produits montrent une expression stable du transgène d'une génération à l'autre. [3]

Cette technique permet de produire des protéines recombinantes thérapeutiques telles que des protéines plasmatiques, anticorps monoclonaux, hormones, peptides. En fonction du niveau

d'expression du gène, la concentration en protéine recombinante est comprise entre 1 et 10 g par litre de lait. [3]

Le lapin est aussi utilisé pour produire des vaccins multivalents basés sur l'utilisation de VLP (Virus-Like Particles) du Rotavirus. Les particules pseudovirales du Rotavirus (VLPs-Rotavirus) sont des complexes protéiques de haut poids moléculaire constitués de centaines de protéines de deux types : VP2 et VP6. Ces protéines, qui sont issues de la capsid virale du Rotavirus, s'assemblent spontanément pour former des particules pseudovirales ayant une structure semblable à celle du Rotavirus. Ces particules présentent la même capacité à stimuler le système immunitaire que le Rotavirus, mais permettent d'éliminer le risque infectieux lié à l'administration d'un virus entier. Les VLPs-Rotavirus constituent des vecteurs d'antigènes efficaces du fait de leur haut poids moléculaire et de la répétition des motifs antigéniques présents dans chaque particule. L'injection du lactosérum provenant de ce lait à des souris a induit la sécrétion d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines de capsid. [3] [29]

Les lapines sont traitées mécaniquement dans une salle de traite confinée. Le lait est directement filtré sur une membrane 0,22 µm, clarifié (lipides et caséines sont retirés) et stocké dans des poches plastiques stériles à -20°C en conditions BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication) avant d'être purifié. [3]

#### **b) Limites de la production par les animaux**

Toutefois, ces systèmes de production par les animaux transgéniques présentent aussi des limites bien connues puisque la production de certaines protéines recombinantes, et en particulier d'anticorps thérapeutiques, risque de perturber le métabolisme de l'animal transgénique. De plus, contrairement aux protéines recombinantes d'origine végétale qui ne peuvent être contaminées par des agents pathogènes pour l'homme, un doute persiste concernant les risques de contamination d'une molécule pharmaceutique issue d'animaux transgéniques par des pathogènes transmissibles à l'homme. [29]

### **5. Comparaison des différents systèmes d'expression**

Le tableau 1 permet de résumer les différentes approches mentionnées précédemment. En étudiant les différents critères, la production de protéines recombinantes par les plantes semble être la plus adéquate. Les plantes auraient l'avantage de ne pas contenir de pathogène transmissible à l'homme, la quantité de protéines produite est largement supérieure au organisme unicellulaire pour un coût de production plus faible.

**Tableau 1 : Comparaison des différents systèmes de production de protéines recombinantes [8]**

| Système expression          | Avantages   | Désavantages  | Applications  | Coût/g     |
|-----------------------------|---|---|---|------------|
| <b>Bactéries</b>            | Voie de régulation établie; la génétique bien comprise; bon marché et facilitée de développement  | Les protéines non habituellement sécrétées; Contiennent endotoxines; pas modifications post-traductionnelles                                    | Insuline (E. coli); hormone de croissance (Genentech); facteur de croissance ; interféron   | 200–3000€  |
| <b>Levure</b>               | Reconnu sans risque, Longue histoire d'utilisation ; rapide; peu coûteuse; post-traductionnelles modifications  | La sur glycosylation peut modifier la bioactivité et la sécurité; Peut contenir des immunogènes/antigènes                                       | fermentation; vaccins recombinants contre le virus hépatite B insuline humaine  | 50–100€    |
| <b>Cellules d'insecte</b>   | Modifications post-traductionnelles; Protéines correctement formées; niveau assez élevé d'expression  | Faible voie de régulation; croissance lente; moyen assez coûteux; Infection au bacillo-virus; virus de mammifères peuvent infecter les cellules | Novavax production de particules virales  |            |
| <b>Cellules Mammifères</b>  | Protéines correctement formées; modifications post-traductionnelles correctes; bonnes connaissances des voies de régulation; le seul choix pour les grosses protéines | Moyen coûteux; croissance lente Peut contenir des allergènes/contaminant; purification compliquée   | activateur tissu plasminogène; facteur VIII (glycoprotéine); anticorps monoclonal (Herceptin)                                     | 500-5,000€ |
| <b>Animaux Transgénique</b> | Processus utiles pour protéines complexes; Très haut niveau d'expression; coût de production faible   | Peu d'expérience dans la régulation ; contamination virales possibles; isolation dans les fermes  | Lipase (mouton, lapin ; PPL Therapeutics); hormone croissance (chèvres; Genzyme); facteur VIII (bétail)                           | 20–50€     |
| <b>Plantes Transgénique</b> | Court cycles de développement; Stockage facile; bon niveau d'expression; pas de virus connue chez les plantes qui infecteraient les humains                           | Potentiel pour de nouveaux contaminants (champignon, bactéries, pesticides); modifications post-traductionnelles; peut contenir des allergènes  | Vaccins pour le choléra (tabac; Chlorogen, Inc.); lipase gastrique (maïs; Meristem); hepatitis B (pomme de terre; Boyce Thompson) | 10–50€     |

(Elbehri, Biopharming and the Food System: Examining the Potential Benefits and Risks AgBioForum, 8(1): 18-25. 2005)

Les systèmes utilisant des plantes transgéniques permettent de produire des protéines en quantités très importantes. Cependant, cultivés en milieu « ouvert », les risques sont de plusieurs ordres. Il peut s'agir de contaminations physico-chimiques (pesticides...) ou biologiques (mycotoxines, transmission de virus animaux par les déjections) provenant de l'environnement, ou encore de virus végétaux dont, cependant, la possibilité de transmission et de pathogénicité vis-à-vis de l'homme n'a jamais été décrite jusqu'à présent. Ils peuvent également poser des problèmes d'allergies ou de néo-antigénicité en raison des différences de glycosylations des protéines végétales et des protéines animales. Enfin, le risque de dissémination dans l'environnement d'une plante transgénique codant pour une protéine-médicament ne semble pas majeur, même s'il ne doit pas être écarté. [10]

A l'instar des autres médicaments, tous les principes actifs obtenus par ces diverses modalités doivent faire l'objet d'une évaluation détaillée avant d'être autorisés pour être utilisés en thérapeutique humaine. Les critères utilisés dans cette évaluation sont ceux préconisés pour octroyer une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) portant sur la pureté et la qualité du produit, la sécurité et l'efficacité cliniques, le rapport bénéfices / risques. [13]

Il est vraisemblable qu'au siècle prochain, tous ces systèmes de production seront mis en oeuvre. L'utilisation d'un procédé plutôt qu'un autre sera déterminée par son efficacité au cas par cas. Des

protéines pour la médecine humaine et vétérinaire, ainsi que pour le diagnostic, seront ainsi mis à la disposition des hôpitaux, des laboratoires d'analyse et des élevages. [14]

### ***C. L'émergence de plates-formes de production pour les biopharmaceutiques***

Pour comprendre l'émergence de ces nouvelles plates formes de production, il convient de mettre en relief la potentialité des espèces végétales. Cette capacité de production sera illustré à travers trois exemples concrets : la production d'anticorps, de lipase gastrique et de terpène aux propriétés médicinales.

#### **1. Potentialité des espèces végétales**

L'espèce hôte a été le facteur limitant lors de l'émergence de ces nouvelles plates-formes de production. Les premières protéines recombinantes furent produites à partir de plante de tabac transgénique où les molécules ont été extraites directement à partir des feuilles. Le tabac est une plante où le système d'expression est bien caractérisé. Ceci permet d'effectuer une mise au point optimale pour obtenir un rendement de production important. De plus le tabac est une plante inscrite dans aucun processus alimentaire humain ou animal ce qui exclu une quelconque contamination. Le désavantage principale du tabac est la présence élevé de nicotine ou autres toxiques alcaloïdes qui nécessite une étape supplémentaire d'extraction. Les autres plantes feuillues peuvent offrir de bonnes alternatives comme la laitue ou la luzerne. [9][4]

Les avantages de la luzerne sont d'une part un rendement important et d'autre part la fixation de ses composées nitrogènes ainsi qu'une structure des glycanes homogènes. Cependant la luzerne, utilisé pour alimenter le bétail, est une source importante d'acide oxalique qui peut interféré sur le processus de production des plantes transgéniques. [11]

Bien que les feuillus ont un avantage certain dans le rendement, les protéines ainsi produites tendent à être instables contrairement aux céréales comme le maïs où les protéines produites sont protégées des dégradations protéolytiques. Le maïs est choisi en particulier pour son rendement important mais surtout pour sa transformation et sa manipulation facilitées in vitro. Le maïs est utilisé pour la production d'enzymes utiles pour les techniques de biologie moléculaire comme la  $\beta$ -glucuronidase, de sous unités de vaccins et d'anticorps.[34][9]

Ces avancés technologiques dans l'émergence de nouvelles plateformes de productions de biopharmaceutiques peuvent constitué un réel avantages lors de large campagne de vaccination. Ainsi la pomme de terre a été le premier système utilisé pour la production de vaccins testés dans plusieurs études cliniques. La pomme de terre a été étudiée pour la production de TNF-alfa, de

sérum albumine et d'anticorps. D'autres hôtes sont étudiés pour la production de vaccins comme les tomates, les bananes, les carottes, et *Arabidopsis*. [10]

La production de protéines recombinantes peut être facilitée par l'intermédiaire de plantes transgéniques oléagineuses où les systèmes d'extraction et de purification sont plus efficaces. A terme, ceci permettrait l'élaboration d'un bio réacteur en production continu de molécules thérapeutiques.[28]

De nombreuses plantes transgéniques produisant des molécules pharmaceutiques sont en développement ou sur le point d'être commercialisées. Le tableau 2 montre des exemples de molécules d'intérêt thérapeutique produites à partir de plantes transgéniques.

**Tableau 2 : Exemples de molécules d'intérêt thérapeutiques produites à partir de plantes transgéniques[9]**

| Catégorie                                       | Protéine  | Application et spécificité                               | Plante  |
|---|---|--|---|
| Protéines sanguines et plasmatiques             | Albumine  | Contrôle du volume sanguin, excipient                    | pomme de terre, tabac   |
|   | Aprotinine  | Anti-fibrinolytique                                      | maïs  |
|   | Collagène I homotrimérique  | Agent homéostatique, scellant tissulaire                 | tabac   |
|   | Enképhalines  | Analgésique  | tabac   |
| Vaccins   | Hémoglobine   | Substitut sanguin  | tabac   |
|   | Bet v 1   | Traitement des allergies de type                         | tabac   |
|   | Sous-unité de toxine B du choléra                                     | Traitement du choléra                                    | pomme de terre  |
|   | Glycoprotéine B du CMV  | Traitement d'une infection par le cytomégalovirus        | tabac   |
|   | Sous-unité de toxine B du choléra fusionnée avec insuline             | Traitement du diabète auto-immun                         | pomme de terre  |
|   | Peptide D2 de la protéine B liant la fibronectine de <i>S. aureus</i> | Vaccin mucosal ne requérant pas d'adjuvant               | haricot noir  |
|   | VP1   | Traitement de la fièvre aphteuse                         | luzerne, haricot noir   |
|   | Hémagglutinine  | Traitement de la grippe                                  | tabac   |
|   | Antigène de l'hépatite  | Traitement de l'hépatite B                               | Tabac, pomme de terre   |
|   | Entérotoxine B de <i>E. coli</i>                                      | Traitement des diarrhées                                 | pomme de terre, tabac   |
|   | Épitope de <i>P. falciparum</i>                                       | Traitement du paludisme                                  | tabac   |
|   | 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  |
|   | Auto-antigène   | Traitement du diabète auto-immun                         | pomme de terre  |
|   | Anticorps   | IgG C5-1   | Anti-IgG diagnostique   |
| IgA contre <i>S. mutans</i>                     |   | Prévention de carie dentaire                             | tabac   |
| IgG contre la créatine kinase                   |   | Anticorps diagnostique                                   | tabac   |
| IgG contre l'antigène tumoral CO17-1A           |   | Traitement du cancer du côlon                            | tabac   |
| ScFv contre antigène carcino-embryonnaire (CEA) |   | Traitement des cancers                                   | céréales  |
| Hormones, cytokines et facteurs de croissance   |   | GM-CSF   | Facteur de croissance hématopoïétique utilisé dans le traitement de neutropénie |
|   | Interféron ?  | Traitement d'hépatites B et C                            | tabac   |
|   | Interféron ?  | Traitement d'hépatites B et C                            | tabac   |
|   | Somatotropine (hGH)   | Traitement des désordres de croissance                   | tabac (chloroplastes)   |
|   | Érythropoïétine   | Traitement de l'anémie                                   | tabac (cellules)  |
| Enzymes   | Epidermal growth factor (EGF)   | Contrôle de prolifération cellulaire                     | tabac   |
|   | Enzyme de conversion de l'angiotensine                                | Hypertension   | tabac et tomate   |
|   | Protéine c (protéase sérique)   | Anti-coagulant   | tabac   |
|   | Glucocérébrosidase  | Maladie de Gaucher                                       | tabac   |
| Autres  | ? -trichosantine  | Inhibe la réplication du VIH                             | tabac   |
|   | Hirudine  | Anti-coagulant   | tabac, colza  |
|   | Lactoferrine humaine  | Anti-microbien   | tabac   |

Faye L., Landry N., La production de protéines à usage biopharmaceutique dans les plantes, médecine/sciences (2001) ; 17 : 867-77

## 2. Production d'anticorps dans les plantes transgéniques

### a) Exemples d'anticorps produits

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.[4]

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. [4][34]

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. La production de différents types d'anticorps recombinants tels que des IgG ou des IgA sécrétoires font partis des succès majeurs dans ce domaine.

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.[34]

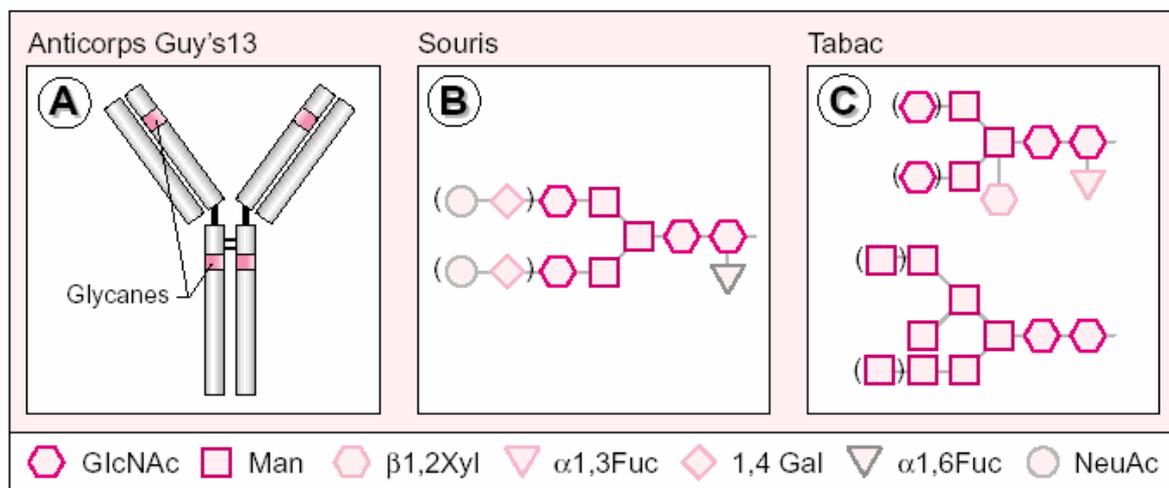
### b) Problème dû à la glycosylation

La N-glycosylation des protéines est très spécifique selon le système d'expression. La structure du complexe N-glycan-protéine diffère selon si l'organisme est une plante, un insecte, un micro-organisme ou un mammifère. Ceci est un problème important en particulier pour la production d'immunoglobuline. En effet, les propriétés des immunoglobulines dépendent de leur glycosylation. En 1997, il a été montré que des IgG non glycosylées perdaient leur capacité à se fixer sur les récepteurs des monocytes. Le processus de liaison des structures N-glycanes s'effectue au cours de la voie de sécrétion lorsque la glycoprotéine transite du réticulum endoplasmique à travers l'appareil de Golgi jusqu'à sa destination finale. Il a donc été important d'étudier comment le processus de glycosylation et les structures de glycane sur les protéines de cellules de mammifères produites dans des plantes transgéniques différaient de leurs homologues originels.[9][34]

Ces différences ont pu être mis en évidence par la comparaison de la N- glycosylation d'anticorps murins et de leur homologue chez la plante de tabac. Par exemple, l'anticorps monoclonal Guy's 13 qui est spécifique d'une adhésine de *Streptococcus mutans*, une bactérie responsable de la carie

dentaire (voir figure 4). Quand elle est produite dans des hybridomes murins, cette IgG1 est glycosylée sur deux sites de N-glycosylation par des structures oligosaccharidiques (N-glycanes) qui présentent un résidu (1,6)-fucose et environ 10% d'acide sialique terminal. Lorsqu'il est produit sous forme recombinante dans des plantes de tabac, l'anticorps Guy's 13 est également glycosylé sur les mêmes sites de N-glycosylation. [34][4][9]

En revanche, les N-glycanes de cet anticorps sont de type oligo-mannosidique, des structures communes aux plantes et aux mammifères, mais aussi de type complexe et, dans ce dernier cas, leur structure est typique des végétaux. Ainsi, les N-glycannes complexes associés à l'anticorps Guy's 13 produit dans le tabac présentent des caractéristiques structurales, telles que la présence de (1-2)-xylose et (1,3)-fucose, qui leur confèrent une forte immunogénicité chez certains mammifères, et en particulier chez l'homme.[9]



**Figure 4 : Glycosylation de l'anticorps Guy's 13. [9]**

*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. [Faye et al. La production de protéines à usage biopharmaceutique dans les plantes. médecine/sciences 2001 ; 17 : 867-77]*

### 3. La production de lipase gastrique dans le tabac

#### a) Intérêt de produire de la lipase gastrique

Les lipides, principalement les triglycérides à chaînes longues, constituent le principal apport calorique de l'alimentation humaine. La digestion de ces lipides dans le tube digestif (ou lipolyse) est assurée par deux enzymes naturellement produites au moment du repas, la lipase gastrique et la lipase pancréatique. Ces enzymes sont indispensables à la libération des acides gras et à leur assimilation au niveau de l'intestin grêle. Certaines affections de l'estomac et du pancréas peuvent être responsables d'une réduction, voire d'une absence, de sécrétion de ces enzymes digestives et être à l'origine de troubles nutritionnels sévères. C'est le cas notamment chez les personnes

atteintes de mucoviscidose et de pancréatite chronique. L'apport d'enzymes exogènes sous forme d'extraits pancréatiques d'origine animale représente actuellement le seul traitement possible de ces maladies.[24][25]

La mucoviscidose est la maladie génétique la plus fréquente dans les pays occidentaux avec une fréquence à la naissance de 1/2500. Le nombre de personnes atteintes de cette maladie dans le monde est estimé à près de 70 000. Ces troubles ont pour origine la sécrétion d'un mucus trop épais, qui bouche progressivement les canaux présents dans les organes (bronches, canaux biliaires, canaux pancréatiques ...). Le mode de production de la lipase gastrique par les plantes pourrait être une alternative totale ou partielle aux extraits pancréatiques de porc actuellement utilisés et inefficaces chez environ 15% des patients atteints de mucoviscidose. « Meristem therapeutics » a souhaité développer en 2005 cette lipase gastrique pour le traitement de la malabsorption des graisses chez les patients atteints de mucoviscidose.[24][25]

#### **b) Problème liés a la stabilité de la protéine recombinante**

En 2003, « Meristem therapeutics » a mis en évidence l'impact de différents ciblage sur l'expression du transgène sur la structure et l'activité d'une lipase recombinante produite chez le tabac. La qualité d'une protéine recombinante est largement influencée par l'élaboration de la chaîne primaire polypeptidique. Chez les plantes, il est possible de cibler spécifiquement les protéines dans l'espace extracellulaire (apoplasme) ou dans les organelles subcellulaire comme la vacuole, le réticulum endoplasmique ou le chloroplaste. [26]

Le choix du ciblage subcellulaire est très important pour élaborer la stratégie de l'expression d'une protéine donnée. Ce choix est influencé par des paramètres technique et économique. Meristem therapeutics a montré que le ciblage du gène codant pour la lipase gastrique dans deux compartiments subcellulaires différents a une influence non seulement sur la structure de la protéine mais également sur son activité catalytique. En particulier lorsque le ciblage s'effectue dans le réticulum endoplasmique, des complexes et des structures tronquées ont été trouvées suggérant une fuite vers d'autres compartiments de la cellule. Ceci est dû en partie par la présence d'exoglycosidase dans l'apoplasme.

Pour la production stable d'une lipase recombinante dans un plant de tabac, Meristem therapeutics a choisi d'étudier chaque compartiment de la cellule et la glycosylation site par site par l'intermédiaire de spectrométrie de masse « maldi-tof ».[26][35]

### c) Mérispase dans le maïs

MERISTEM Therapeutics a développé la Merispase®, une lipase gastrique recombinante produite dans du maïs transgénique, pour le traitement de la mauvaise absorption des lipides lié à l'insuffisance pancréatique exocrine. Cette lipase gastrique a été sélectionnée en raison de sa résistance naturelle à la digestion par les acides de l'estomac et parce qu'elle garde une activité enzymatique élevée après le transit stomacal, ce qui améliore son efficacité dans l'absorption des lipides. La Merispase® permettra à une proportion significative de malades qui ne réagissent pas aux extraits pancréatiques d'être soigné efficacement. De plus avec la Merispase®, il n'y a plus de risque de contamination virale. Enfin, la posologie sera moins contraignante (moins de cachets par jour) ce qui facilitera un meilleur traitement.[24]

La lipase gastrique a reçu le statut de médicament orphelin en juillet 2003 délivré par l'agence européenne du médicament. MERISTEM a déjà produit plusieurs kilogrammes de lipase gastrique de qualité pharmaceutique. Les phases I (étude tolérance) et deux phases IIa (seul ou en complément) se sont achevées en juillet 2004. En avril 2005 le ministère de l'agriculture et de l'alimentation a délivré à MERISTEM Therapeutics les autorisations pour cultiver 20 ha de maïs Merispase® dans le puy de Dôme. La Merispase® est actuellement en phase d'optimisation de la formulation : Plusieurs formulations de la lipase gastrique sont testées in vitro, en utilisant un modèle de tube digestif artificiel dans le but d'améliorer la pharmacocinétique et l'activité de la Merispase®.[24][25][37][31]

Il faut préciser que la production d'une molécule thérapeutique dans une plante modifiée génétiquement est une première en France. De plus l'opinion publique ne semble pas encore prête à accepter la culture en plein champ d'OGM. Deux parcelles de maïs génétiquement modifié ont été détruites.

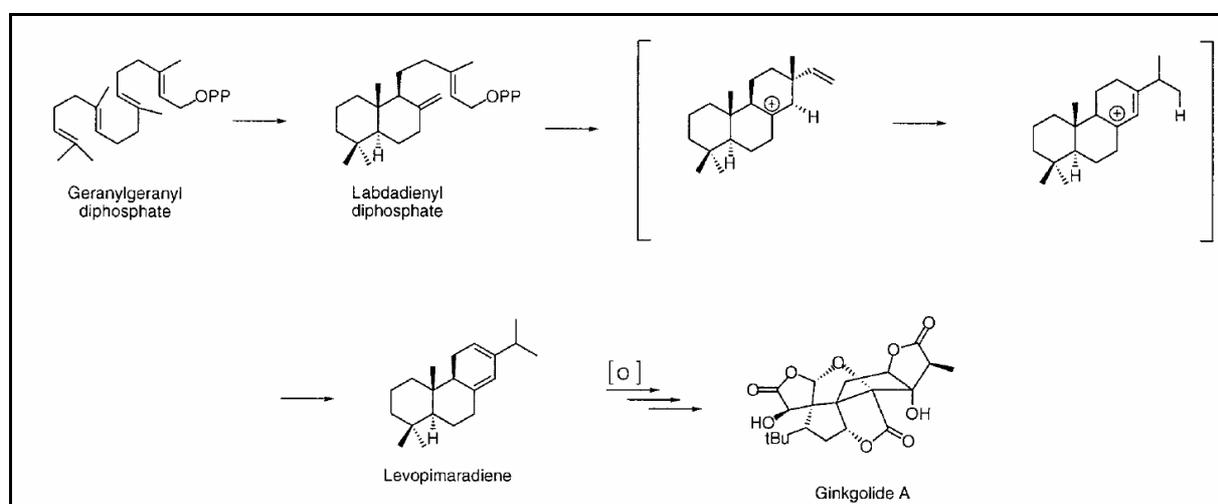
## 4. Le riz pour exprimer les terpènes du ginkgo

*Ginkgo biloba* est un gymnosperme de la classe des conopsides et de la famille de Ginkgoaceae originaire de l'est de la Chine et datant approximativement de 150 millions d'année. Cette espèce est la seule représentante de son ordre. Présentée sous le nom de « fossile vivant », elle est connue pour sa capacité à survivre dans des conditions climatiques difficiles et de résister aux infections d'insectes.

*G. biloba* est utilisé comme une plante thérapeutique ayant un impact sur les tissus ischémiques (tissus cérébrales) en impliquant des processus de vascularisation. Les extraits de feuilles de *G. biloba* ont été utilisés depuis plusieurs siècles pour traiter les maladies cérébro-vasculaires et cardio-vasculaires. Ces effets bénéfiques pharmacologiques ont été attribué en partie à une série

spécifique et unique de diterpènes : les ginkgolides. Ces molécules sont des antagonistes spécifiques des récepteurs des facteurs activant les plaquettes (PAF). La production des PAF a lieu lors de choc anaphylactique conduisant une bronchio-constriction, à la contraction des muscles lisses et à une réduction de la tension sanguines. Ces symptômes peuvent être fatales. Le ginkolides B est l'isomère le plus connu et peut être une alternative thérapeutique pour traiter la maladie d'Azheimer.

Actuellement le développement commercial des ginkgolides comme agents thérapeutiques a été arrêté du fait de la topologie et des complexités stéréochimiques de la synthèse des diterpenes. La production actuelle de ginkgolides provient exclusivement de l'extraction des arbres de ginkgo qui accumule très peu de ce composant.



**Figure 5 : voie de synthèse du ginkgolide A à partir du géranylgeranyl diphosphate[23]**

*Le GGDP subit la cyclisation protonique au diphosphate de labdadienyl. L'élimination de diphosphate lance la cyclisation et des réarrangements cationiques qui produisent le levopimaradiène. D'autres processus oxydatifs [O] conduisent à la formation du ginkgolide A*

Matsuda et al, de l'université du riz de Houston, ont avec succès cloné et caractérisé l'enzyme, le levopimaradiène synthase, qui catalyse la première étape de la biosynthèse de ginkgolide. La levopimaradiène synthase est une enzyme qui catalyse la synthèse de levopimaradiène à partir du Géranyl Géranyl Diphosphate (GGDP) par l'intermédiaire d'une ionisation et d'une protonation (Voir figure 5). Ce gène est essentiel aux approches de génétique pour surproduire des ginkgolides. Spécifiquement, le levopimaradiène synthase est nécessaire pour produire le levopimaradiène, le précurseur de ginkgolide. Les méthodes de production potentielles de levopimaradiène décrites sont valables que si l'organisme génétiquement modifié possède naturellement le GGDP. La surexpression de la levopimaradiène synthase permettra d'obtenir à des niveaux plus élevés des précurseurs de ginkgolide.

Le riz apparaît comme un bon candidat pour la transformation car il synthétise naturellement le GGDP. Par ailleurs, ce précurseur a déjà été utilisé avec succès pour le développement du riz doré enrichi en  $\beta$ -carotène.

Les organismes vivants sont utilisés comme des usines de production pour les laboratoires biotechnologiques qui permettent de valoriser une ressource génétique particulière. Cependant, il est nécessaire de s'interroger à propos de l'appropriation de cette ressource notamment lorsqu'il s'agit d'un gène spécifique à une plante locale comme dans l'exemple du *Gingko biloba*. C'est d'ailleurs cet aspect « locale » qui pose la question des détenteurs vis à vis de cette molécule thérapeutique entre les population autochtones et les entreprises pharmaceutiques.

## **II. La production des molécules à effets thérapeutiques : la question des détenteurs**

Afin de développer la question des détenteurs des ressources génétiques, il faut d'abord s'intéresser aux différents modes d'appropriation du vivant à travers les certificats d'obtention végétale et le brevet. Cependant, ces modes d'appropriation ne sont pas forcément adaptés à la situation de certaines populations autochtones. Par conséquent, il conviendra par la suite d'étudier l'évolution de ce mode d'appropriation qui est passé du patrimoine commun de l'humanité à la souveraineté nationale développé dans la CBD. Enfin, il serait nécessaire de s'intéresser au problème de la bioprospection à but pharmaceutique car il se situe en amont de l'appropriation des ressources génétiques.

### ***A. L'appropriation des ressources génétiques***

#### **1. Droit de propriété intellectuelle**

##### **a) Certificat d'obtention végétale et brevet**

La première loi de protection des obtentions végétales a été adoptée aux Etats-Unis du XX<sup>ème</sup> siècle. L'accélération des échanges mondiaux a conduit à l'adoption d'une réglementation internationale dans le cadre de la convention de Union pour la Protection des Obtentions Végétales (UPOV) en 1961. L'UPOV compte aujourd'hui 49 Etats membre, essentiellement des pays développés et des pays en développement tournés vers l'exportation. La convention de l'UPOV a instauré les Certificats d'Obtentions Végétales (COV) qui permet la protection des variétés. L'une des caractéristiques des COV c'est l'exemption de la recherche, qui permet l'utilisation libre d'une variété à des fins de recherche par des sélectionneurs même concurrents pour l'obtention d'une nouvelle variété. Ce certificat permet le libre accès génétique tout en protégeant les innovations.[5] Parallèlement au système des COV, s'est développée, aux Etat-Unis la protection des obtentions végétales par le brevet. Le brevet ne pouvait être accordé que si la demande répondait à des critères stricts : nouveauté, inventivité, application industrielle. Il confère au détenteur un droit exclusif d'exploitation pour un temps déterminé (maximum de vingt ans) il interdit tout usage du procédé ou du produit par une tierce personne ; le titulaire du droit peut autoriser un tiers à l'utiliser contre le paiement de redevance. Le brevet a un double objectif. Il incite à l'innovation puisqu'il donne au détenteur du brevet un pouvoir de monopole, mais ce pouvoir est limité dans le temps pour l'inciter à investir dans la recherche & développement. Il assure une diffusion de l'innovation puisque le descriptif de l'innovation est publique.[6] La question de la propriété des données brutes et des faits est désormais un nouvel enjeu fondamental du débat sur l'évolution de la propriété intellectuelle.

## **b) Position de la recherche publique et notamment de l'INRA vis-à-vis du brevet**

L'émergence des biotechnologies qui ont fait du brevet le mode de valorisation de leurs activités, a obligé l'I.N.R.A. à faire évoluer sa pratique de valorisation de ses recherches et à adopter une politique de propriété industrielle.

Il est toujours difficile pour un organisme public de recherche d'adopter des méthodes utilisées par des entreprises privées car il existe la possibilité de dérives qui risquent de lui faire perdre tout caractère public et de lui ôter toute légitimité à bénéficier de financements collectifs.

Cependant mettre les résultats de la recherche dans le domaine public revient à les mettre gratuitement à la disposition de tous, et donc aussi à celle des entreprises multinationales concurrentes. Cela reviendrait à leur permettre de développer des innovations qui ne manqueraient pas d'être protégées par brevets. Il y aurait ainsi une captation illégitime des travaux de l'I.N.R.A. [5]

Conscient de ces difficultés, l'I.N.R.A. a conduit une réflexion sur la portée des brevets dans son action. Cette démarche l'a conduit à solliciter son Comité d'éthique et de précaution (COMEPR). Celui-ci a adopté un avis sur ce thème le 31 janvier 2002. [15]

Le Conseil scientifique de l'I.N.R.A. s'est ensuite prononcé le 9 octobre 2002 sur ce thème et son Conseil d'administration a finalement adopté une Charte de la propriété intellectuelle le 19 juin 2003. Les principaux points de cette charte sont les suivants [15]:

- De façon générale, soutien du système du certificat d'obtention végétale (C.O.V.) pour la protection des variétés végétales,
- le brevet doit être considéré comme un compromis permettant à la fois la diffusion et la protection des connaissances,
- pas de dépôt de brevet couvrant des séquences génétiques sauf quand leur fonction biologique aura été démontrée expérimentalement ; dans ce cas les revendications seront limitées aux applications concrètes et identifiées correspondant aux missions de l'institut,
- pas de « brevets de produits » car ils sont considérés comme des monopoles abusifs,
- en cas de copropriété de résultats avec un organisme public, définition de cette propriété selon des conventions cadres,

- en cas de copropriété de résultats avec des partenaires privés : principe de la revendication systématique de la pleine propriété des résultats obtenus, les partenaires pouvant bénéficier d'un droit de première information ou d'option de licence,
- copropriété des résultats pouvant être acceptée si la participation du partenaire le justifie,
- dévolution entière de la propriété des résultats obtenus qu'à titre tout à fait exceptionnel et seulement possible pour des applications sans caractère générique ou stratégique pour l'Institut,
- la concession de licences non exclusives est privilégiée,
- caractère exceptionnel des licences exclusives dont la durée est limitée, les domaines d'application et géographique bien définis.

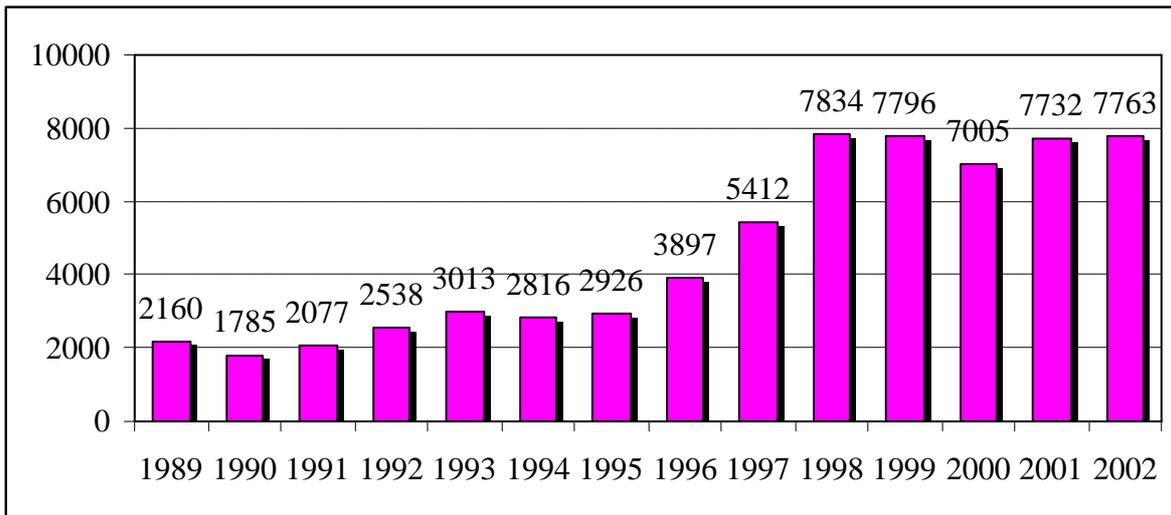
Cette charte semble juste car elle prône avec intérêt l'utilisation de licences non exclusives tout en gardant la propriété des résultats obtenus en partenariat avec la recherche privée. Toute la question est de réussir une synergie avec les partenaires privées. C'est ainsi qu'en 1999, le Génoplante fut créé regroupant des acteurs de la recherche publique (I.N.R.A., C.N.R.S., C.I.R.A.D., I.R.D.) et privée (Biogemma, Bioplante et Bayer CropScience). [5]

## **2. Croissance des brevets dans le domaine du vivant**

Depuis le début des années 70, les sciences écologiques ne sont plus les seules à s'intéresser à la diversité biologique. Le premier brevet pour un micro-organisme génétiquement modifié est accordé en 1980 (Chakrabarty, Etats-Unis). Les brevets s'étendent ensuite aux plantes et aux animaux transgéniques. Les premières applications commerciales suivent, le nombre d'entreprises en biotechnologie s'accroît et plusieurs d'entre elles entre en bourse. Ce boum des biotechnologies stimule la recherche appliquée dans les secteurs de la pharmacie, de l'agriculture et de l'industrie.

Conçus à l'origine pour les inventions industrielles sur des matières inanimées, les droits de propriété intellectuelle (DPI) sont progressivement étendus au matériel génétique animal et végétal. Facilités par de nouvelles législations nationales, les dépôts de brevets sur les biotechnologies se multiplient cette multiplication de droits pose des problèmes de commerce international. Les niveaux de protection variant entre les pays, des comportements protectionnistes se développent.

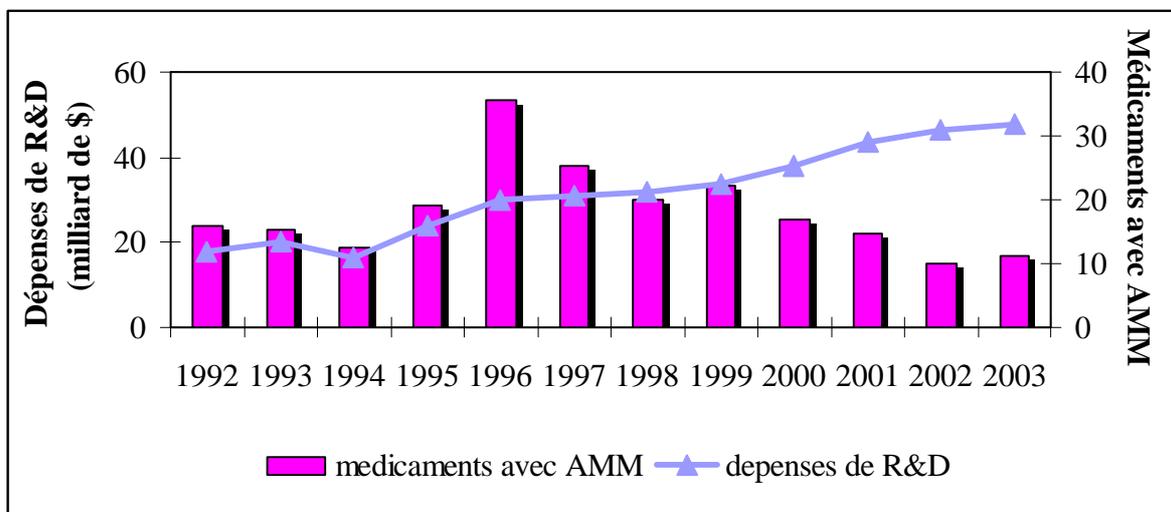
Cette croissance a été marquée à la fois dans les demandes et dans les délivrances de brevets. La figure 6 donne l'évolution des brevets accordés par année par l'U.S.P.T.O. en biotechnologie de 1989 à 2002.



**Figure 6 : Nombre de brevets accordés par an** Source : USPTO

Le nombre de ces brevets est passé de 2 160 en 1989 à 7 763 en 2000, ce qui représente une augmentation considérable. Le nombre de brevets accordés a commencé à croître de façon importante en 1996 pour s'établir à plus de 7 000 par an à partir de 1998. Cette augmentation du nombre des brevets est due à l'émergence des petites entreprises de biotechnologie.[6]

Les petites entreprises de biotechnologie sont nées d'un changement de la politique des brevets aux Etats-Unis au début des années 1980, du développement de la génétique médicale et des difficultés éprouvées dans leur stratégie de recherche par les grandes entreprises pharmaceutiques. Depuis le début des années 1980, les grandes entreprises pharmaceutiques ont progressivement éprouvé des difficultés croissantes caractérisées par un vieillissement de leurs portefeuilles de produits, une augmentation des coûts de développement et de la durée de recherche et une diminution des mises sur le marché des médicaments innovants. Cette hausse des coûts de recherche et cette diminution des mises sur le marché de nouveaux médicaments se constatent sur la figure suivante :



**Figure 7 : la R&D américaine en panne de nouveaux médicaments** Source :PhRMA et FDA

### **3. L'appropriation du vivant permise par l'affaiblissement des critères classiques de la brevetabilité**

On rappellera que, classiquement, les critères de fond de brevetabilité sont au nombre de trois : la nouveauté, l'inventivité et l'application industrielle. [5][6][27]

#### **a) La nouveauté :**

Une invention est considérée comme nouvelle si elle n'a pas été divulguée, avant la date de dépôt de la demande de brevet, par une description écrite ou orale, un usage ou tout autre moyen.

Selon l'acception courante une invention concerne un objet nouveau, c'est à dire qui n'existait pas antérieurement à l'état naturel et dont la création est donc artificielle.

La question qui se pose dans le domaine du vivant est de savoir si un gène, ou une protéine, présent dans la nature est ou pas à la disposition du public. Les gènes ne sont naturellement pas directement accessibles et il est évident qu'un travail est nécessaire pour les isoler. Mais est-ce suffisant pour considérer que cela permette de conclure à la nouveauté ? Les gènes préexistant évidemment à toutes les caractérisations permettent fortement d'en douter.

La « solution » des juristes et des offices de brevet a été de rattacher la génomique au génie chimique en établissant une équivalence entre les molécules d'ADN et les molécules chimiques. Cette conception est présente depuis longtemps dans les directives d'examen de l'Office européen des brevets. Une matière biologique isolée de son environnement naturel ou produite à l'aide d'un procédé technique peut-être l'objet d'une invention, même lorsqu'elle préexistait à l'état naturel.[39]

#### **b) L'inventivité :**

Une invention est réputée inventive, ne découlant pas, pour un homme de métier, de manière évidente de l'état de la technique ; L'inventivité renvoie à la capacité d'inventer, d'innover. Elle s'oppose à la découverte.

Deux distorsions du sens du mot « invention » sont apparues dans le domaine du vivant : l'une concerne la distinction entre invention et découverte et l'autre la réalité du travail effectué sous ce vocable. La notion d'invention a donc été étendue à tout travail d'isolement des choses naturelles qui sont décrites, manipulées, isolées et reproduites.[39]

### **c) L'application industrielle :**

L'invention est considérée comme susceptible d'application industrielle quand l'objet peut être fabriqué ou utilisé dans tout genre d'industrie. Il y a un grand débat pour savoir si les séquences génétiques, sous leurs formes variées, peuvent satisfaire le critère d'application industrielle ou d'utilité. Le développement des techniques automatiques a permis de connaître des quantités de séquences d'A.D.N. sans que l'on sache quelles étaient leurs fonctions. Des brevets n'en ont pas moins été délivrés sur des gènes ou des parties de gènes sans que la moindre information ait été fournie sur leur application ou leur utilité réelles.

On peut donc estimer que le critère d'application industrielle (ou d'utilité) en matière de vivant ne semble plus avoir beaucoup d'importance par rapport au critère de la « fonction », au moins tel qu'il est entendu par les offices de brevet.

L'appréciation des trois critères de fond, ainsi que des revendications, a fait l'objet d'une évolution telle qu'elle a rendu possible l'appropriation du vivant.

Le propriétaire d'un gène peut acquérir le contrôle de toutes ses fonctions et de toutes les applications que permettront ces fonctions même si celles-ci restent pour l'essentiel inconnues au moment où le brevet est accordé. La conséquence est qu'une nouvelle fonction découverte, après la délivrance du brevet, sera considérée comme complètement dépendante du brevet initial.[39]

## **4. Les revers du brevet pour la recherche**

Le brevet conçu comme une incitation à la recherche peut devenir dans le domaine du vivant, un obstacle à celle-ci. Cela impose de réaffirmer l'exemption de la recherche et nécessite d'explorer les voies qui permettraient d'éviter le blocage.

Le brevet sur le vivant induit des obstacles à la recherche dans le domaine du vivant. Les principaux sont liés à l'accumulation de brevets, à l'existence de redevances en cascades, aux brevets larges, à la fragmentation des droits de propriété, et aux revendications sur les inventions en aval.

### **a) L'accumulation de brevets**

L'accumulation de brevets caractérise une situation où de multiples acteurs détiennent de multiples brevets. La recherche et le développement peuvent ainsi être pénalisés compte tenu de la difficulté et du coût d'obtention des droits nécessaires. L'exemple du « riz doré » en est une bonne illustration. C'est un riz modifié génétiquement par ajout de trois gènes pour augmenter la synthèse du bio-carotène et augmenter sa teneur en vitamine A. Il était destiné aux populations de pays en développement dont cette graminée constitue l'alimentation de base. Outre l'emploi des trois gènes qui appartenaient à des propriétaires différents, la réalisation de cette plante a nécessité

l'utilisation d'un certain nombre de vecteurs de transformation, promoteurs, marqueurs de résistance à des antibiotiques qui faisaient tous l'objet de brevets. Il a été ainsi relevé que la fabrication de cette plante faisait intervenir plus de 70 brevets appartenant à une douzaine de propriétaires.

#### **b) Les redevances en cascade**

Comme citée auparavant, la brevetabilité s'est étendue, au delà des gènes, à toutes les techniques : lignées cellulaires, sondes d'ADN, modèles animaux, méthodes d'analyses biologiques, vecteurs divers qui seront employés en thérapie génique... Au-delà de ces brevets portant sur des outils de recherche « amont », il existe d'autres types de brevets portant par exemple sur des composés identifiés par une méthode de dépistage ou pouvant se lier à un enzyme ou récepteur déterminé.

Une recherche avancée en biotechnologie implique en général l'emploi de toutes ces techniques. Quand celles-ci sont brevetées, ce qui est devenu la règle pour le plus grand nombre des cas, il faut acquérir une licence d'utilisation auprès de chaque détenteur. Les licences imposent une redevance annuelle fixe ou calculée selon le degré d'utilisation, par exemple le nombre de fois où la technique en question est employée. Les prix demandés peuvent alors être très dissuasifs.

#### **c) Les brevets larges**

Ce type de brevet réserve ainsi à son titulaire des domaines d'exclusivité extrêmement importants qui contraignent d'éventuels compétiteurs à solliciter des licences de dépendance dont l'obtention n'est jamais automatique ou qui peut se faire à des conditions financières.

#### **d) La fragmentation des droits de propriété**

Cette situation est caractérisée par l'existence de droits de propriété sur des biens indivisibles. Chaque partie est ainsi propriétaire d'une portion du bien indivisible et a donc le droit d'exclure les autres de sa part. Le résultat final est que personne ne possède le privilège d'utilisation effectif, les droits étant morcelés.

#### **e) Les revendications sur les inventions en aval**

Les brevets sur les outils de recherche (marqueurs, tests, récepteurs, animaux transgéniques...) sont de plus en plus souvent assortis de clauses reconnaissant à leurs propriétaires des droits sur les produits élaborés et les résultats trouvés par les outils ou les méthodes brevetées. Dès lors le détenteur des brevets en question peut demander des redevances sur la vente d'un produit mis au point à l'aide de son outil de recherche breveté.

Maintenant que l'appropriation du vivant est devenue possible il faut s'interroger sur la législation internationale concernant la situation des détenteurs des ressources génétiques et les droits des populations autochtones.

## ***B. Situation des détenteurs des ressources génétiques***

La situation des pays en voie de développement est caractérisée par une grande richesse à la fois en biodiversité et en savoirs traditionnels dont l'accès est sujet à controverse compte tenu notamment des droits des communautés autochtones. L'accès à la biodiversité et aux savoirs traditionnels des pays en voie de développement a évolué au niveau international.[5]

### **1. L'évolution du cadre international : de la liberté totale de l'accès à l'affirmation de la souveraineté nationale**

Les ressources génétiques ont été de tout temps considérées comme le patrimoine commun de l'humanité c'est-à-dire que leur accès était totalement libre. Cette position n'avait cependant jamais été affirmée dans un texte et n'a pendant très longtemps fait l'objet d'aucun débat. L'Organisation des Nations Unies pour l'agriculture et l'alimentation (F.A.O.) a été créée en octobre 1945 pour améliorer l'état nutritionnel, le niveau de vie, la productivité agricole et le sort des populations rurales en général. Son action a visé à organiser un Système mondial de conservation et d'utilisation des ressources phylogénétiques au moyen de la coopération internationale.

Dans la logique de cette action la Conférence internationale de la F.A.O. a adopté en 1983 l'«Engagement international sur les ressources phylogénétiques ». La particularité de cet Engagement était d'être le premier accord international centré sur les questions de la conservation et de l'utilisation durable des ressources phylogénétiques utiles à l'agriculture et à l'alimentation. Ce texte était fondé, comme le proclamait son article premier sur « le principe universellement accepté selon lequel les ressources phylogénétiques sont le patrimoine commun de l'humanité et devraient donc être accessibles sans restriction ». Ce concept du libre accès s'étendait alors aux plantes cultivées traditionnellement, sous réserve des dispositions de l'Union pour la protection des obtentions végétales (U.P.O.V.) en vigueur dans un certain nombre de pays, et aussi, et surtout, aux espèces végétales sauvages.

L'abandon du concept de ressources génétiques « *patrimoine commun de l'humanité* » est la conséquence tout d'abord du préambule de la CBD.[32] En effet celui-ci affirme seulement que « *la conservation de la diversité biologique est une préoccupation commune à l'humanité* ». Deux dispositions de ce texte, les alinéas 1 et 5 de l'article 15 expriment le changement de préoccupations :

Article 15 – 1. : « *Etant donné que les Etats ont droit de souveraineté sur leurs ressources naturelles, le pouvoir de déterminer l'accès aux ressources génétiques appartient aux gouvernements et est régi par la législation nationale.* »

Article 15 – 5. : « *L'accès aux ressources génétiques est soumis au consentement préalable donné en connaissance de cause de la Partie contractante qui fournit lesdites ressources, sauf décision contraire de cette Partie* ».

Une autre disposition, l'article 15 – 7, prévoit « [...] *le partage juste et équitable des résultats de la recherche et de la mise en valeur ainsi que des avantages résultant de l'utilisation commerciale et autre des ressources génétiques avec la Partie contractante qui fournit ces ressources. Ce partage s'effectue selon des modalités mutuellement convenues.* » [1] et en lien particulier avec la biotechnologie dans l'article 19 « *Chaque Partie contractante prend toutes les mesures possibles pour encourager et favoriser l'accès prioritaire, sur la base juste et équitable, des Parties contractantes, en particulier des pays en développement, aux résultats et aux avantages découlant des biotechnologies fondées sur les ressources génétiques fournies par ces Parties* » [1][2][34]

C'est cette disposition, avec le mécanisme de financement, qui a provoqué l'hostilité des Etats-Unis qui ont signé cette Convention le 4 septembre 1993 mais ne l'ont pas, jusqu'à présent, ratifiée. L'affirmation par cette Convention de la propriété des Etats sur leurs ressources génétiques a suscité et continue à soulever des oppositions de fond. [32]

## **2. Les droits des communautés autochtones**

Dans les années 80, recherche et produits issus des biotechnologies se concentrent dans les pays du Nord, principal marché de la pharmacie et de l'agrochimie. Malgré leurs importants gisements de biodiversité, les pays du Sud bénéficient très peu de ces innovations. Les négociations sur la diversité biologique leur donnent l'occasion de défendre leurs intérêts. Au nom de leur souveraineté nationale, ils revendiquent le contrôle de leurs ressources biologiques et exigent des contreparties à la fourniture de matériel génétique. Les négociations tournent alors au marchandage entre pays à faibles revenus et pays détenteurs de hautes technologies.

En 1991, un événement extérieur aux négociations –le contrat Merck- INBio– va signer définitivement l'abandon du concept de patrimoine commun dans la convention et le choix de la régulation de l'accès aux ressources et du partage des avantages. [32]

En septembre 1991, l'une des plus grandes entreprises pharmaceutiques mondiales, Merck, passe un contrat pour la valorisation de la biodiversité avec l'Institut national de la biodiversité du Costa Rica (INBio), organisation nationale privée à but non lucratif. INBio, cofinancée à hauteur de

1,135 millions de dollars par Merck, est chargée, en accord avec le gouvernement, de l'inventaire des espèces sauvages de plants, d'insectes et de microorganismes du Costa Rica. Les échantillons biologiques sont ainsi centralisés. En cas d'exploitation fructueuse, Merck reverse à INBio entre 2 et 6% des bénéfices. Sur le total des droits perçus, INBio en verse 50% au parc national pour des actions de conservations. Cependant Merck conserve l'exclusivité d'exploitation des échantillons pendant deux ans et le droit de déposer un brevet pour tous produits développés à partir des échantillons. Révélé en 1991 au moment où les négociations sur la convention butent sur les conflits d'accès aux ressources ce contrat apparaît comme un modèle de gestion rationnelle de la biodiversité conciliant les intérêts du nord et du sud.

Cependant la décision de dénoncer en 2002 cet accord faute de débouchés commerciaux, tend à montrer les limites des financements mobilisables par ce biais. Dans la pratique, la définition de lois nationale sur l'accès et le partage des avantages reste complexes. Plusieurs ensembles régionaux ont donc formulé d'un régime commun l'accès aux ressources génétiques (Pacte andin, OUA et ASEAN). Ces législations déterminent les procédures à suivre par les scientifiques et les entreprises du pays ou de l'étranger pour accéder aux ressources. Elles spécifient aussi les conditions du partage des avantages.

En l'absence de législation nationale, la protection des communautés locales et des savoirs traditionnels n'est pas toujours garantie. La Convention de la Biodiversité s'est munie d'un groupe de travail sur l'accès et le partage des avantages. La convention souligne le lien entre la conservation de la biodiversité et de la diversité culturelle et de l'importance de l'implication des communautés locales dans les accords de partage des avantages, l'article 8j) ouvre le débat sur les formes de protection des savoirs traditionnels et sur la possibilité de faire valoir des droits tant sur les savoirs que sur les innovations. Leur reconnaissance devrait assurer plus d'équité dans le partage des avantages.[32]

La convention de la biodiversité pose les règles d'accès et de partages. Cependant la principale difficulté rencontrée reste la protection des droits des populations autochtones et locales puisque les états sont les principaux artisans de la réalisation de ces droits.

La Convention sur la diversité biologique énonce un certain nombre de dispositions dont le principe général est posé dans l'article 8 j : « *Chaque Partie [...] sous réserve des dispositions de la législation nationale, respecte, préserve et maintient les connaissances, innovations et pratiques des communautés autochtones et locales qui incarnent des modes de vie traditionnels présentant un intérêt pour la conservation et l'utilisation durable de la diversité biologique et en favorise l'application sur une plus grande échelle, avec l'accord et la participation des dépositaires de ces*

*connaissances, innovations et pratiques et encourage le partage équitable des avantages découlant de l'utilisation de ces connaissances, innovations et pratiques ».* [2]

Le principe ainsi posé soulève cependant un certain nombre de difficultés. Tout d'abord se pose le problème de la constatation de ces connaissances qui, le plus souvent, sont uniquement orales et ne reposent que très rarement sur un document écrit. Elles ne résultent également pas nécessairement d'un acte individuel et spécifique de découverte. Les variétés qui font l'objet de ce savoir sont sélectionnées la plupart du temps sur leur capacité à s'adapter à un environnement fluctuant et évidemment pas sur les critères définis dans les pays industrialisés par l'U.P.O.V., à savoir nouveauté, distinction, stabilité et uniformité.

Ces caractéristiques des savoirs traditionnels peuvent être des obstacles considérables. Les connaissances traditionnelles doivent être normalement considérées comme n'importe quelle forme d'antériorité. Cependant elles doivent permettre à une personne qualifiée de créer la nouveauté en question, et il doit être possible de prouver juridiquement cette antériorité. Ces deux conditions doivent être, la plupart du temps, très difficile à remplir.

Un autre problème difficile est de déterminer à qui appartiennent ces connaissances. Celles-ci peuvent être l'apanage d'une seule personne ou d'une communauté dans son ensemble. Dans cette dernière situation, il peut s'agir d'une communauté très étendue qui peut se trouver à cheval sur deux frontières ou plus, comme cela peut être souvent le cas dans nombre de pays en voie de développement. Là encore les questions de preuve juridique peuvent être très difficiles à résoudre. [7]

### ***C. La bio prospection à but pharmaceutique***

La « bioprospection », définie comme la recherche, l'exploitation, l'extraction et le criblage de la diversité biologique et des connaissances indigènes pour découvrir des ressources génétiques ou biochimiques a été de toutes les époques. Elle s'est même organisée de façon systématique après 1945 sous l'égide de la F.A.O. quand prévalait le principe que les plantes faisaient partie du patrimoine de l'humanité et étaient donc librement accessibles à tous.

Un certain nombre d'entreprises et même d'institutions de recherche ont cherché à s'en assurer la propriété sans demander le consentement des pays ou des populations intéressés. Cette situation a donné lieu à la création, par des pays en voie de développement et des organisations les soutenant, du concept de « biopiraterie ». Celle-ci peut se définir comme l'usage non autorisé des ressources génétiques et des savoirs traditionnels.[6][36] [27]

La bioprospection à but pharmaceutique fait partie de la stratégie des industriels pour découvrir de nouvelles molécules et élaborer de nouveaux médicaments. La première voie consiste à la construction de molécules qui entrent en interaction avec une cible moléculaire identifiée, le plus souvent une protéine, dont le dysfonctionnement est impliqué dans une maladie. On recherche ensuite dans les banques de molécules celles qui vont présenter les meilleures ressemblances avec cette protéine afin de l'améliorer pour la transformer en médicament actif. [5][32]

La seconde méthode est l'approche aléatoire consistant à passer au crible d'un test biologique le plus grand nombre possible de molécules. Ces nouvelles molécules peuvent être fournies par la chimie combinatoire ou par les substances naturelles.

Cependant, dans la pratique, le chemin est souvent très long entre la plante et le médicament. Les premières difficultés consistent à trouver physiquement les végétaux adéquats. Pour cela il est possible de recourir au criblage systématique, aux connaissances locales ou à une démarche chimio-taxonomique, c'est-à-dire à une exploration des espèces d'une même famille réputée pour ses substances utiles. Il est ensuite nécessaire de réaliser une extraction et une purification de la matière brute pour recueillir des composés chimiques les plus purs possibles, puis procéder à des tests pour déceler une éventuelle activité biologique.[6][5]

Pour baisser les coûts de la bioprospection, les industriels et les chercheurs ont souvent recours aux populations locales. Dès lors, il semble indispensable de donner une rémunération aux populations autochtones pour la collecte de plantes ou de connaissances qui aboutira à la mise au point d'un médicament. La forme du paiement est cependant difficile à concevoir. En effet, une rémunération forfaitaire pourrait être d'abord envisagée, mais qui sera inévitablement comparée aux revenus pouvant être très élevés de l'entreprise pharmaceutique. Un intéressement aux bénéfices peut être possible mais celui-ci ne peut intervenir que dix ou quinze ans, ou plus, après la récolte de la plante ou la communication des savoirs traditionnels.

Néanmoins, la valeur réelle de la biodiversité des pays en développement est certainement amoindrie par l'existence à travers le monde de collections comme celles des centres internationaux de recherche agronomique ou de nombreuses institutions scientifiques qui détiennent d'importantes banques de ressources génétiques, microbiennes, animales ou humaines. Il peut être aussi noter qu'il n'est pas toujours nécessaire de se rendre auprès des collectivités traditionnelles pour acquérir leur savoir, celui-ci se trouvant déjà consigné dans de nombreuses publications scientifiques.

Enfin il faut tenir compte des possibilités de reproduction des principes actifs qui peuvent être découverts dans des ressources naturelles. En effet, grâce aux progrès scientifiques, une analyse chimique ou génétique n'exige que de très petites quantités de matériel tangible. Cela rend possible

la reproduction du, ou des, principe(s) actif(s) soit par chimie combinatoire ou de synthèse soit par remodelage biologique d'un autre organisme par transgénèse. [5][6][1]

C'est pourquoi les modalités de restriction d'accès physique perdront probablement de leur importance au profit des modalités régissant l'utilisation et le contrôle de l'information proprement dite. De plus, il est tout à fait justifié que les pays en développement souhaitent tirer parti des ressources génétiques présentes sur leur territoire comme le font d'autres pays de leurs ressources fossiles.

Il ne faut cependant pas qu'ils surestiment les gains qu'ils pourraient en retirer compte tenu des différentes façons de contourner la bioprospection in situ, sans parler du « biopiratage » certainement impossible à éradiquer complètement. Il serait alors primordial pour les pays en développement de développer une approche en terme de contrôle des informations intangibles pouvant être recueillies à partir de leurs ressources génétiques.

Le vrai défi pour les pays est de pouvoir ajouter eux-mêmes de la valeur à leurs ressources génétiques brutes plutôt que de les exporter vers d'autres pays où seront développés les produits finis et, en fin de compte, réalisés les plus importants profits. C'est certainement une voie très difficile mais elle a commencé à être empruntée par un certain nombre de pays comme l'Inde ou le Costa Rica à une plus modeste échelle.[5]

## Conclusion

Les plantes transgéniques représentent un support important et nouveau pour la fabrication de molécules d'intérêt pharmaceutiques. En effet, avec l'amélioration et la diversification des techniques de transgénèses, les plantes ont pu être converti en plate-forme de production. De plus la diversité des espèces végétale offre une multitude de possibilités de valorisation des ressources génétiques. Divers molécules thérapeutiques sont produits soit par voie direct comme la production d'anticorps et de lipase gastrique ou par voie indirect comme le ginkgolide. Cependant les limitations actuelles de production de protéines recombinantes humaines chez les plantes sont les difficultés de processus d'extraction et surtout l'apparition de structure de glycanes non authentiques sur les protéines recombinantes. De plus il faut noter des différences d'activité de la protéine selon le site d'exportation.

La synthèse de produits biopharmaceutiques est également possible dans d'autres organismes comme les bactéries, les levures ou les animaux- et entre en compétition avec la production chez les plantes. Cependant la plante resterait le système de production le plus avantageux (coût, quantité, sécurité sanitaire) et notamment dans le cas de la production de molécule à effets thérapeutiques. Cependant, lorsque cette molécule thérapeutique est mis en évidence dans le «patrimoine naturel» d'une population autochtone comme dans le cas du ginkgo, le problème vis à vis du détenteur légitime de la ressource génétique peut être posé. En effet l'appareil politique reste flou, ou trop consensuel, pour savoir dans quelles mesures la population locale et l'entreprise qui a réalisé de la bioprospection a un droit sur la plante et la molécule produite.

L'évolution du cadre international de la propriété des ressources végétales avec le passage de la liberté totale de l'accès à l'affirmation de la souveraineté nationale ainsi que l'évolution du droit de propriété intellectuelle a permis l'appropriation du vivant. Ce dernier point a de lourdes conséquences sur les populations locales et on peut citer l'exemple des fermiers Quinoa de la Bolivie, pour avoir courageusement challenger le brevet Quinoa en menant le problème au niveau de l'Assemblée Générale de l'ONU et en forçant les détenteurs de ce brevet à y renoncer. Il serait donc utile de redéfinir les différents niveaux de protection.

Dans l'intérêt de l'axe nord-sud il serait essentiel que la recherche publique prenne un poids plus important avec les paniers de brevet par exemple tout en permettant aux communautés locales de tirer profits de leurs savoirs. En ce sens la Convention de la Diversité Biologique ne permet pas une protection concrète de ses populations et de ses savoirs et il serait nécessaire de définir un cadre lors de la bioprospection en amont du développement effectif de la production de molécules à effets thérapeutiques par les plantes.



# Tables des illustrations

|   |    |
|---|----|
| Figure 1: Carte simplifié du plasmide Ti natif (molecular) .....  | 5  |
| Figure 2 : Transfert du gènes de résistance à la kanamycine dans une cellule de plant de tabac. [18].....       | 7  |
| Figure 3 : L'exemple du transfert d'un gène bactérien dans du maïs par la méthode du canon à ADN[19].....       | 9  |
| Figure 4 : Glycosylation de l'anticorps Guy's 13.....   | 22 |
| Figure 5 : voie de synthèse du ginkgolide A à partir du géranylgeranyl diphosphate[23].....                     | 25 |
| Figure 6 : Nombre de brevets accordés par an Source : USPTO.....  | 30 |
| Figure 7 : la R&D américaine en panne de nouveaux médicaments Source :PhRMA et FDA.....                         | 30 |
| <br>  |    |
| Tableau 1 : Exemples de molécules d'intérêt thérapeutiques produites à partir de plantes transgéniques[9] ..... | 20 |
| Tableau 2 : Comparaison des différents systèmes de production de protéines recombinantes [8] .....              | 17 |

# Bibliographie

- [1] Article 15, 1992 Convention de la Biodiversité [en ligne] disponible sur <<http://www.biodiv.org/convention/articles.asp?lg=2&a=cbd-15>>, 2005
- [2] Article 8 1992 Convention de la Biodiversité [en ligne] disponible sur <<http://www.biodiv.org/convention/articles.asp?lg=2&a=cbd-08>>, 2005
- [3] BioPROTEIN, production de protéines et de vaccins recombinants, [en ligne] disponible sur : <<http://www.bioprotein.com/fr/open.htm>>
- [4] Cabannes et al., N- Glycolisation of a mouse IgG expressed in transgenic tobacco plants, *Glycobiology* (1999) vol. 9 N° 4 365-372
- [5] Claeys A., Rapport sur les conséquences des modes d'appropriation du vivant sur les plans économique, juridique et éthique, Office Parlementaire D'Evaluation Des Choix Scientifiques Et Technologiques (2004) Saisine N°1487
- [6] Claeys Alain, Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, Rapport sur les conséquences des modes d'appropriations du vivant sur les plans économiques juridiques et éthiques, 2004
- [7] Clair Philippe, Roussel Caroline, La synthèse peptidique en phase solide, [en ligne] disponible sur : <<http://www.gazettelabo.fr/2002archives/pratic/1996/9syntPS.htm>>, 2002
- [8] Elbehri, Biopharming and the Food System: Examining the Potential Benefits and Risks *AgBioForum*, 8(1): 18-25. 2005
- [9] Faye L., Landry N., La production de protéines à usage biopharmaceutique dans les plantes, *médecine/sciences* (2001) ; 17 : 867-77
- [10] Faye Loïc, Lerouge Patrice, Gomord Véronique ; OGM et production de molécules pharmaceutiques ; *Bull. Acad. Natle Méd.*, 2002, 186, n° 8 2002
- [11] Fischer. R, Stiger E., Plant-based production of biopharmaceuticals, *Current Opinion in Plant Biology* (2004), 7:152–158
- [12] Gaillardin C. et al, Génétique Moléculaire et Cellulaire, INRA - CNRS - Institut National Agronomique Paris-Grignon, Les levures peuvent-elles produire des médicaments, *Organismes Génétiquement Modifiés à l'INRA*, [en ligne] disponible sur le site : <<http://www.inra.fr/Internet/Directions/DIC/ACTUALITES/DOSSIERS/OGM/OGM.htm>> , 1998
- [13] Houdebine L.-M., la transgénèse animale et ses applications, *INRA Production Animale*, 11, 81-94, (1998)
- [14] Houdebine L.-M., Mercier J-C. Médicaments, aliments-santé, xéno greffes : que peut apporter la transgénèse animale ? *INRA Jouy-en-Josas* [en ligne] disponible sur le site : <<http://www.inra.fr/Internet/Directions/DIC/ACTUALITES/DOSSIERS/OGM/OGM.htm>>, Mai 1998
- [15] INRA, Charte de la propriété intellectuelle de l'INRA, novembre (2003)
- [16] INRA, Les plantes transgéniques, [en ligne] disponible sur le site : <<http://www.inra.fr/Internet/Directions/DIC/ACTUALITES/DOSSIERS/ogm.html>>, (1997)

- [17] INRP, fondement biologique de la transgénèse, [en ligne] disponible sur le site : <http://www.inrp.fr/Acces/biotic/biomol/transgen/html/galle.htm> ; (2001)
- [18] INRP, transfère du gène à la résistance à la kanamycine dans une cellule de plante de tabac, [en ligne] disponible sur le site : <http://www.inrp.fr/Acces/biotic/biomol/transgen/html/kana.htm>
- [19] INRP, transgénèse végétale, [en ligne] disponible sur le site <http://www.inrp.fr/Acces/biotic/biomol/transgen/html/transveg.htm> ; (2001)
- [20] INRP, transgénèse, [en ligne] disponible sur le site : <http://www.inrp.fr/Acces/biotic/biomol/transgen/accueil.htm> ; (2001)
- [21] La confédération paysanne, Réglementation: des armes juridiques à connaître, Campagne solidaires, (2001), vol 158
- [22] Le Loir Y., Nouaille S., Sécrétion de protéines d'intérêt thérapeutique chez *Lactococcus lactis*, INRA, EDP Sciences, (2001) 217:217–226
- [23] Matsuda et al, *Ginkgo biloba* levopimaradiene synthase, United States Patent 6,946,283 (2002)
- [24] Meristem therapeutics, Merispase®, [en ligne] disponible sur : [http://www.meristem-therapeutics.com/rubrique.php3?id\\_rubrique=7](http://www.meristem-therapeutics.com/rubrique.php3?id_rubrique=7) (2005)
- [25] Meristem Therapeutics. Essais Au Champ Pluriannuels De Maïs Génétiquement Modifié Exprimant Une Lipase Gastrique Pour Des Applications Médicales Demande D'autorisation Auprès Du Ministère De L'agriculture, De L'alimentation, De La Pêche Et Des Affaires Rurales (2005)
- [26] Mokrzycki-Issartela N., Bouchonb B., A transient tobacco expression system coupled to MALDI-TOF-MS allows validation of the impact of differential targeting on structure and activity of a recombinant therapeutic glycoprotein produced in plants MERISTEM Therapeutics, FEBS 27604 FEBS Letters 552 (2003) 170-176
- [27] Office Européen des Brevets, Rapport Annuel 2004
- [28] Pereira S.L., Huang Y., A novel w3-fatty acid desaturase involved in the biosynthesis of eicosapentaenoic acid Biochem. J. (2004) 378, 665–671
- [29] Renault Pierre, Génétique microbienne ; Gérard Corthier, INRA Jouy-en-Josas, Peut-on obtenir de nouveaux médicaments avec des micro-organismes ? Organismes Génétiquement Modifiés à l'INRA, [en ligne] disponible sur le site : <http://www.inra.fr/Internet/Directions/DIC/ACTUALITES/DOSSIERS/OGM/OGM.htm>, (1998)
- [30] Scherprann H. G. et al, cloning and characterisation of *Ginkgo biloba* levopimaradiene synthase, which catalyse the first committed step in ginkgolide biosynthesis, Archives of Biochemistry and Biophysics, (2001) Vol. 392 N°2 263-269
- [31] Séralini Gilles-Eric, Avis sur le projet MERISTEM THERAPEUTICS, maïs OGM pour produire un médicament à base de lipase gastrique de chien en plein champ 2005
- [32] Solagrall, Biodiversité : public ou privé ? , Biodiversité, Savoirs protégés, savoirs partagés, disponible sur : [http://www.iprsonline.org/ressources/docs/Solagrall\\_fiche1\\_biod.pdf](http://www.iprsonline.org/ressources/docs/Solagrall_fiche1_biod.pdf), 2002

- [33] Sontot Andrée, Bustin Nicole, Ressources génétiques et brevetabilité des gènes : évolution du droit de propriété intellectuelle, Le sélectionneur Français, 1999,45-52
- [34] Tekoah Y., Ko K., Controlled glycosylation of therapeutic antibodies in plants Archives of Biochemistry and Biophysics (2004) 426 266–278
- [35] Thompson, DNA encoding a plant lipase, transgenic plants and a method for controlling senescence in plants, United States Patent 6,774,284 (2004)
- [36] Trommetter M., Quels marchés pour les ressources génétiques? INRA-UMR GAEL, Université P. Mendès France de Grenoble.(2004)
- [37] Vélot Christian Comité de Recherche et d'Information champ d'un maïs transgénique produisant la lipase gastrique de chien destinée à soulager les enfants atteints de mucoviscidose. Institut de Génétique et Microbiologie Centre Scientifique d'Orsay, 2005
- [38] Weidner Marie et Furelaud Gilles, document, La transgénèse grâce à Agrobacterium tumefaciens, [en ligne] disponible sur le site :  
<<http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/transgenese/agrobacterium/agro.htm>>
- [39] Wodarg W., Biotechnologie et propriété intellectuelle, Rapport Commission de l'agriculture et du développement rural, (1999) Doc. 8459
- [40] Yoshida K., Shinmyo A., Transgene Expression Systems in Plant: a Natural Bioreactor, Journal Of Bioscience And Bioengineering (2000) Vol. 90, No. 4, 353-362.