

Plantes médicaments

Plantes à traire

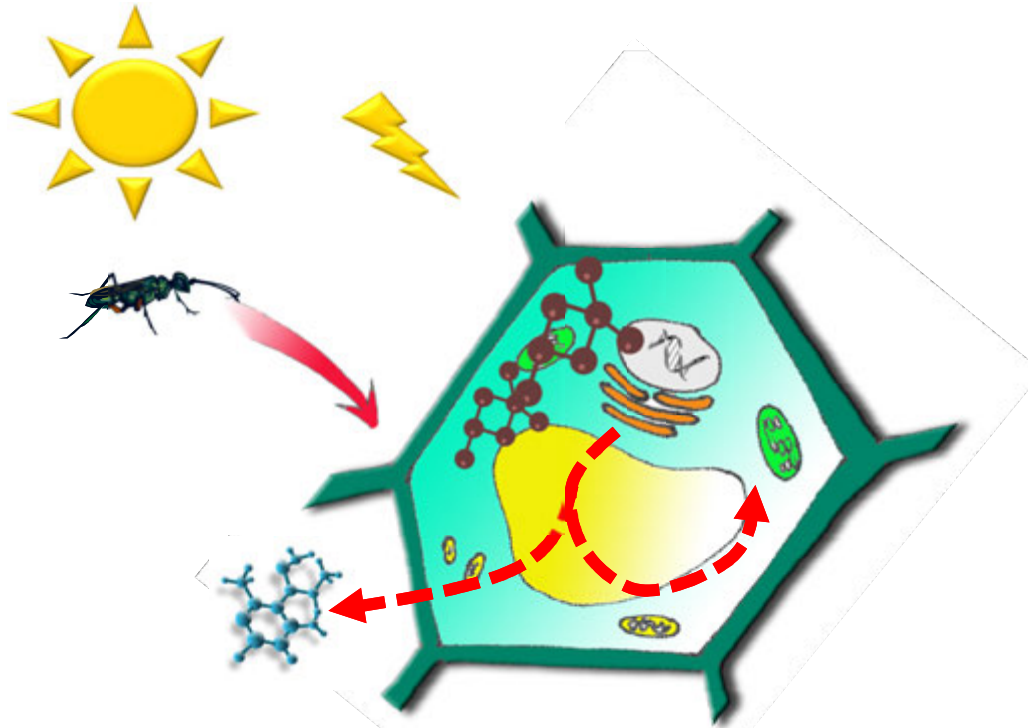


Prof. F. Bourgaud

Dir. Laboratoire Agronomie et Environnement (UMR INRA – Univ. de Lorraine)
VP Recherche Plant Advanced Technologies PAT
frederic.bourgaud@plantadvanced.com

Métabolisme secondaire des végétaux

Métabolisme primaire = métabolisme de base



Polyphénols

- Flavonoïdes
- Stilbènes

Terpènes

- Composés à HE
- Caroténoïdes

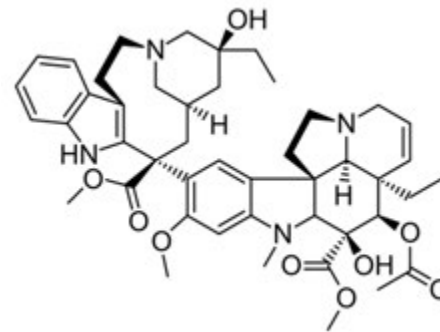
Alcaloïdes

- Indoliques
- Tropaniques

Métabolisme secondaire = métabolisme de l'adaptation
Réponse/tolérance aux stress biotiques ou abiotiques

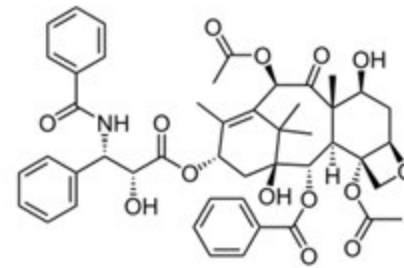
Les plantes comme sources de médicaments

Catharanthus roseus



Vinblastine

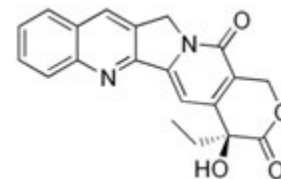
Taxus baccata



Taxol



Camptotheca acuminata



Camptothécine



Quelle ressource végétale pour répondre aux besoins en ingrédients actifs végétaux ?

- ▶ **Des plantes facilement disponibles**
 - ▶ Biodiversité végétale concentrée dans les zones équatoriales
- ▶ **Une matière végétale fortement titrée en principes actifs**
 - ▶ La teneur en M2 résulte d'une interaction complexe G x E
- ▶ **Comment rationaliser l'approvisionnement ?**
 - ▶ Cultures/récoltes conventionnelles
 - ▶ Technologie des bioréacteurs de cellules végétales



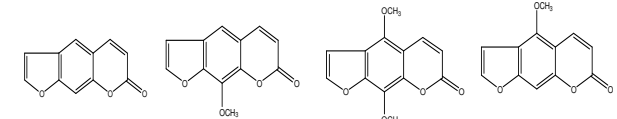
Réacteurs (Protalix)

Des succès (Taxol® BMS-Phyton)
mais d'une portée limitée

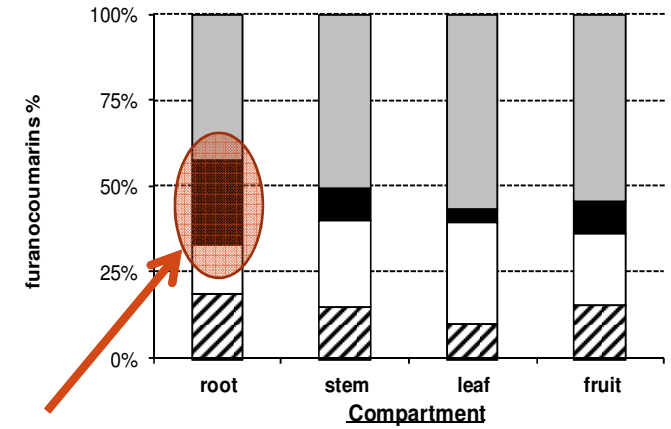
Observations de laboratoire



Ruta graveolens



psoralen
 xanthotoxin
 isopimpinellin
 bergapten



Spécifique aux racines

Milesi et al., Plant Sci. 161 (2001) 189-199

Cultures hydroponiques



Ruta graveolens



Taxus baccata



Datura innoxia

Plantes de 6 mois :
 3.8 mg (+/- 1.7 mg) de furanocoumarines
 Exsudé par les racines en 24h

Plants de 3 ans :
 0.20 mg (+/- 0.16 mg) de paclitaxel
 Exsudé par les racines en 24h

Plantes de 2 mois:
 0.7 mg (+/- 0.17 mg) d'alcaloïdes tropaniques
 Exsudé par les racines en 24h

Après permeabilisation

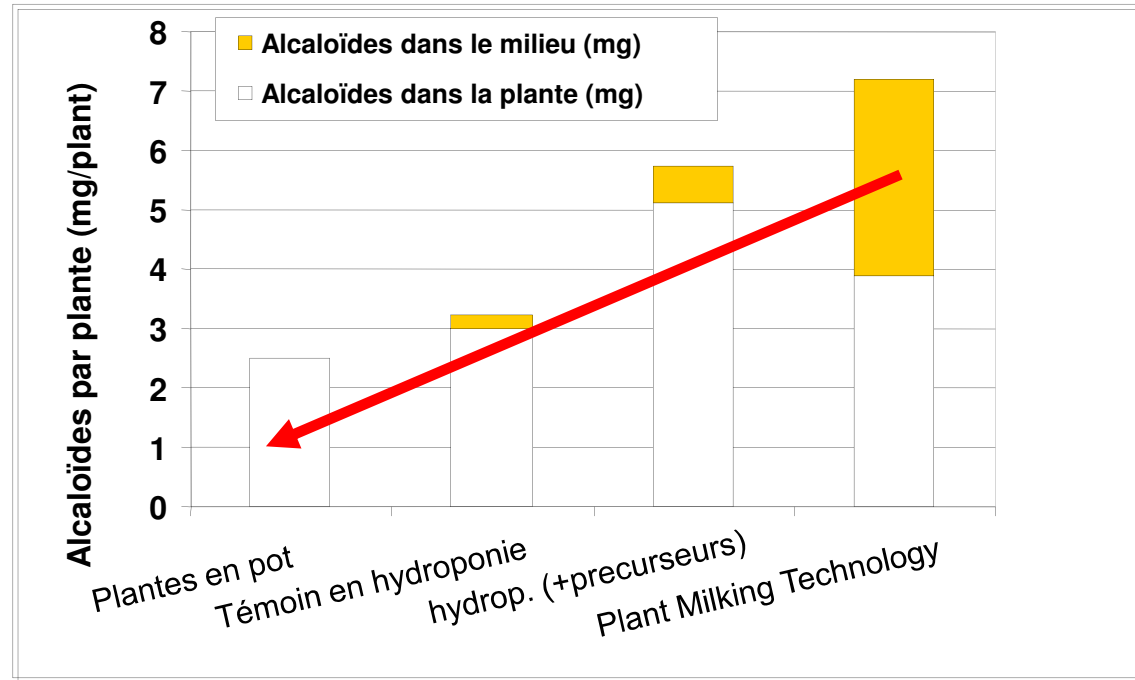
4.5 mg (+/- 1.2 mg) de furanocoumarines
 Exsudé par les racines en 24h

2.1 mg (+/- 1.0 mg) de paclitaxel
 Exsudé par les racines en 24h

5.0 mg (+/- 1.5 mg) d'alcaloïdes tropaniques
 Exsudé par les racines en 24h



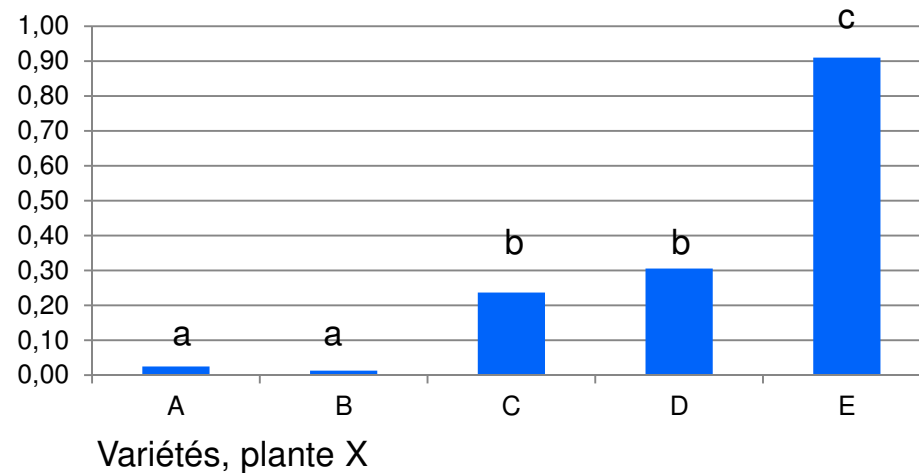
Alcaloïdes tropaniques de Datura



► Composante Génétique

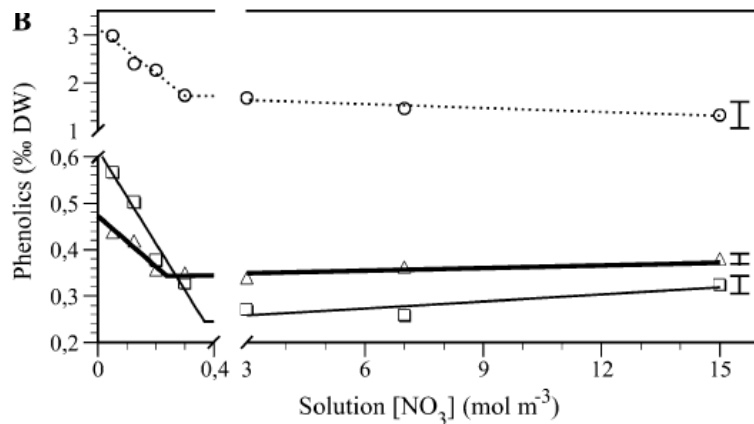
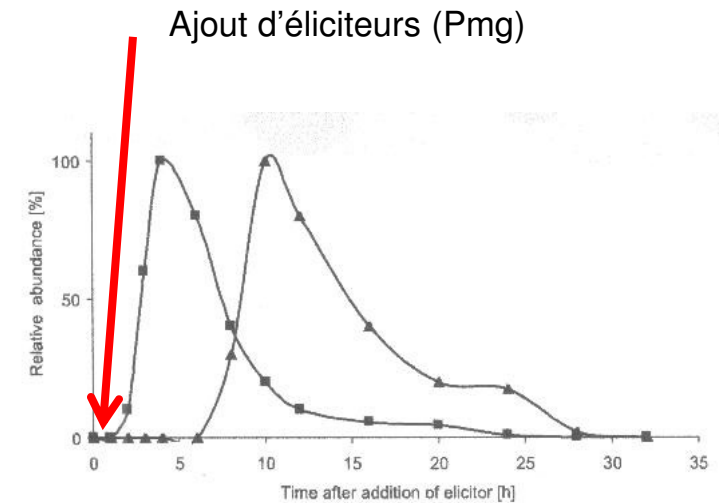
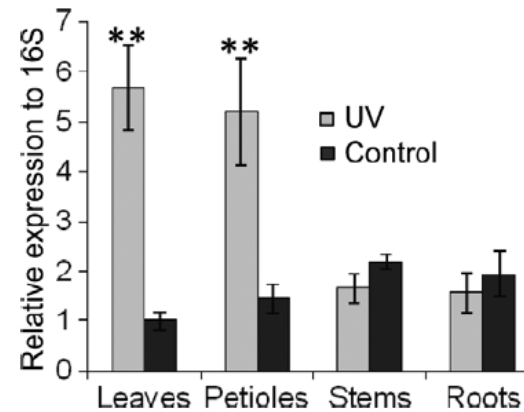
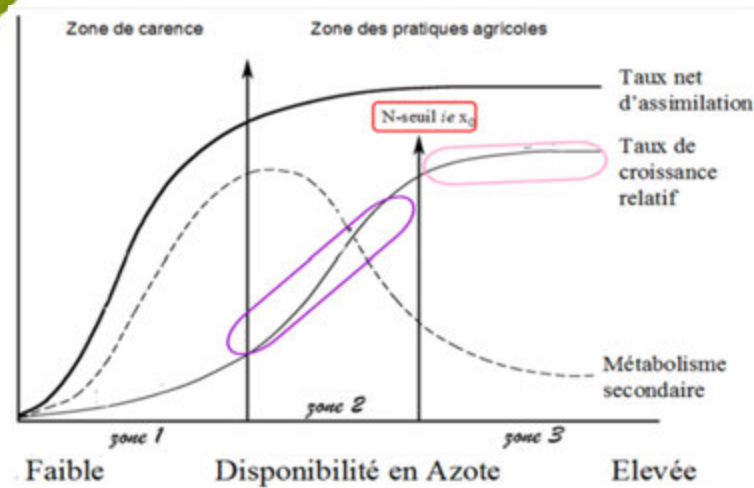
Variabilité intra-spécifique

**Teneur en dérivé d'acide
caféique (mg/g MS de racine)**



► Composante Environnement

- Nutrition
- Facteurs abiotiques
- Facteurs biotiques



Suivi de l'expression de l'orf *c2'h*
Vialart *et al.*, Plant J 2012

Larbat *et al.*, JBC 2007

Le Bot *et al.*, J Exp Bot 2009

A close-up photograph of a dense network of light-colored, fibrous plant roots. Numerous clear water droplets of varying sizes are clinging to the roots, creating a glistening effect. The background is dark and out of focus.

PAT

Plant Advanced Technologies



PAT plantes à traire[®]

Un nouveau procédé de production d'actifs naturels
à partir de végétaux

+ Société créée en 2005 à Nancy - France
(essaimage de l'INPL-ENSAIA/INRA)

+ Cotée sur NYSE Euronext depuis juillet 2009

+ Récompensée : Concours du Ministère de la Recherche, tremplin
Entreprise (Sénat-ESSEC), Lauréat 2006 Prix Pierre Potier « L'innovation
en chimie au bénéfice de l'environnement »

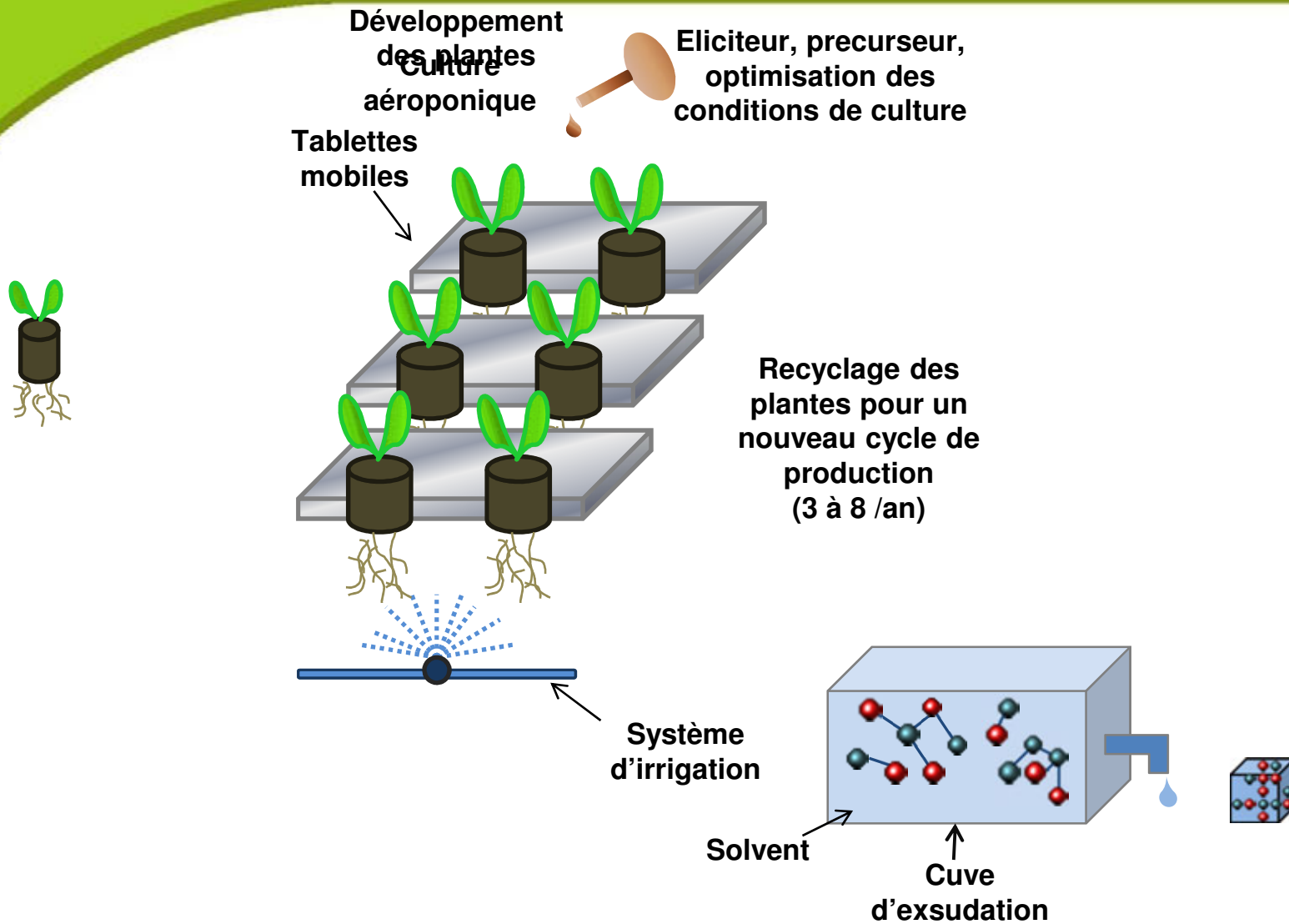
+ Aujourd'hui composée de 25 personnes



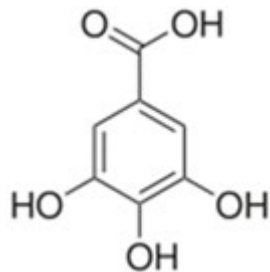
Objectifs:

- Développer des **plateformes végétales innovantes**
- Produire des molécules naturelles rares** à destination des marchés cosmétiques et pharmaceutique
- Préserver et valoriser les ressources végétales**

Procédé PAT Plantes A Traire ®

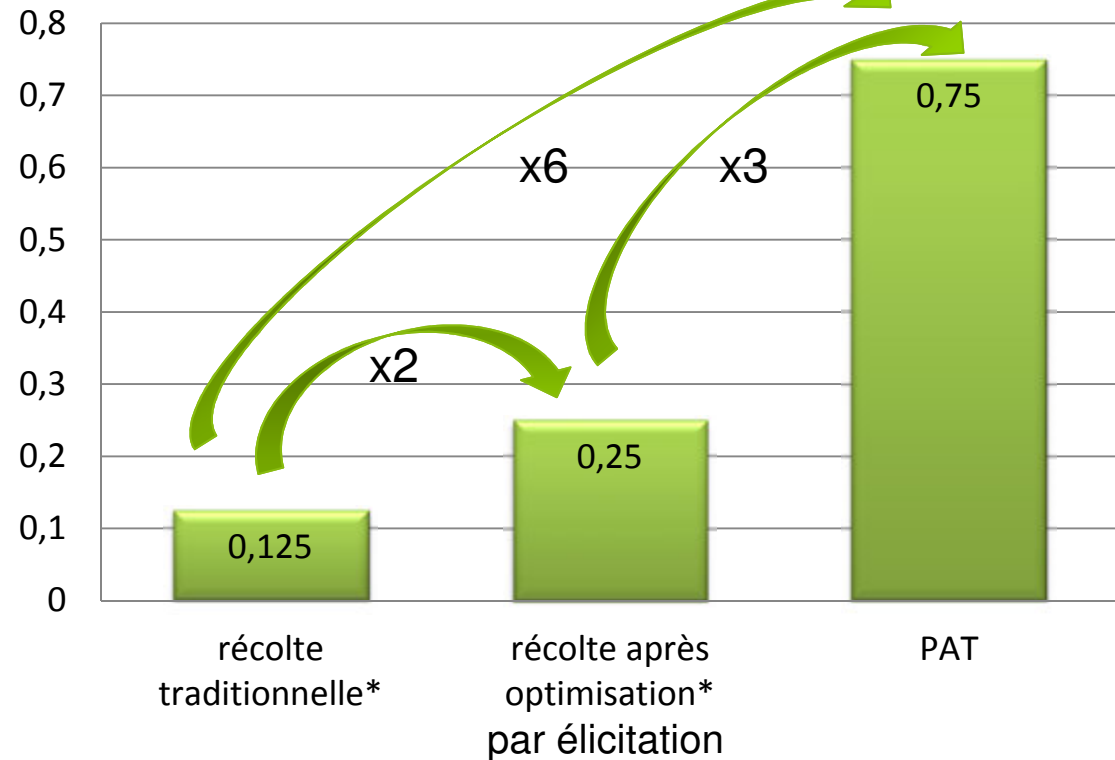


PAT plantes à traire[®]: Exemples de rendements



Acide gallique et dérivés

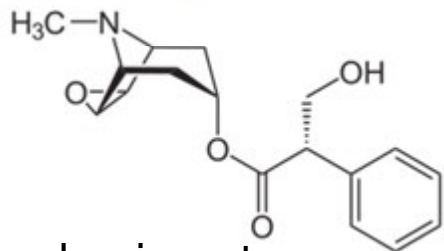
Rendement en polyphénols (g/m²/an)



→ Dans ces conditions de rendement
1000m² de production = 6000 m² en champ !

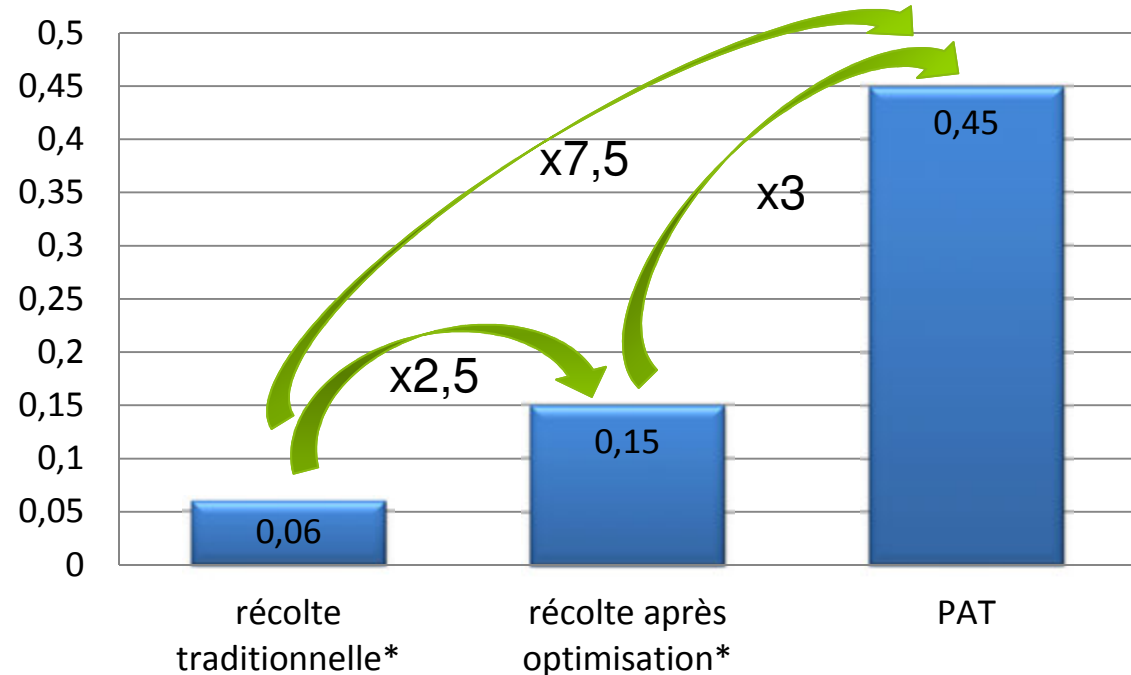
PAT plantes à traire[®]: Exemples de rendements

Datura innoxia



Scopolamine et apparentés

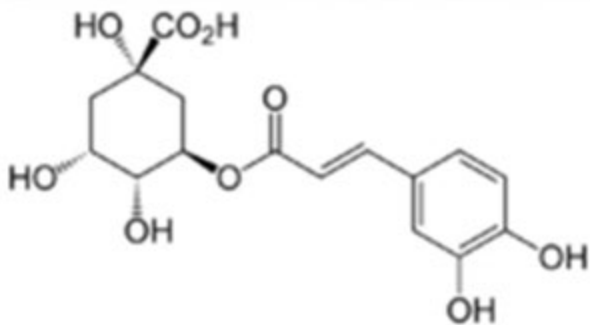
Rendement en alcaloïdes (g/m²/an)



par ajout de précurseurs
phénylalanine et ornithine

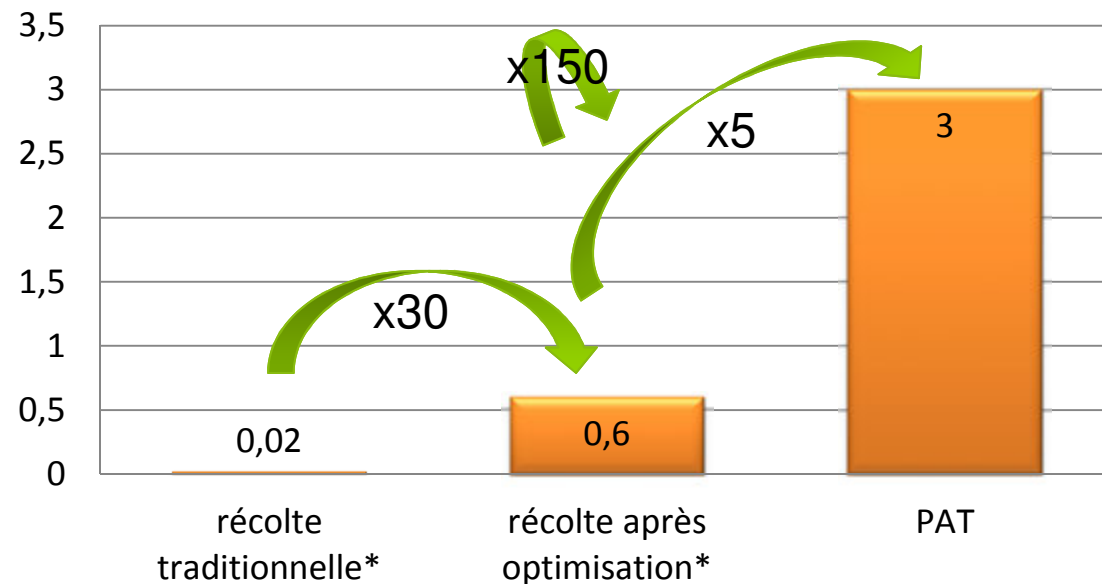
→ Dans ces conditions de rendement
1000m² de production = 7500m² en champ !

PAT plantes à traire[®]: Exemples de rendements



Acide chlorogénique et dérivés

Rendement en dérivés d'acide caféique
(g/m²/an)



par optimisation
du milieu nutritif

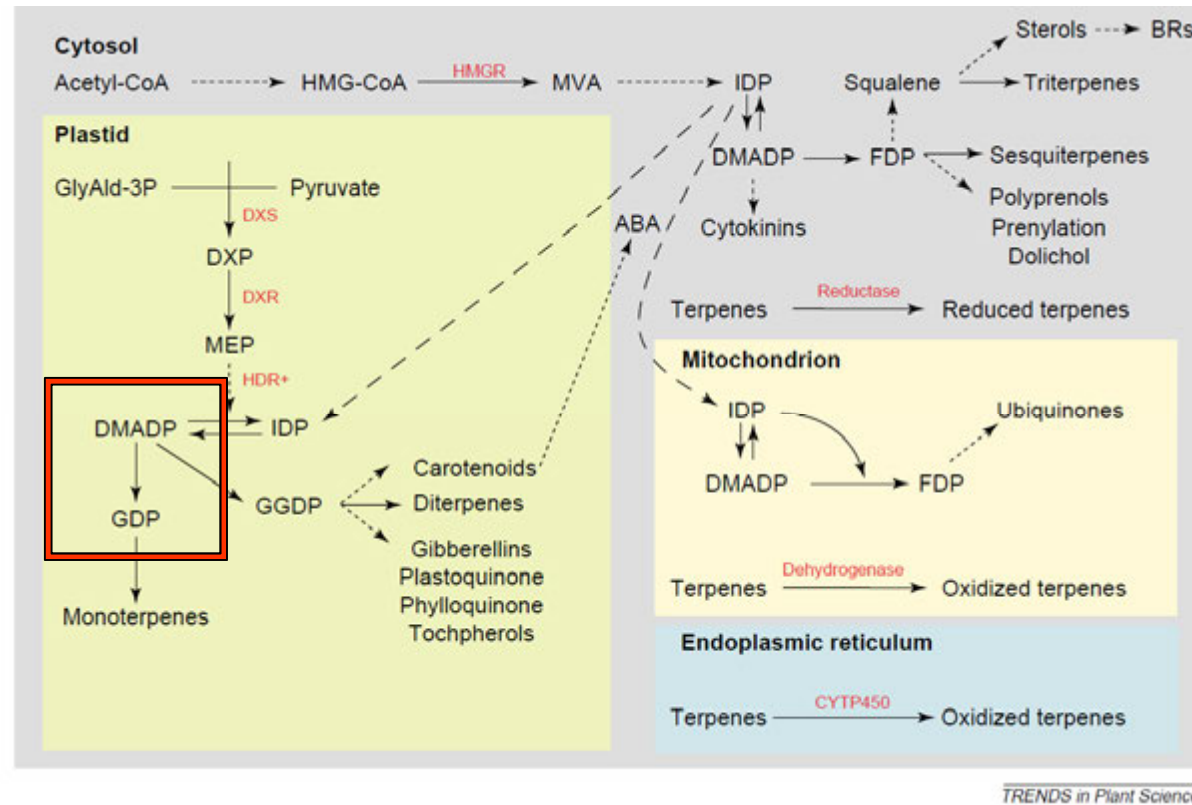
→ Dans ces conditions de rendement :
1000m² de production = 15 ha en champ !

- + Procédé écologique : **préservation des plantes** et production durable
- + Accès à des composés à **haute valeur ajoutée** issus de **plantes rares** ou difficiles à cultiver (>200 espèces)
- + Accès au **profil phyto-chimique unique** et meilleure pureté
- + La racine est la partie la **plus riche** de la plante et la moins étudiée
- + **Haut rendement** par la stimulation
- + Echelle de production **facile et rapide** à adapter
- + **Sécurité** d'approvisionnement
- + Processus de production (4000m² de serre instrumentée en 2012) incluant le **management de la qualité** selon ISO9001

→ Une opportunité pour produire ou revisiter des « hits » issus de végétaux



Nouvelles approches : ingénierie métabolique

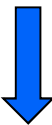
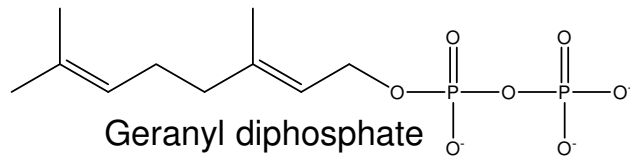


D'après Aharoni *et al.*, 2006, Trends in Plant Sci.

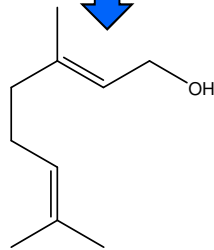
Consortium européen Smartcell (FP7)

Nouvelles approches : ingénierie métabolique

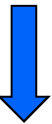
► Synthèse de monoterpènes chez le tabac (Projet EU SMARTCELL)



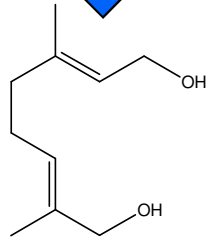
Geraniol synthase (*Veronica officinalis*)



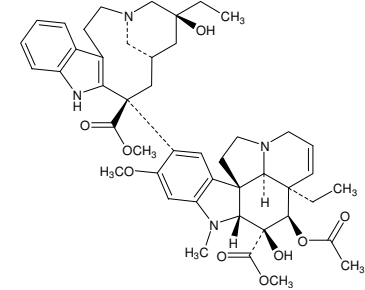
Geraniol



Geraniol 10 hydroxylase (*Arabidopsis* / *Catharanthus*)
P450 reductase (*Arabidopsis*)



10 hydroxy-geraniol



Néosynthèse de monoterpènes
chez le tabac

Production de protéines recombinantes par des végétaux

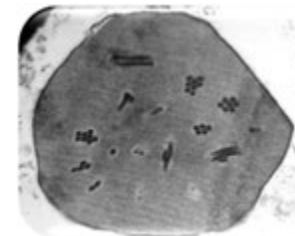
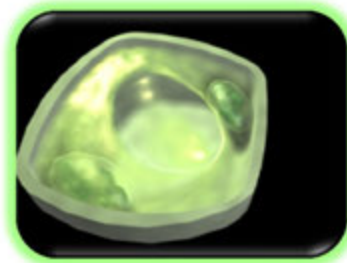
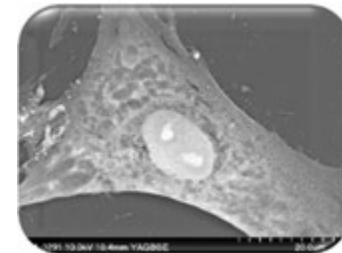
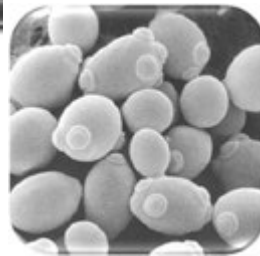
▶ Procaryotes

- Bactéries



▶ Eucaryotes

- Levures
- Cellules animales
 - Cellules de hamster (CHO)
 - Cellules d'insectes (baculovirus)
- Plantes



Quelles plantes modèles chez PAT pour la production de protéines thérapeutiques ?





PAT Vendredi®

Un nouveau système d'expression
pour la production de protéines recombinantes végétales



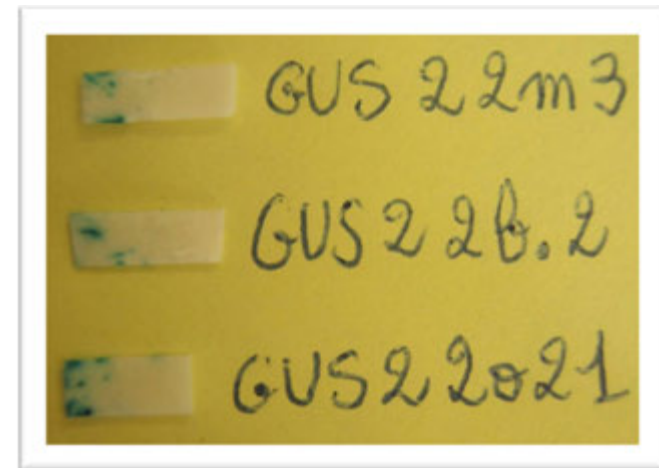
Le modèle Drosera



Le modèle Nepenthes



Tests GUS



Production des premières protéines recombinantes PAT Friday®

Drosera

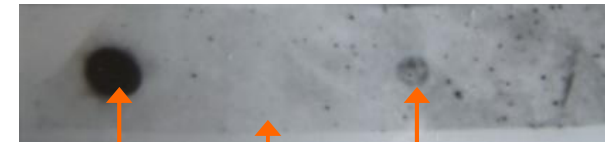
Interferon Y humain



Modèle Nepenthes

Protéines humaines recombinantes

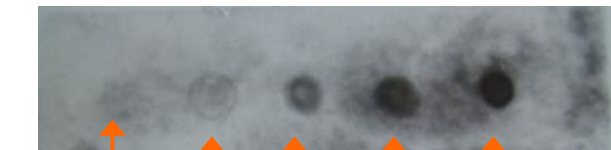
Facteur intrinsèque de Castle humain



Témoin FI

Plante témoin WT

Plante nsformée



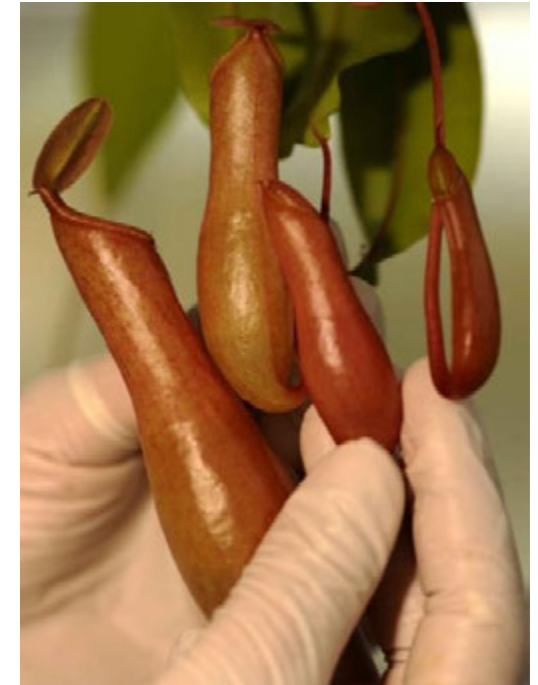
Plante témoin WT

Témoin IFN Y

Plantes transformées



- ✓ Récolte aisée
- ✓ Purification & downstream process simplifiés
- ✓ Stérilité possible
- ✓ Montée en échelle facile
- ✓ Activité Protease contrôlée



Merci de votre attention

Remerciements à tous nos collaborateurs :

Dr. Flore Biteau

Sissi Miguel

Benoit Mignard

Jean-Marc Lainé

Dr. Paul Hannewald

Estelle Muller

Cindy Michel

Jean-Paul Fèvre

Dr. Alain Hehn

Prof. E. Gontier

Alain Clément

Prof. Guckert

Audray Dugrand

Comparaison des systèmes d'expression hétérologue

	Sécurité sanitaire	Maturation des protéines	Immunogénicité	Sécurité technologique (confinement)	Coût économique
E. Coli	Pyrogénicité (endotoxines)	NON	NON	OUI	€€€
Levure	Pyrogenicité (endotoxines)	OUI	OUI	OUI	€€€
CHO	Risques théoriques liés aux maladies (prions, virus) , ADN oncogénique	OUI	NON	OUI	€€€€€€
Cellules végétales en réacteur	Pas de risques théoriques	OUI	OUI parfois	OUI	€€€
Plantes entières	Pas de risques théoriques	OUI	Oui parfois	OUI si serres NON si plein champ	€

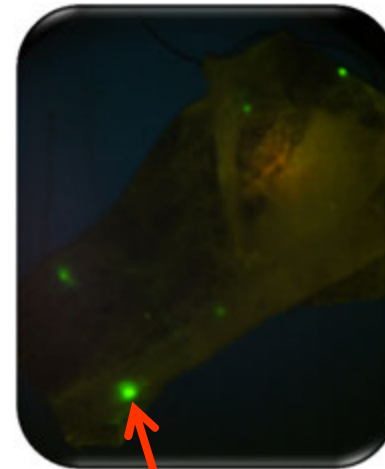
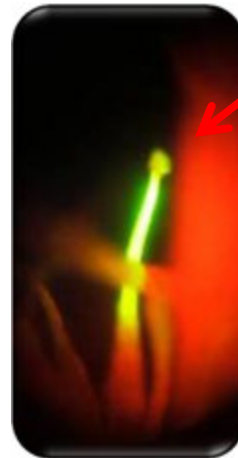
Drosera



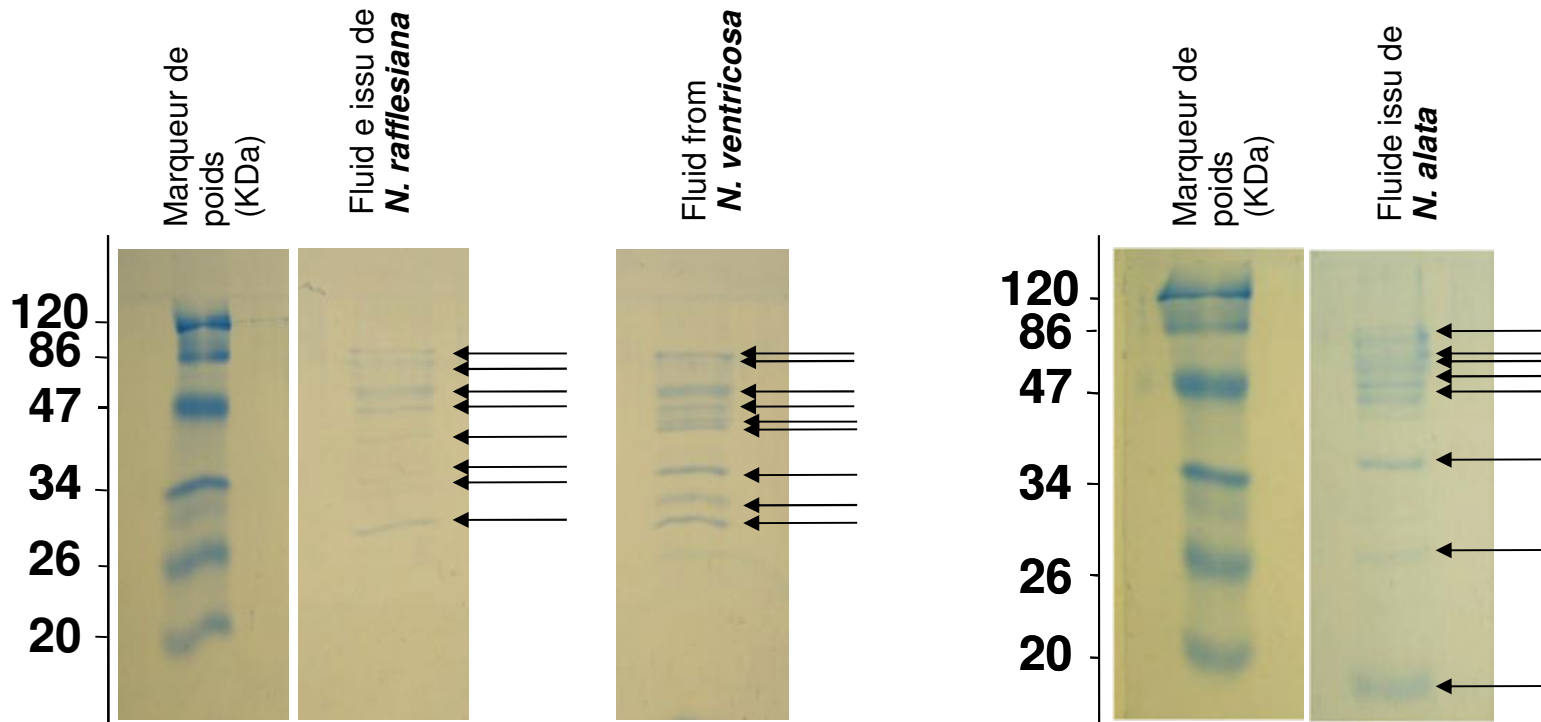
Gènes marqueurs
(GFP et GUS)

Expression de GFP

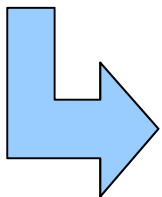
Trichome



Papier filtre avec des taches fluorescentes



SDS-Page sur des fluides de feuilles de Nepenthes pitcher



→ **PURIFICATION facilitée (sterilité possible)**



Et les protéases ?



► Zymogramme

- Gel + Gelatine + pH 3 / 5 / 7 à 37°C pendant 12H

