

# Expression de fragments scFv anti-cytokine par des vitroplants de tabac

P. Ehsani<sup>1</sup>    A. Jafari<sup>1</sup>    P. Lafaye<sup>2</sup>  
A. Meunier<sup>2</sup>    S. Dartevelle<sup>2</sup>    A. Nato<sup>3</sup>  
F. Nato<sup>2</sup>    J.-C. Mazie<sup>2</sup>  
I. Old<sup>2</sup>    G. Ducreux<sup>3</sup>

## Introduction

Les anticorps ou Immunoglobulines (Ig) sont des protéines synthétisées par l'organisme en réponse à la pénétration d'une molécule étrangère, un antigène, et capables de se fixer à ce dernier par une liaison spécifique. Les anticorps possèdent des domaines ayant des structures et des fonctions distinctes. Ce sont des molécules en forme de Y constituées de 2 chaînes lourdes H (Heavy chain) identiques et de 2 chaînes légères L (Light chain) identiques. Il existe 5 types principaux de chaînes lourdes ( $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ) composées de 450 à 600 acides aminés et le type définit la classe d'immunoglobuline. Les chaînes légères peuvent être de 2 types ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ) compo-

---

<sup>1</sup> Molecular Biology Unit, Institut Pasteur, avenue Pasteur, 13164 Téhéran, Iran.

<sup>2</sup> Laboratoire Ingénierie des anticorps, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, France.

<sup>3</sup> Laboratoire Morphogenèse végétale expérimentale, bât. 360, université Paris XI, 91405 Orsay cedex, France.

sées d'environ 230 acides aminés. Des ponts disulfures intra-chaînes stabilisent les différentes chaînes et d'autres inter-chaînes lient les chaînes L aux chaînes H ainsi que les 2 chaînes lourdes entre elles. Chaque chaîne est composée d'un domaine Variable (V) en séquence et responsable de la fixation avec l'antigène cible, et d'un ou plusieurs domaines relativement Constants (C) en séquence et responsable de la fixation des molécules effectrices. Les chaînes légères sont constituées d'un domaine V ( $V_L$ ) et d'un domaine C ( $C_L$ ) tandis que les chaînes lourdes comprennent un domaine V ( $V_H$ ) et 3 ou 4 domaines C ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ,  $C_{H4}$  et  $C_{H5}$ ). Dans chaque domaine V, existent trois régions dites hypervariables en séquence et responsables de la reconnaissance de l'antigène désignées sous le nom de CDR (Complementary Determining Region, « région de complémentarité ») séparées par des segments relativement conservés nommés « armature » (Framework). Les domaines  $C_{H2}$  contiennent un site de N-glycosylation et les domaines  $C_{H2}$  et  $C_{H3}$  contiennent des séquences intervenant dans le recrutement des cellules cytotoxiques et la fixation du complément (Padlan, 1994 ; Hayden *et al.*, 1997 ; Vaughan *et al.*, 1998 ; Liddell et Weeks, 1995).

Une immunoglobuline entière est théoriquement capable de fixer deux molécules d'antigène par l'intermédiaire des régions  $V_H$  et  $V_L$ . Par digestion enzymatique ou par génie génétique, il est possible d'obtenir des fragments bien déterminés de ces anticorps (Liddell et Weeks, 1995 ; Carter et Merchant, 1997). Les fragments  $F(ab')_2$ , obtenus par digestion enzymatique par la pepsine, ont généralement les mêmes propriétés que l'immunoglobuline entière, excepté les caractéristiques liées aux fragments Fc. Les fragments Fab, issus de la digestion enzymatique par la papaïne, sont relativement stables et leur affinité pour l'antigène est généralement équivalente à celle de l'immunoglobuline entière. Les fragments Fv, résultant de l'interaction d'un domaine  $V_H$  avec un domaine  $V_L$ , sont relativement instables dans la mesure où il existe une dissociation importante des deux chaînes. Les scFv sont les plus petites molécules capables de conserver une affinité proche de l'anticorps de départ. Un bras peptidique flexible artificiel maintient l'association des deux chaînes simulant ainsi la proximité des deux régions variables dans l'immunoglobuline naturelle (Padlan, 1994 ; Hayden *et al.*, 1997 ; Liddell et Weeks, 1995 ; Carter et Merchant, 1997).

De très nombreux gènes eucaryotes ont été exprimés chez *E. coli*. Seulement, le principal inconvénient de la bactérie, comme système de production de protéines hétérologues, réside dans son incapacité à réaliser de nombreuses maturations post-traductionnelles nécessaires à l'activité biologique de ces molécules. C'est la raison pour laquelle uniquement des fragments d'anticorps (Fab ou scFv) ont été produits dans *E. coli*. Compte tenu des limites et des risques de contamination des systèmes eucaryotes animaux (cellules CHO, le baculovirus...) par des virus ou prions pathogènes humains, les plantes transgéniques constituent un système alternatif à la production de protéines eucaryotes et notamment d'anticorps grâce au faible coût de production de la biomasse végétale, à une plus grande conformité de la protéine recombinée avec la molécule naturelle, l'existence d'infrastructures de récolte, stockage et d'extraction des molécules d'intérêt (Smith, 1996 ; Pen, 1996).

Plusieurs aspects, tels que le choix de la plante hôte et de l'organe végétal dans lequel l'expression protéique doit se faire, influencent les détails de la transformation végétale. De façon générale, la première étape consiste à adapter le gène humain ou son ADN complémentaire, codant l'anticorps, afin qu'il puisse s'exprimer dans la plante. Pour cela, le gène est lié à différentes séquences régulatrices d'ADN végétal, notamment un promoteur qui régule le niveau d'expression du gène dans la cellule (en général, le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV)) et un terminateur (en général, le terminateur CaMV 35S) qui permettent à la machinerie cellulaire de la plante hôte de reconnaître le gène introduit et de synthétiser l'anticorps recombiné correspondant (Chinn et Comai, 1996 ; Finnegan et McElroy, 1996 ; Gallie, 1998). Le gène chimère est ensuite inséré dans un vecteur bactérien pour qu'il soit multiplié par culture bactérienne. Le transgène est alors transféré dans les cellules végétales, par le biais de différentes techniques, soit par l'intermédiaire de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, soit par transfection biolistique (canon à particules), le choix dépendant de la plante hôte (Lindsey, 1996 ; Walkerpeach et Velten, 1994).

Les cellules végétales génétiquement transformées donnent alors naissance à des plantes entières qui se développeront dans des conditions de cultures sélectionnées et contrôlées. Les plantules, qui ont bien intégré le transgène, sont repérées et isolées à l'aide d'un

gène de résistance (le gène de résistance à la kanamycine, par exemple). La présence d'un gène rapporteur (en général, le gène de la luciférase, de la glucuronidase (GUS) ou de la  $\beta$ -galactosidase) permet la localisation du lieu de synthèse de l'anticorps, mais également le contrôle de l'expression du gène puisque l'introduction d'un gène au niveau du génome végétal n'assure pas sa transcription (existence de parties du génome non transcrites, efficacité du promoteur...) (Chinn et Comai, 1996).

Concernant les modifications post-traductionnelles indispensables à l'acquisition de l'activité biologique des protéines recombinées humaines, le contrôle de l'adressage des protéines vers les différents compartiments est essentiel. Le transport des protéines dans et à travers ces compartiments est déterminé par des informations contenues dans une séquence protéique, sous forme d'un peptide signal, par exemple KDEL, (normalement éliminé au cours du processus de maturation de la protéine), situé à l'extrémité N-terminale ou C-terminale de la chaîne polypeptidique, qui intervient sur les voies de maturation post-traductionnelles et peut être exploité dans le but d'obtenir une protéine possédant une conformation la plus proche possible de celle existant chez les mammifères. Seulement, de par la très grande diversité interspécifique des voies de glycosylation, les protéines glycosylées dans les cellules de levure, de plante ou d'insecte sont particulièrement immunogènes chez les mammifères (Smith, 1996 ; Pen, 1996 ; Conceição et Raikhel, 1996 ; Conrad et Fiedler, 1998 ; Chrispells et Faye, 1996 ; Chrispells et Faye, 1998).

Depuis l'anticorps monoclonal 6D4 qui fut le premier anticorps produit dans une plante, en l'occurrence le tabac (Hiatt *et al.*, 1989), de nombreux anticorps entiers et fragments d'anticorps ont ainsi été produits dans des plantes transgéniques, travaux qui ont permis d'apprécier les possibilités qu'offrent ce système au niveau des applications potentielles : la protection de la plante vis-à-vis d'un pathogène (Smith, 1996 ; Taviadoraki *et al.*, 1993 ; Franconi *et al.*, 1999), l'immunothérapie humaine (Smith, 1996 ; Ma *et al.*, 1995 ; Zeitlin *et al.*, 1998) avec notamment l'exemple de l'équipe de Ma et ses collaborateurs qui ont obtenu la production d'une IgA dimérique dirigée contre une protéine d'adhésion de *Streptococcus mutans* dans le tabac qui pourrait être utilisé en application locale pour prévenir les caries dentaires (Ma *et al.*, 1995).

Le but de notre travail est donc l'expression de fragments d'anticorps de type scFv anti-cytokine humaine, IL-4 ou IL-6, dans *Nicotiana tabacum cv Xanthi*. Les cytokines sont un groupe de molécules produites par les leucocytes et qui sont impliquées dans la transmission des signaux entre les cellules du système immunitaire. Elles se nomment interleukines (IL), interférons (INF), facteurs nécrosant les tumeurs (TFN) et facteurs stimulant les colonies (CSF) (Chomarat *et al.*, 1998 ; Hirano, 1998).

L'IL-4 est une interleukine définie principalement comme étant un facteur de prolifération des lymphocytes B. Cette molécule est apparemment sécrétée par un nombre peu important de cellules de type Th<sub>2</sub>. Les activités biologiques de l'IL-4 sont très nombreuses et variées en raison de nombreux récepteurs spécifiques sur presque tous les types cellulaires. L'IL-4 augmente le volume des cellules B au repos sans sécrétion d'ADN, induit ou modifie de façon importante la différenciation des lymphocytes B et affecte la nature des isotypes sécrétés. Elle inhibe également la prolifération des fibroblastes dans certaines conditions inflammatoires. Elle agit également sur les cellules épithéliales du thymus et parfois sur les hépatocytes. C'est une molécule qui intervient aussi dans des domaines pathologiques et de ce fait peut avoir une implication importante dans certains traitements comme les maladies inflammatoires avec un choc endotoxinique. Plus récemment, le rôle de l'IL-4 dans des processus allergiques a été mis en évidence d'où un caractère important dans le traitement de nombreuses infections (Chomarat *et al.*, 1998).

L'IL-6 est un médiateur du système immunitaire qui possède un large spectre d'activités biologiques. De nombreuses cellules sont capables de synthétiser l'IL-6 (macrophages, fibroblastes, cellules endothéliales, kératinocytes, mastocytes, cellules T et de nombreuses cellules tumorales). Des taux sériques ou plasmatiques élevés peuvent intervenir dans différentes maladies telles que les maladies auto-immunes, les lymphomes, le sida, différentes pathologies inflammatoires ou après un rejet de greffe (Hirano, 1998).

Ces fragments d'anticorps scFv anti-cytokine, IL-4 ou IL-6, exprimés dans *Nicotiana tabacum* seraient utilisés dans un test Elisa afin de déterminer la concentration en cytokines dans les fluides corporels pour le diagnostic de nombreuses pathologies humaines.

## Matériel et Méthodes

### Construction de la souche d'*Agrobacterium tumefaciens*

Les Anticorps monoclonaux anti-IL4 et anti-IL6 ont été produits dans le laboratoire d'Ingénierie des anticorps à l'Institut Pasteur de Paris, ainsi que les gènes codant pour les fragments scFv anti-cytokine (IL-4 ou IL-6). Ceux ci ont été clonés dans le plasmide pHEN1 permettant son expression chez *E. coli* (fig. 1). Puis, une digestion enzymatique du plasmide pHEN1 a abouti à la libération du gène codant pour le fragment scFv anti-cytokine.

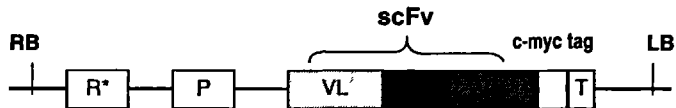


Figure 1

Schéma du T-DNA ayant reçu le gène correspondant au scFv anti-cytokine.

RB : Extrémité droite ; R° : Gène sélectif de résistance ;

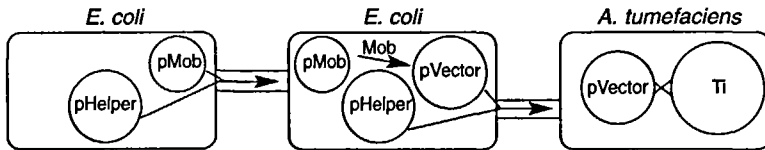
P : Promoteur ; scFv : Fragment variable simple chaîne ;

c-myc-tag : peptide tag ; T : Termineur ; LB : Extrémité gauche.

Ensuite, le vecteur d'expression végétale pGEJAE1, fourni par le laboratoire du Professeur Van Montagu (université de Gent, Belgique) (De Jaeger *et al.*, 1999), est également digéré par le même couple d'enzymes de restriction pour rendre possible l'insertion du gène codant pour le fragment scFv (fig. 1). Par électroporation, le plasmide est alors transféré dans une souche d'*E. coli*.

Puis, la transformation de la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif<sup>R</sup> (pGV2260) (Deblaere *et al.*, 1985) a été réalisée en utilisant la technique de conjugaison tri-parentale (fig. 2) (Walker-peach et Velten, 1994). Deux souches d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif<sup>R</sup> (pGV2260) recombinantes ont ainsi été réalisées, chacune possédant un gène codant pour un fragment scFv anti IL-4 ou

IL-6. Seulement, l'ADN transmis à la plante, ne comprenant ni de peptide signal dirigeant la production dans un organe particulier, ni de gène rapporteur permettant la localisation de l'expression du transgène au niveau de la plante entière, le criblage des plantes transformées sera donc nettement plus complexe.



■ Figure 2

La conjugaison tri-parentale (utilisant les fonctions *bom/mob*).

Une représentation schématique des interactions entre souches et plasmides lors de la conjugaison d'un plasmide dans *Agrobacterium* dans une conjugaison tri-parentale basée sur le système *bom/mob*.

Le plasmide « helper » (*pHelper*) et un plasmide *Mob* basé sur un *ColE1* (*pMob*) sont tout d'abord transférés dans une souche possédant le plasmide avec le gène d'intérêt (*pVector*), ce qui aboutit à l'obtention d'une souche d'*E. coli* avec trois plasmides (au centre).

Le plasmide helper peut maintenant mobiliser le *pVector* (en utilisant le produit *Mob* fournit en trans par *pMob*) vers *Agrobacterium tumefaciens*.

Le *pVector* sera stable à l'intérieur d'*Agrobacterium* uniquement en cas de recombinaison homologue avec des séquences contenues dans le plasmide *Ti* (Walkerpeach et Velten, 1994).

## Pré-culture de la souche d'*Agrobacterium tumefaciens*

Une pré-culture de la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* recombinante C58C1Rif<sup>R</sup> (pGV2260) dans 30 ml de milieu YEB additionné de rifampicine (100 µg.ml<sup>-1</sup>), de carbenicilline (100 µg.ml<sup>-1</sup>) et de spectinomycine (100 µg.ml<sup>-1</sup>) est réalisée pendant 48 heures à 28 °C sous agitation.

## Préparation des disques foliaires de tabac

Le tabac est très souvent utilisé pour tester la faisabilité de production d'une protéine recombinée humaine par une plante transgène.

nique, car sa transfection par des plasmides apportés par *Agrobacterium tumefaciens*, puis sa régénération, sont parfaitement maîtrisées (Horsch *et al.*, 1988). De plus, une quantité suffisante de biomasse de tabac transgénique, permettant de procéder rapidement aux vérifications de conformité de ladite protéine produite, peut être obtenue trois à quatre mois après la transformation.

Le matériel végétal utilisé est le tabac, *Nicotiana tabacum*, variété Xanthi, maintenu en culture *in vitro* sur milieu MS possédant des feuilles âgées de plus de 6 semaines. À partir d'une feuille bien verte de plus de cinq centimètres, des disques d'environ un centimètre de diamètre sont découpés à l'aide d'un emporte-pièce sur une feuille de papier filtre. Ensuite, les disques foliaires sont placés à raison de 7 par boîte, face inférieure de la feuille en contact avec le milieu de culture favorable à la caulogénèse MS<sub>C</sub> (MS avec 2 mg.l<sup>-1</sup> de BAP et 1 mg.l<sup>-1</sup> de Zéatine). Les boîtes de Petri sont enfin scellées avec du parafilm et placées pendant 48 heures dans une chambre de culture à 24 °C avec une photopériode de 16 heures à 2 000 lux.

### *Transformation végétale par Agrobacterium tumefaciens*

La culture d'*Agrobacterium tumefaciens* est placée dans un tube conique stérile de 50 ml pour permettre une centrifugation à 2 000 rpm pendant 30 minutes. Ensuite, le surnageant est éliminé et remplacé par un volume équivalent d'H<sub>2</sub>O distillée stérile.

La transformation végétale est réalisée par incubation de 60 secondes des disques foliaires de tabac dans la solution d'*Agrobacterium tumefaciens*. Un transfert des disques foliaires sur papier filtre stérile permet d'éliminer l'excédent de culture bactérienne. Puis, les disques foliaires sont replacés sur le milieu MS<sub>C</sub> de pré-culture et les boîtes de Petri scellées par du parafilm, l'infection d'*Agrobacterium tumefaciens* étant améliorée en milieu humide, et placées pendant 48 heures dans une chambre de culture à 24 °C avec une photopériode de 16 heures à 2 000 lux.



## *Sélection des transformants*

Deux jours après la transformation végétale, les disques foliaires sont transférés sur des boîtes de Petri contenant du milieu MS<sub>CA</sub> (MS<sub>C</sub> avec des antibiotiques : 200 mg.l<sup>-1</sup> de céfotaxine pour l'élimination d'*Agrobacterium tumefaciens* et 100 mg.l<sup>-1</sup> de kanamycine pour la sélection des plantes transformées). Les boîtes de Petri sont scellées et placées dans une chambre de culture à 24 °C avec une photopériode de 16 heures à 2 000 lux.

## *Régénération de la plante entière et micropropagation*

À partir du 30<sup>e</sup> jour environ, l'organogenèse somatique (production de bourgeons adventifs) fait son apparition sous la forme de pousses très vertes sur le pourtour des disques foliaires. Après quelques jours supplémentaires, les premières feuilles sont apparentes et les pousses les plus développées sont découpées à l'aide d'un scalpel et placées sur un milieu MS<sub>RA</sub> favorisant la rhizogenèse (MS avec 0,03 mg.l<sup>-1</sup> d'ANA et des antibiotiques : 200 mg.l<sup>-1</sup> de céfotaxine et 100 mg.l<sup>-1</sup> de kanamycine, pour conserver la pression de sélection).

Après une quinzaine de jours, la plante entière est régénérée. Vient alors la phase de micropropagation, nécessaire pour obtenir suffisamment de matériel végétal pour les différents tests. La multiplication végétative de la plante de tabac à partir de chaque entre-nœud repiqué sur un milieu MS<sub>A</sub> (MS avec des antibiotiques : 200 mg.l<sup>-1</sup> de céfotaxine et 100 mg.l<sup>-1</sup> de kanamycine, pour conserver la pression de sélection) permet de constituer un stock de vitroplants.

## *Extraction des protéines totales*

Les échantillons (feuilles ou racines débarrassées du milieu de culture) sont pesés et découpés avec un scalpel, dans un mortier refroidi à 4 °C. Puis, 10 ml d'azote liquide sont directement ajoutés pour briser les parois pectocellulosiques végétales. À l'aide du pilon, l'échantillon est réduit en fine poudre. Ensuite, le tampon d'extraction (Tris

0,1 M pH 8,  $MgCl_2$  10 mM, Dithiothréitol 5 mM, PMSF 0,2 mM) est ajouté en volume équivalent à la masse de l'échantillon et la solution verdâtre homogène, obtenue après quelques minutes supplémentaires de broyage, est transférée dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml. Une centrifugation de 30 minutes à 15 000 rpm permet d'obtenir une solution transparente sans débris végétaux, qui est congelée à  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .

## *Criblage des plantes transformées*

### **Par Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (Elisa)**

Un premier criblage est réalisé par test Elisa « sandwich » pour déterminer le nombre de plantes transformées qui produisent le fragment d'anticorps. Pour commencer, la microplaque est « coa-tée » pendant une nuit à  $4\text{ }^\circ\text{C}$  avec 100  $\mu\text{l}$  d'une solution d'anticorps monoclonal anti-cytokine humaine (anti-IL-4 (Boehringer) à 4  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ou anti-IL-6 (Pharmingen) à 2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  dans du PBS 1X). Après 6 lavages au PBS-Tween et saturation des puits avec du PGT pendant 30 minutes à  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 100  $\mu\text{l}$  d'interleukines (IL-4 ou IL-6 à 100  $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$  dans du PGT) sont ajoutés dans chaque puits pour 2 heures à  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Après 6 lavages au PBS-Tween, 100  $\mu\text{l}$  des différents extraits protéiques végétaux sont déposés dans les puits de la microplaque pour une incubation de 2 heures à  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Après 6 lavages au PBS-Tween, 100  $\mu\text{l}$  d'un anticorps polyclonal de lapin anti-*c-myc* (Santa Cruz Biotechnology) (0,2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  dans du PGT) sont ajoutés pour une heure à  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Après 6 nouveaux lavages au PBS-Tween, 100  $\mu\text{l}$  d'anticorps anti-Ig (H + L) de lapin couplés à la peroxydase (1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  dans du PGT) sont déposés pour une heure d'incubation à  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Après 6 lavages au PBS-Tween, le substrat de la peroxydase, l'OPD, permet enfin la révélation du test Elisa. Après l'addition de 50  $\mu\text{l}$  d'HCl 3 N pour stopper la réaction, la microplaque est lue à 405 nm par le spectromètre Dynatech MR5000 (Dynex).

### **Par Immuno-transfert (Western Blot)**

L'Immuno-transfert (Western-Blot) est utilisé après une électrophorèse SDS-Page à 15 %. Les protéines (entre 20 et 30  $\mu\text{g}$ ) sont ensuite transférées sur une membrane de type nitrocellulose.

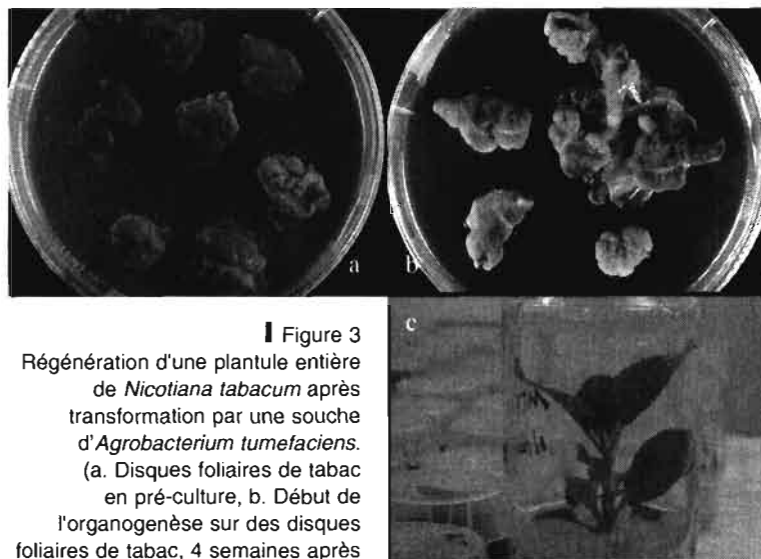
La membrane de nitrocellulose est alors saturée dans du PBS avec 3 % de BSA pendant une nuit. Puis, la membrane est mise en contact avec un anticorps monoclonal anti-c-myc (Santa Cruz Biotechnology) ( $0,2 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dans du T-TBS). La membrane est lavée 3 fois pendant 10 minutes dans du T-TBS. Des anticorps anti-Ig (H + L) couplés à la phosphatase alcaline ( $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dans du T-TBS), sont ajoutés et laissés une heure. Après 3 lavages de 10 minutes au T-TBS, le substrat, une solution de BCIP (5-Bromo-4-Chloro-IndolylPhosphate), est mis en contact avec la membrane de nitrocellulose afin de permettre la visualisation des fragments d'anticorps scFv anti-cytokine sous la forme d'une bande à environ 30 kDa.

## ■ Résultats

La transformation végétale par une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* recombinante a été réalisée pendant une minute sur des disques foliaires mis en pré-culture sur milieu  $\text{MS}_C$  deux jours auparavant (fig. 3) : 129 disques foliaires pour le scFv anti-IL-4, 122 disques foliaires pour le scFv anti-IL-6 et 24 disques foliaires pour le plasmide pGEJAE1. Celles-ci sont alors repiquées sur un milieu  $\text{MS}_{RA}$  favorisant la rhizogenèse et conservant la pression de sélection puis sur milieu  $\text{MS}_A$ . Après les différentes étapes de transformation, 68 plantules transformées « anti-IL-4 », 131 plantules « anti-IL-6 » et 2 plantules transformées « pGEJAE1 » ont été obtenues (fig. 3). Puis, ces plantules de *Nicotiana tabacum* ont été répliquées pour permettre leur sauvegarde mais également leur criblage en Elisa et en immuno-transfert.

### *Caractéristiques physiologiques des vitroplants transformés*

L'observation des vitroplants transformés obtenus montre une accélération de la sénescence foliaire et une dégradation des protéines (tabl. 1).



■ Figure 3  
Régénération d'une plantule entière de *Nicotiana tabacum* après transformation par une souche d'*Agrobacterium tumefaciens*. (a. Disques foliaires de tabac en pré-culture, b. Début de l'organogenèse sur des disques foliaires de tabac, 4 semaines après la transformation par *Agrobacterium tumefaciens*, c. Plantule de tabac régénérée à partir d'un disque foliaire, 8 semaines après la transformation par *Agrobacterium tumefaciens*).

	µg de protéines solubles totales/g de matière fraîche	Pourcentage de protéines solubles totales par comparaison avec la plantule non transformée
Plantule non transformée	3 800	100 %
Plantes IL-4 (5 clones)	1 970	52 %
Plantes IL-6 (5 clones)	2 080	55 %

■ Tableau 1  
quantification des protéines solubles totales de vitroplants de *Nicotiana tabacum* âgés de 45 jours.

En effet, il apparaît que la quantité de protéines solubles totales de vitroplants transformés est environ inférieure de moitié à celle d'une plantule non transformée.

De plus, les plantules de *Nicotiana tabacum* transformées, mises dans des conditions de culture *in vitro*, expriment une floraison

hâtive. Les plantes acclimatées dans les serres manifestent les mêmes comportements c'est-à-dire un vieillissement accéléré des feuilles et une floraison active, 3 semaines en serres contre 8 semaines pour la plante non transformée (fig. 4).

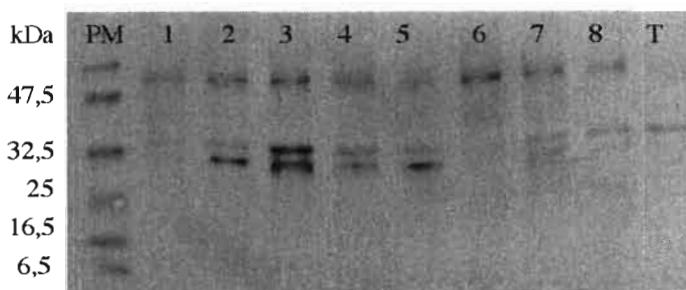


Figure 4  
Vieillissement accéléré des feuilles et floraison active.  
a- Vitroplant de tabac transformée.  
b- Plants de tabac transgéniques après 3 semaines en serre.

### *Caractérisation biochimique des transformants*

Le criblage des plantules transformées obtenues a été de deux types. Tout d'abord, un test Elisa a été mis au point de manière à détecter les scFv anti-cytokine humaine produits par les plantes de tabac. Ainsi, des tests Elisa réalisés sur 50 plantules, 25 plantules « anti-IL-4 » et 25 plantules « anti-IL-6 », ont permis de mettre en évidence la présence, dans cette population, de 2 plantules produisant l'anti-IL-4, soit 8 % et 19 plantules produisant l'anti-IL-6, soit 76 %. D'autres plantules de tabac expriment également le scFv anti-cytokine mais en plus faible proportion. Les plantules transformées par le plasmide pGEJAE1 vide ne produisent pas de fragment d'anticorps anti-cytokine.

Des immuno-transferts ont aussi été effectués sur 16 plantules de tabac, 8 plantules « anti-IL-6 » (1, 2, 3 et 4) et 8 plantules « anti-IL-4 » (5, 6, 7 et 8) (fig. 5). Pour ces plantules, l'immuno-transfert présente une double bande aux environs de 30 kDa, taille correspondant à celle du fragment d'anticorps de type scFv anti-cytokine humaine attendue, contrairement à la plantule de tabac non transformée qui n'en possède qu'une.



**Figure 5**  
Immuno-empreintes des extraits protéiques foliaires des différents clones de tabac. Les fragments scFv ont été détectés avec l'anticorps monoclonal anti-c-myc.  
T : Tabac non transformé ;  
1, 2, 3, et 4 : clones IL-6 ;  
5, 6, 7, et 8 : clones IL-4.

Sur toutes ces plantes, seuls les 8 clones (B, C, D, E, F, G, H, I) produisant la quantité la plus élevée de fragments d'anticorps anti-cytokine ont été conservés et multipliés par micropropagation, afin de pouvoir les étudier plus en détail (tabl. 2).

Afin de rechercher la localisation préférentielle des anticorps au sein de la plante entière, nous avons, sur les clones IL-6, comparé l'expression au niveau des feuilles et des racines. L'immuno-blot révèle bien une accumulation beaucoup plus importante des fragments d'anticorps de type anti IL-6 dans les racines que dans les feuilles (fig. 6).

N°	Clones	Clones IL-4	Clones IL-6	Quantité de protéines (mg.g <sup>-1</sup> de MF)
A	Témoin non transformé			3,8
B		138B		1,5
C		141B		1,93
D		141E		1,94
E		223G		2,49
F			103A	1,78
G			111B	2,8
H			122A	2,3
I			126A	1,45

Tableau 2  
Analyse des vitroplants de *Nicotiana tabacum* possédant le taux d'expression le plus élevé. Masse de matière fraîche (MF).



Figure 6  
Immuno-empreintes des extraits protéiques foliaires et racinaires des vitroplants de tabac transgéniques (3 clones anti IL-6). T : Tabac non transformé ; F : feuilles ; R : racines.

## Discussion et perspectives

Le nombre de plantules de tabac anti IL-4 est à peu près 10 fois moins important que celles produisant des anti IL-6. De plus, nous avons remarqué des différences morphologiques : une certaine fragilité, une coloration jaune des feuilles des plantules anti-IL-4.

Ainsi, ces observations laisseraient penser que le scFv anti-IL-4 pourrait se fixer à une ou plusieurs molécules végétales interférant alors sur le métabolisme général de la plante. Cette hypothèse semble corroborer le fait que le processus de floraison est hâtif chez les plantules de *Nicotiana tabacum* transformées.

Les tests Elisa ainsi que les immuno-transferts effectués démontrent que les fragments d'anticorps de type scFv anti-cytokine, IL-4 ou IL-6, sont dans une conformation correcte mais produits en faible proportion. Nos résultats encore préliminaires, utilisant par western blot une gamme étalon de scFv purifiés, semblent indiquer, que les anticorps produits par les plantes représentent à peu près 1 % des protéines solubles totales. Cette estimation est en accord avec les résultats déjà obtenus dans ce domaine par de nombreuses équipes, ayant estimé la quantité de molécules d'anticorps exprimées de l'ordre de 1 à 2 % (Conrad et Fiedler, 1998 ; Hiatt *et al.*, 1989 ; Ma *et al.*, 1995). En ce qui concerne nos résultats spécifiques sur les anticorps dirigés contre des cytokines, le fait d'avoir observé une forte accumulation dans les racines laisse présager un pourcentage d'expression dépassant les estimations précédemment citées.

De plus, nous sommes en train de réaliser la purification par chromatographie d'affinité des scFv anti-cytokine, IL-4 ou IL-6, présents dans les extraits végétaux. Ceci pourrait permettre d'étudier plus en détails la modulation des activités biologiques des interleukines par ces anticorps.

Dans le même temps, la réalisation d'une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* possédant un plasmide ayant intégré la séquence KDEL pourrait permettre d'augmenter de façon significative la production de scFv au niveau du cytosol des cellules végétales (Conceição et Raikhel, 1996 ; Conrad et Fiedler, 1998 ; Chrispells et Faye, 1996 ; Chrispells et Faye, 1998).

Enfin, deux autres espèces végétales sont en cours de transformation par les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* recombinantes : la pomme de terre, *Solanum tuberosum*, et l'aubergine, *Solanum melongena*, pour lesquelles la régénération d'une plante entière est plus longue que pour le tabac. Alors, une comparaison de la production de scFv anti-cytokine, IL-4 ou IL-6, entre ces différentes espèces pourrait s'avérer particulièrement intéressante.



### Remerciements

Nous sommes reconnaissants au professeur Marc Van Montagu et au docteur Ann Depicker de l'université de Gent (Belgique) de nous avoir fourni le vecteur de transformation végétale pGEJAE1.

## Bibliographie

- Carter P, Merchant M 1997 — Engineering antibodies for imaging and therapy. *Current Opinion in Biotechnology* 8 : 449-454.
- Chinn AM, Comai L 1996 — Gene transcription. *In* Transgenic plants : a production system for industrial and pharmaceutical proteins. Owen MRL and Pen J eds. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 27-48.
- Chomarat P, Rybak ME, Banchereau J 1998 — Interleukin-4. *In* The cytokine Handbook, 3<sup>rd</sup> ed. Thomson A ed., Academic Press Ltd, London, 133-174.
- Chrispells MJ, Faye L 1996 — The production of recombinant glycoproteins with defined non-immunogenic glycans. *In* Transgenic plants: a production system for industrial and pharmaceutical proteins. Owen MRL and Pen J eds. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 99-113.
- Chrispells MJ, Faye L 1998 — Rien ne sert de produire, il faut glycosyler. *Biofutur* 184 : 53-57.
- Conceição ADS, Raikhel NV 1996 — Accumulation of soluble proteins in the endomembrane system of plants. *In* Transgenic plants: a production system for industrial and pharmaceutical proteins. Owen MRL and Pen J eds. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 75-98.
- Conrad U, Fiedler U 1998 — Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Molecular Biology* 38 : 101-109.
- De Jaeger G, Buys D, Eeckhout D, De Wilde C, Jacobs A, Kapila J, Angenon G, Van Montagu M, Gerats T, Depicker A 1999 — High level accumulation of single-chain variable fragments in the cytosol of transgenic *Petunia hybrida*. *Eur. J. Biochem.* 259 : 426-434.
- Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J 1985 — Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucl. acids Res.* 13 : 4777-4788.
- Finnegan J, McElroy D 1996 — Transgene stability. *In* Transgenic plants: a production system for industrial and pharmaceutical proteins. Owen MRL and Pen J eds. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 168-186.

- Franconi R, Roggero P, Pirazzi P, Arias FJ, Desiderio A, Bitti O, Pashkoulov D, Mattei B, Bracci L, Masenga V, Milne RG, Benvenuto E 1999 —  
Functional expression in bacteria and plants of an scFv antibody fragment against tospoviruses. *Immunotechnology* 4 : 189-201.
- Gallie DR 1998 —  
Controlling gene expression in transgenics. *Current Opinion in Plant Biology* 1 : 166-172.
- Hayden MS, Gilliland LK, Ledbetter JA 1997 —  
Antibody engineering. *Current Opinion in Immunology* 9 : 201-212.
- Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K 1989 —  
Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342 : 76-78.
- Hirano T 1998 —  
Interleukin-6. *In* The cytokine Handbook, 3<sup>rd</sup> ed. Thomson A ed., Academic Press Ltd, London, 197-228.
- Horsch R, Fry J, Hoffmann N, Neidermeyer J, Rogers S, Fraley R 1988 —  
Leaf disc transformation. *In* Plant Molecular Biology Manual A5. Gelvin S and Schilperoort R eds. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1-23.
- Liddell E, Weeks I 1995 —  
Antibody production by chemical and genetic engineering. *In* Antibody Technology. Bios Scientific Publishers eds. Information Press Ltd, Oxford, 42-60.
- Lindsey K 1996 —  
Plant transformation systems. *In* Transgenic plants: a production system for industrial and pharmaceutical proteins. Owen MRL and Pen J eds. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 5-25.
- Ma JKC, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, Van Dolleweerd C, Mostov K, Lehner T 1995 —  
Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 268 : 716-719.
- Padlan ES 1994 —  
Anatomy of the antibody molecule. *Molecular Immunology* 31 : 169-217.
- Pen J 1996 —  
Comparison of host systems for the production of recombinant proteins. *In* Transgenic plants: a production system for industrial and pharmaceutical proteins. Owen MRL and Pen J eds. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 149-167.
- Smith MD 1996 —  
Antibody production in plants. *Biotechnology Advances* 14 : 267-281.
- Taviadoraki P, Benvenuto E, Trinca S, De Martinis D, Cattaneo A, Galeffi P 1993 —  
Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* 366 : 469-472.
- Vaughan TJ, Osboum JK, Tempest PR 1998 —  
Human antibodies by design. *Nature Biotechnology* 16 : 535-539.
- Walkerpeach CR, Velten J 1994 —  
*Agrobacterium*-mediated gene transfert to plant cells: cointegrate and binary vector systems. *Plant Molecular Biology Manual B1* : 1-19.
- Zeitlin L, Olmsted SS, Moench TR, Co MS, Martinell BJ, Paradkar VM, Russell DR, Queen C, Cone RA, Whaley KJ 1998 —  
A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plant for immunoprotection of the vagina against herpes. *Nature Biotechnology* 16 : 1361-1364.