



HAL
open science

Contrat INRA 2018 Prematuration “ Providefense ” Production de défensines aviaires recombinantes pour la santé animale

Anne-Christine Lalmanach, Lea Vidal, Catherine Schouler, Gwenaëlle
André-Leroux, Jean Marc Nicaud

► To cite this version:

Anne-Christine Lalmanach, Lea Vidal, Catherine Schouler, Gwenaëlle André-Leroux, Jean Marc Nicaud. Contrat INRA 2018 Prematuration “ Providefense ” Production de défensines aviaires recombinantes pour la santé animale. 8. Journées Annuelles du GDR 3625 MuFoPAM “MultiFonction des Peptides AntiMicrobiens”, GDR 3625 MuFoPAM, Oct 2021, Marseille, France. hal-03414767

HAL Id: hal-03414767

<https://hal.inrae.fr/hal-03414767>

Submitted on 4 Nov 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License



**Contrat INRA 2018 Prematuration
« Providefense »
Production de défensines aviaires
recombinantes pour la santé animale**

Anne-Christine Lalmanach,

UMR 1282 Infectiologie et Santé Publique

Centre INRAE Val de Loire, 37380 Nouzilly, France



➤ Introduction

- *Contexte socio-économique et de santé publique du projet*

Résistance aux antibiotiques problème de santé publique majeur

25 000 décès/an



Besoin d'alternatives aux antibiotiques en élevage



➤ Introduction

- *Contexte scientifique: peptides de défense de l'hôte (Gallus gallus)*

Arsenal antimicrobien de la poule: 14 AvBDs, 4 cathelicidins, 5 ovodefensins.

(Cuperus T. et al, Dev Comp Immunol, 2013)

Peptides amphiphiles : provoquent la rupture des membranes bactériennes.

Expression épithéliale des gènes AvBD1 and AvBD2 ➔ résistance / sensibilité à la colonisation intestinale de *Salmonella*.

(Sadeyen J.R. et al, Microbes & Infection, 2006; Derache C et al., Dev Comp Immunol, 2009)

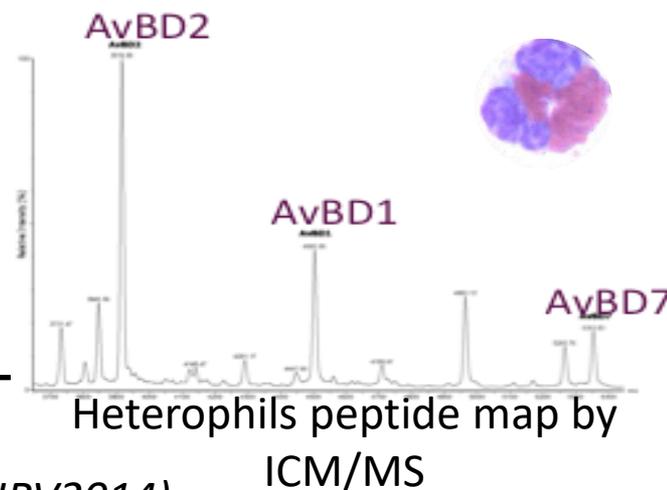
Peptides majeurs des granules des hétérophiles : ➔

Moelle osseuse, site de la granulopoïèse :

➤ **Extraction, purification et analyse par MS de l'AvBD1, de l'AvBD2 et de l'AvBD7.**

➤ **Spectre d'activité large: anti-Gram+ et anti-Gram- (*S. Typhimurium* LT2 MDR) à CMI de l'ordre du μM .**

(Derache C. et al, Antimicrob Agents & Chemother, 2009; DIRV2014)



➤ Introduction

- *Contexte scientifique: structure et activité bio des AvBDs*

Résolution de la structure 3D (Spectrométrie RMN) :

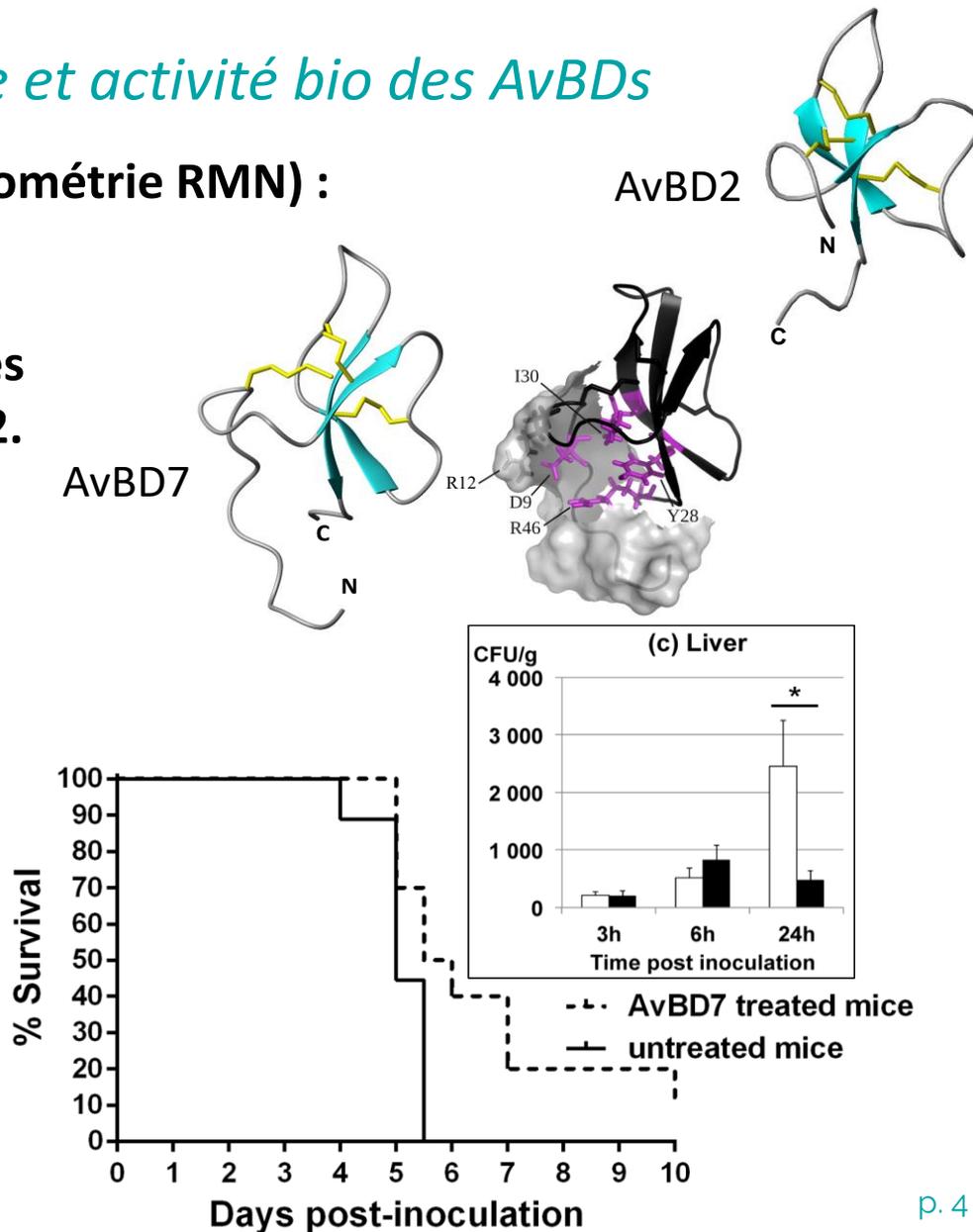
(Derache C. et al, J Biol Chem, 2012)

Forte résistance à la protéolyse par les enzymes intestinales : AvBD7>AvBD2.

(Bailleul G. et al, PLOS One, 2016)

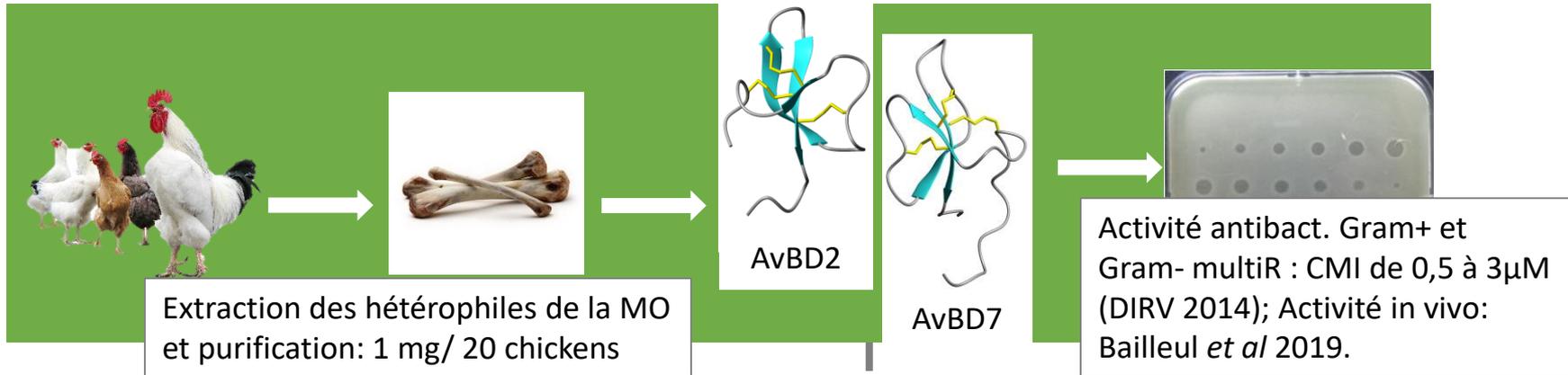
Administration *in vivo* de l'AvBD7 : réduit la salmonellose systémique létale chez la souris.

(Bailleul G. et al, Front Microbiol, 2019)



➤ Introduction

• Rationnel du projet Providefense

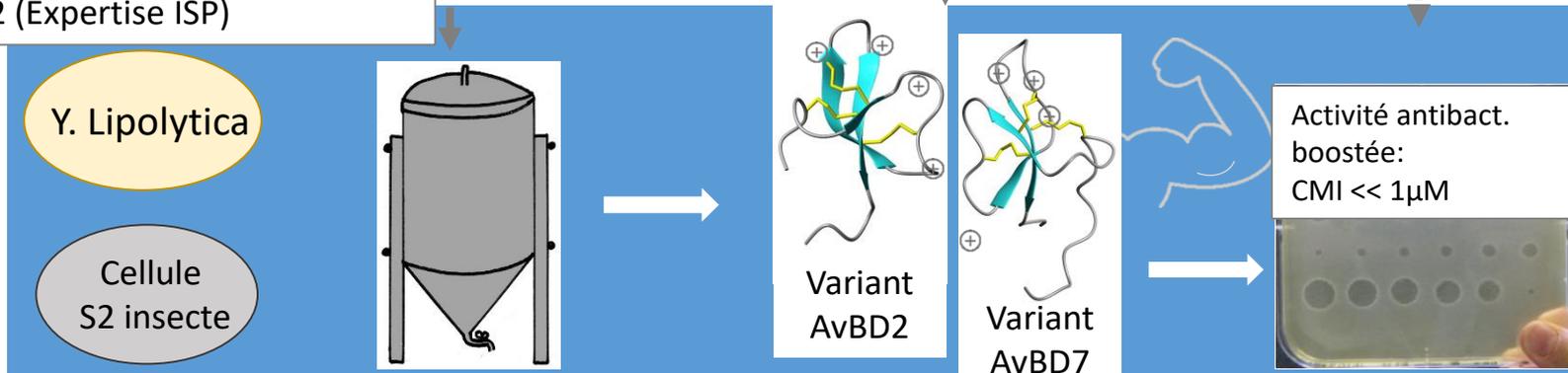


• Objectifs du projet

Production recombinante industrialisable avec levure *Yarrowia lipolytica* (Expertise Micalis)
Cellule S2 (Expertise ISP)

Design bioinformatique de variants (Expertise MaIAGE)

Amélioration de l'efficacité in vitro et in vivo (expertise ISP)



➤ Introduction

• Description du projet : lots de travail/Durée

Lot de travail	Intitulé et nature des livrables	Date de fourniture
WP1 Systèmes d'expression	Rapport d'expression d'AvBD2 et d'AvBD7 recombinantes sauvages chez <i>Y. lipolytica</i> (Partenaire 2).	T0 + 12 mois
	Rapport d'expression d'AvBD2 et d'AvBD7 recombinantes sauvages chez cellules S2 (Partenaire 1).	T0 + 12 mois
	Rapport d'expression d'AvBD2 et d'AvBD7 recombinantes mutées chez <i>Y. lipolytica</i> ou S2 (Partenaire 2 ou 1, et 3).	T0 + 16 mois
WP2 Echelle de production	Spectres de masse des AvBDs purifiées (Partenaire 1 ou 2)	T0 + 18 mois
	Rendements en AvBDs naturelles et recombinantes (Partenaire 1)	T0 + 18 mois
WP3 Activités antimicrobienne	Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des AvBDs naturelles et recombinantes (Partenaire 1)	T0 + 24 mois
	Taux de survie d'embryons infectés par APEC et traités ou non par AvBDs naturelles et recombinantes (Partenaire 1).	T0 + 24 mois

➔ Go/No Go



➤ Introduction

• Analyse du projet et résultat de l'appel d'offre INRA DPTI 2018

❖ Forces

Large spectre → incluant pathogènes zoonotiques .

Stabilité : résistance à la protéolyse.

Activité ne nécessitant pas de cible moléculaire.

Pas de toxicité cellulaire aux concentrations anti-bactériennes.

Efficacité *in vivo* validée pour l'AvBD7.

❖ Faiblesses

Pas de mode de production transférable à l'échelle industrielle.

Pas de brevet sur l'activité anti-bactérienne des AvBDs (créer de la propriété intellectuelle/variants).

❖ Menaces

Risque d'induction de résistances bactériennes (moindre/ATB).

Risque d'échec de production dans les deux systèmes recombinants.

❖ Opportunités

Forte demande de l'élevage et des gestionnaires de santé.

Intérêt d'industriel pour ces molécules.



**Financement sur 18 mois jusqu'à l'étape limitante (50 k€ total):
Preuve de production à l'échelle industrielle de molécules actives.**

➤ Design de variants d'AvBD2 et d'AvBD7

- **Analyse bioinformatique** de la séquence et de la conformation des défensines
➡ Identification d'acides aminés hautement conservés (structure 3D)
- **Modélisation** des acides aminés substituables pour augmenter le caractère amphiphile:

```
/2lg5/A/A/1 6 11 16 21 26 31 36  
LFCCKGGSCHFGGCPSHLIKVGSFCGFRSCCKWPWNR
```

Conservation color code

100% Strictly conserved

80-90% Highly conserved

70 % Conserved

Variants AvBD2 proposés:

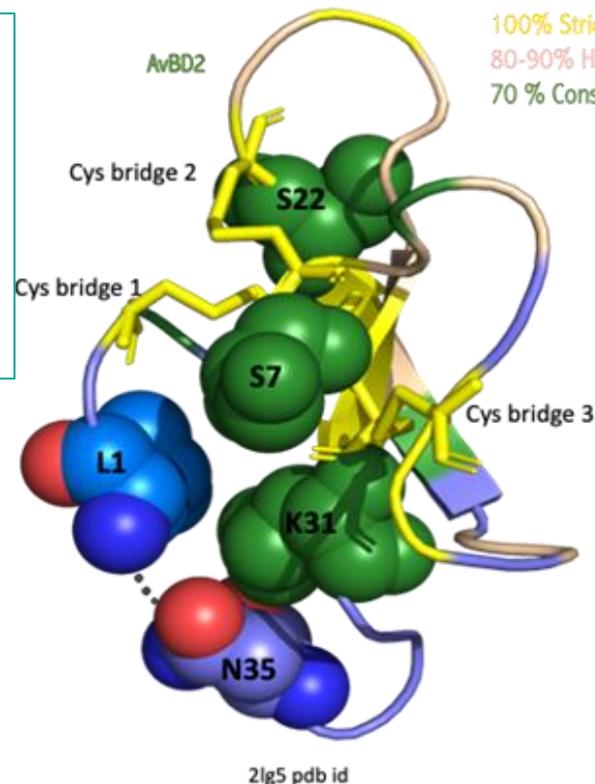
L1F/K31R/N35D

L1F/N35D

K31R

S7D

S22R



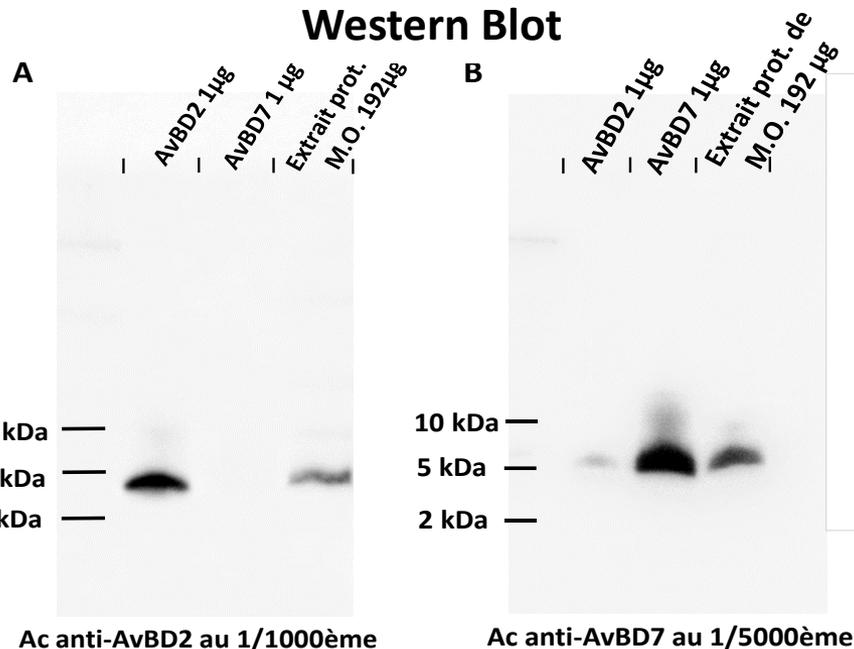
Pour AvBD7 :

Aucun variant proposé sans risque pour l'intégrité moléculaire et fonctionnelle
Séquence et structure apparemment optimisées *in natura*.

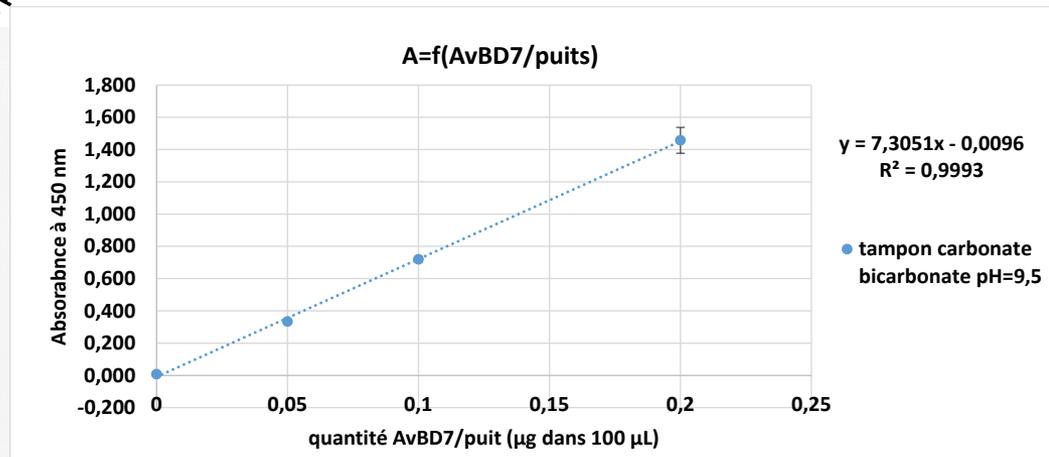
➤ Production en cellules d'insecte (Schneider 2)

- **Constructions** de plasmide pMT-PURO recombinant (RIKEN BRC, Japan) avec insert gène synthétique AvBD2 ou AvBD7 (Genscript); **Clonage**, vérification des séquences; **Transformations** de cellules S2; **Culture sélective et induction**, selon les recommandations du fournisseur.
- **Préparation d'Ac polyclonaux anti-AvBD2 et anti-AvBD7** (anti-peptides naturels).

Western Blot



ELISA



- **Analyse des surnageants de culture** : aucun peptide détecté par WB (seuil à 25µg/mL) ni par ELISA (seuil à 0,25µg/mL).

➤ Production en levures (*Yarrowia lipolytica*, Yl)

- **Constructions gènes synthétiques** optimisés pour production de protéines hétérologues AvBD2 ou AvBD7 par Yl:

- Options** promoteur fort constitutif (pTEF) ou promoteur hybride et inducible pEYK(300)5AB; Brevet INRAE).
- Options** 7 séquences d'adressage différentes : peptides signaux SP1, SP3 et SP4 (Celinska et al, 2018); SSL1, SSL2 et SSLP (Lip2 native); ProWT (AvBD2 ou AvBD7).
- Options** ajout d'une protéine chaperonne PDI de Yl (aide/ repliement et sécrétion)

- **Clonage et vérification des séquences. Transformation des levures, culture en flasque, induction et collecte des surnageants.**

- **Analyse par ELISA :**

Surnageant du clone 13B (pEYK(300)5AB + SSLP) : **0,39 µg/mL d'AvBD7**

Surnageant du clone 13B + chaperonne : **1,27 µg/mL d'AvBD7**

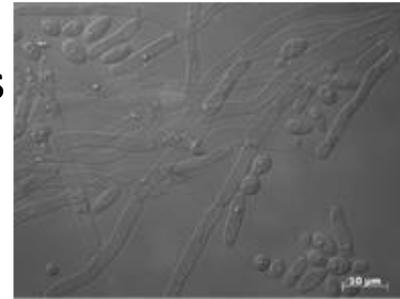


➤ Production en levures (*Yarrowia lipolytica*, Yl)

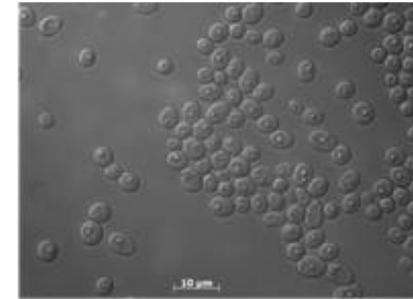
- Essai à grande échelle (fermenteurs de 50L, NewMilkLab, Belgique)

- Problème de filamentation des levures

➡ KO (CRISPR-Cas9) du gène *MHY1*,
responsable de la filamentation

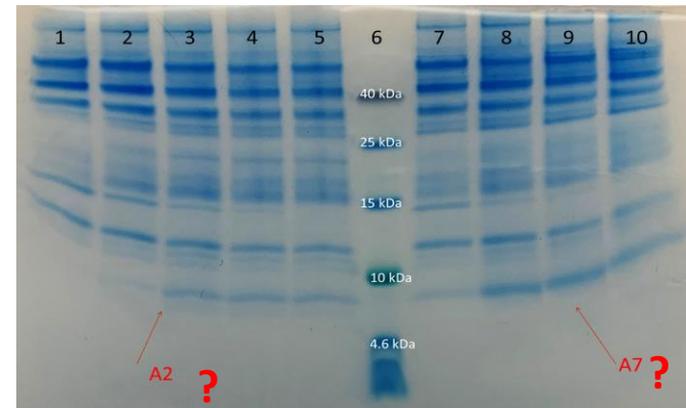


JMY7126 Fila+



JMY7126 Fila- (JMY8647)

- Analyse en SDS-PAGE des surnageants (gel d'acrylamide à 16% en tricine)



Masses apparentes plus élevées
que celles attendues?

(3,9 kDa pour AvBD2 et 5,3 kDa pour AvBD7)

➤ Production en levures (*Yarrowia lipolytica*, YI)

- **Analyse par ELISA** des surnageants de culture industrielle.

Gamme en milieu alcalinisé					
AvBD2/puits (µg)		0,1	0,05	0,025	0,0125
moyenne DO		1,318	0,939	0,458	0,344
écart moyen		0,01305118	0,05150728	0,0406735	0,00818535
moyenne DO échantillon (au 1/10 ^{ème})			0,817	µg/puits	0,51505565
écart moyen			0,05150557		
[AvBD2] en µg/mL					3,43370092

➔ Production d'AvBD2 à 3,43 µg/mL ou d'AvBD7 à 3,12 µg/mL
 Concentration incompatible avec un test d'activité (CMI à 3-5 µg/mL)
 Concentration multipliée par 9 / clone producteur initial.

➔ Rendement de l'ordre de 150 mg/ fermenteur 50L

➤ Conclusions / système d'expression hétérologue chez *Y. lipolytica*

- ✓ Développement d'un procédé industriel de production de protéines hétérologues « à façon », basé sur des souches châssis plus performantes avec promoteurs hybrides inductibles par l'erythritol (brevet INRAE du 18 Mai 2017 sous le N° EP17305575.7).
- ✓ Identification de séquences de "peptide signal" permettant une production efficace des protéines hétérologues.
- ✓ Identification de chaperonne et modification génétique (abolition de la filamentation) permettant une production améliorée de protéines hétérologues chez cette levure en conditions de fermentation industrielle.
- ✓ Caractérisation du sécrétome de *Y. lipolytica* en conditions de fermentation industrielle.



➤ Conclusions – Perspectives / AvBDs

- ✓ Produire les défensines aviaires par *Yarrowia* et développer des outils de mesure (Ac anti-AvBD2 et anti-AvBD7 disponibles).
- ✓ Augmenter le niveau de production par ajout de la protéine chaperonne et par montée en échelle de production (X9).
- ✓ Identifier des acides aminés potentiellement cibles de mutations visant à augmenter l'activité antimicrobienne d'AvBD2.

Constat 1: Production industrielle inappropriée pour tester l'activité des AvBDs.

👉 Développer un protocole de purification des défensines.

Constat 2: Production naturelle, par les granulocytes hétérophiles, difficile à transposer en système hétérologue.

👉 Levier d'intervention possible par amplification de la production *in vivo* des défensines pour faire barrière aux infections: stimulation de l'animal hôte par additifs alimentaires ...



REMERCIEMENTS

DPTI INRAE, financement du projet

F Wacquet; P Lénée; JM Chardigny

Collègues UMR ISP INRAE, Centre Val de Loire:

Equipe IBIR: C Gitton et F Gilbert

Equipe PCA: A Trotereau, N Lallier, B Fradet et C Schouler

Collègues partenaires INRAE, Centre de Jouy en Josas:

Equipe StatInfOmics, UR INRAE MaIAGE: G André-Leroux

Equipe BimLIP, UMR INRAE MICALIS : L Vidal et JM Nicaud



Merci pour votre attention



INRAE

Journées GDR MuFoPAM, Marseille, 28-29 Octobre 2021

Production de PAMs/ Anne-Christine Lalmanach