



HAL
open science

Systèmes d'Expression pour la Production de Protéines Hétérologues :Notions Générales / un Exemple de Valorisation à l'INRA

Catherine Madzak

► **To cite this version:**

Catherine Madzak. Systèmes d'Expression pour la Production de Protéines Hétérologues :Notions Générales / un Exemple de Valorisation à l'INRA. École d'ingénieur. AgroParisTech, Module UC1 : Bioingénierie des Protéines et Applications Industrielles, France. 2022. hal-04183198

HAL Id: hal-04183198

<https://hal.inrae.fr/hal-04183198v1>

Submitted on 18 Aug 2023

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.

- Systèmes d'Expression pour la Production de Protéines Hétérologues :
- Notions Générales / un Exemple de Valorisation à l'INRA

Dr Catherine MADZAK, CRHC, HDR

UMR782 SayFood (Paris-Saclay Food and Bioproduct Engineering research unit)

Equipe de Recherche CoMiAl

Bât E, campus Agro Paris-Saclay, Palaiseau



Systemes d'expression pour proteines heterologues

› Notions generales

- Pourquoi produire une proteine en systeme d'expression heterologue ?
- Rappel : degeneration du code genetique
- Rappels : code genetique, traduction et synthese des proteines
- Biais de codon et efficacite de traduction
- Voies de secretion des proteines chez les eucaryotes
- Modifications post-traductionnelles des proteines eucaryotes : N-glycosylation
- Différents systemes d'expression : avantages / inconvenients

› Un exemple de valorisation à l'INRA

➤ Notions générales

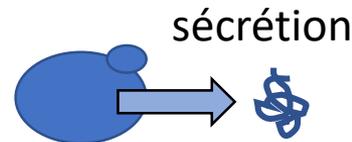
- Pourquoi un système d'expression hétérologue ?

- **Hétérologue** : gène et système d'expression (hôte) proviennent d'espèces différentes
 - soit proches / ex : invertase de *Saccharomyces cerevisiae* produite chez *Y. lipolytica*
 - soit éloignées / ex : chymosine bovine produite chez *Escherichia coli*
- Pourquoi ne pas **purifier** la protéine d'intérêt à partir de l'espèce productrice naturelle ?
 - problèmes de difficulté technique, de coût, d'approvisionnement ou d'éthique
 - besoin d'efficacité (surexpression du gène, "scale up" production industrielle)
 - risque sanitaire de contamination du produit (toxines, virus, prions) / ex : hormone de croissance isolée d'hypophyses humaines -> contamination prions -> Creutzfeldt-Jakob
- Microorganismes cultivables : pourquoi pas **surexpression** dans la même espèce ?
 - pas de système d'expression (efficace) chez l'espèce d'intérêt
 - difficultés de purification (isoformes d'enzyme, autres enzymes même activité)
 - préférence système **GRAS** "Generally Recognized As Safe" (classification des procédés par la FDA, Food & Drugs Administration, USA)



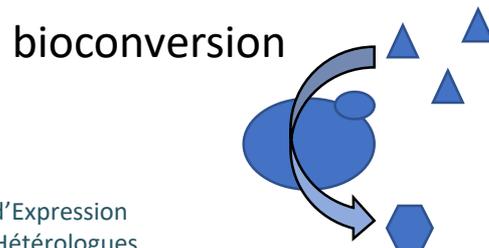
➤ Notions générales • Pourquoi un système d'expression hétérologue ?

- Protéines d'intérêt pour divers types d'applications :
 - **industrielles** / ex : laccases pour décoloration des jeans
 - **agro-alimentaires** / ex : chymosine pour fabrication fromages
 - **thérapeutiques** / ex : antigènes viraux pour vaccins, anticorps monoclonaux (cancers)
- Hôte d'intérêt pour 2 principaux types d'applications :
 - **plateforme de production** de protéines hétérologues / ex : levure *Pichia pastoris*



Mattanovich et al. **2012** *Methods Mol Biol* **824** 329-58
Recombinant protein production in yeasts
Ahmad et al. **2014** *Appl Microbiol Biotechnol* **98**(12) 5301-17
Protein expression in Pichia pastoris: recent achievements and perspectives for heterologous protein production

- **ingénierie du métabolisme** pour utilisation comme usine cellulaire ("cell factory") / ex : *Y. lipolytica* génétiquement modifiée pour la production de lipides (SCO "single cell oil") enrichis en ω -3, pour applications agro-alimentaires, par Dupont (USA)



Xie et al. **2015** *Appl Microbiol Biotechnol* **99** 1599–1610
Sustainable source of omega-3 eicosapentaenoic acid from metabolically engineered Yarrowia lipolytica: from fundamental research to commercial production

➤ Notions générales

- Rappel : dégénérescence du code génétique

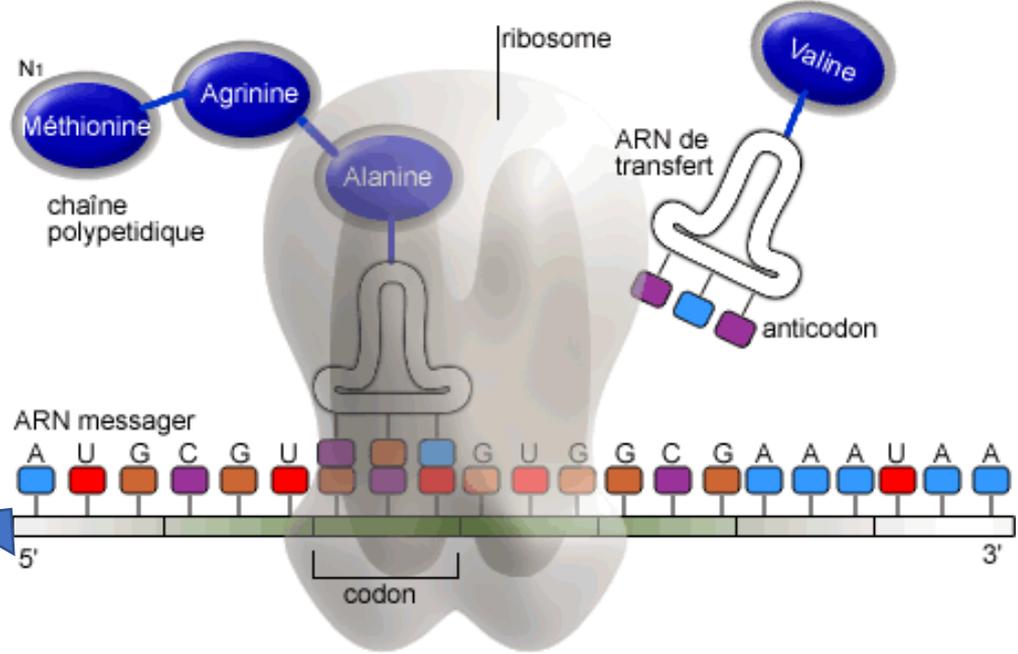
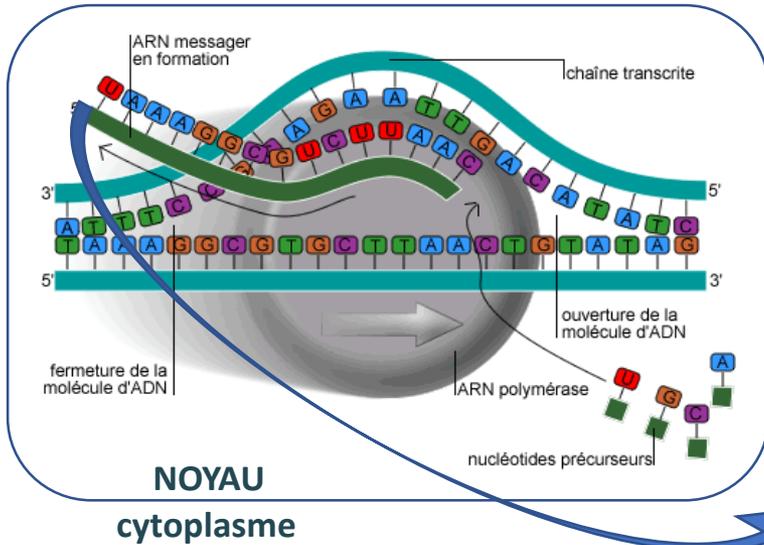
- **Code génétique** standard pratiquement universel (archées, eubactéries, eucaryotes) mais... quelques exceptions :
 - CUG = Ser (au lieu Leu) chez les levures du genre Candida (**clade CTG**)
 - certaines algues vertes et certains ciliés utilisent 1 ou 2 **codons stop** pour encoder un acide aminé
 - --> problème en **expression hétérologue**
- $4^3 = 64$ codons possibles :
 - 61 codant un acide aminé
 - + 3 codons stop (sans ARNt correspondant)
- 20 acides aminés, constituants des protéines, à encoder
- -> **code dégénéré/redondant** : plusieurs codons possibles pour chaque acide aminé

AAA Lys	ACA Thr	AGA Arg	AUA Ile
AAC Asn	ACC Thr	AGC Ser	AUC Ile
AAG Lys	ACG Thr	AGG Arg	AUG Met
AAU Asn	ACU Thr	AGU Ser	AUU Ile
CAA Gln	CCA Pro	CGA Arg	CUA Leu
CAC His	CCC Pro	CGC Arg	CUC Leu
CAG Gln	CCG Pro	CGG Arg	CUG Leu
CAU His	CCU Pro	CGU Arg	CUU Leu
GAA Glu	GCA Ala	GGA Gly	GUA Val
GAC Asp	GCC Ala	GGC Gly	GUC Val
GAG Glu	GCG Ala	GGG Gly	GUG Val
GAU Asp	GCU Ala	GGU Gly	GUU Val
UAA stop	UCA Ser	UGA stop	UUA Leu
UAC Tyr	UCC Ser	UGC Cys	UUC Phe
UAG stop	UCG Ser	UGG Trp	UUG Leu
UAU Tyr	UCU Ser	UGU Cys	UUU Phe

1 codon	2 codons	3 codons	4 codons	6 codons
Met (Initiation) Trp	Lys - Asn - Gln His - Glu - Asp Tyr - Cys - Phe	Ile - STOP	Thr - Pro - Ala Gly - Val	Arg - Ser - Leu

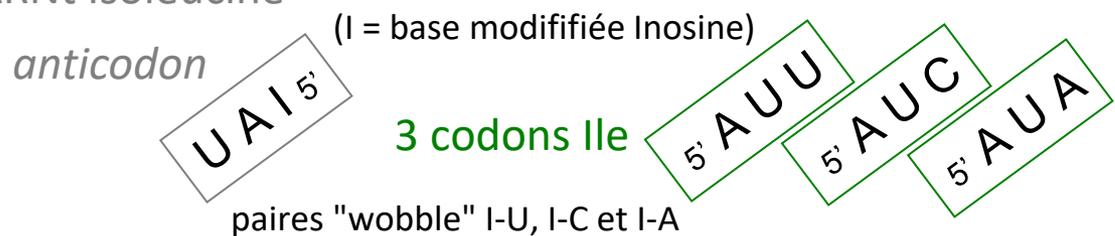
➤ Notions générales

- Rappels : code génétique
- traduction et synthèse des protéines



- Lors de la **traduction**, l'interaction de l'**anticodon de l'ARNt** avec la **troisième base du codon** est souvent un appariement non-canonique ("**wobble pairing**") différent du Watson-Crick classique (A-U ou G-C). Ces appariements "wobble" (bancals) permettent de réduire le nombre d'ARNt nécessaires à la traduction du code : lecture de différent codons synonymes par un seul ARNt (Crick 1966)

ex. chez la souris : 1 ARNt Isoleucine



➤ Notions générales

- Rappel : traduction et synthèse des protéines
 - Biais de codon et efficacité de traduction
-
- Selon les espèces :
 - différents **ARNt** (anticodons) pour traduire (fixer, incorporer) un acide aminé donné
 - différents **niveaux d'expression** de chacun de ces ARNt
 - efficacité variable de "**wobble pairing**" avec les différents codons pour un même a. a.
 - -> rôle dans l'**efficacité de la traduction**, avec risque de terminaison prématurée
 - L'efficacité de la traduction en protéine dépendra donc notamment du **biais d'usage** des codons utilisés dans la séquence nucléotidique d'un gène donné
 - Ce biais de codon est une conséquence de la dégénérescence du code génétique : chaque organisme a des "préférences" dans le "choix" des codons synonymes
 - **Biais de codon** : différentes fréquences d'usage de chaque codon dans l'ADN
 - selon l'espèce (reflet de la proximité phylogénétique)
 - selon le type de génome (nucléaire, mitochondrial, chloroplastique)
 - selon la région génique et même le gène considéré (**lié au niveau d'expression**)



> Notions générales

- Biais de codon et efficacité de traduction

- Gène fortement exprimé : codons à fréquence d'usage élevée dans cette espèce
- Rôle important du **biais de codon** pour l'**efficacité de traduction d'un ARNm** hétérologue
 - analyse de la **séquence** d'un gène donné (ex : humain) par rapport au **biais d'usage** de codon de l'organisme hôte (ex : *E. coli*, levure) pour un projet d'expression hétérologue
 - définition d'un **facteur d'adaptation**
 - **prédiction** d'une efficacité de traduction

 **g**raphical

 **c**odon

 **u**sage

 **a**nalyser <http://gcua.schoedl.de/>

- **Biais de codon inadapté** (ex : codons Arg) :

codons Arg	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>
AGA	2,3%	48,1%	21,5%
AGG	2,7%	20,9%	21,2%
CGA	7,4%	6,8%	10,9%
CGC	44,5%	5,9%	18,3%
CGG	7,0%	3,9%	20,1%
CGT	36,1%	14,5%	7,9%

Codon Usage Database <http://www.kazusa.or.jp/codon/>

- **mutagénèse** dirigée de quelques codons
- **gène synthétique** optimisé pour le biais de codon du système d'expression utilisé
- chez *E. coli* : souches "**Rosetta**" exprimant ARNt rares : **AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA**



INRAE

Systèmes d'Expression
Protéines Hétérologues
C. Madzak



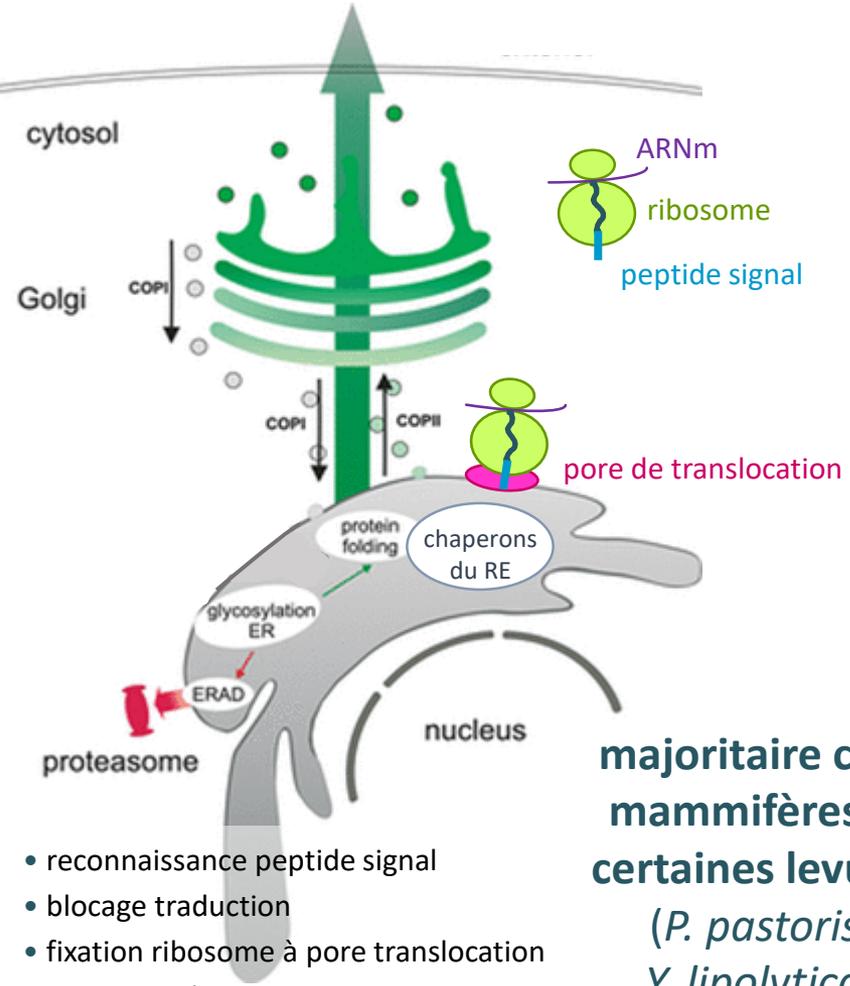
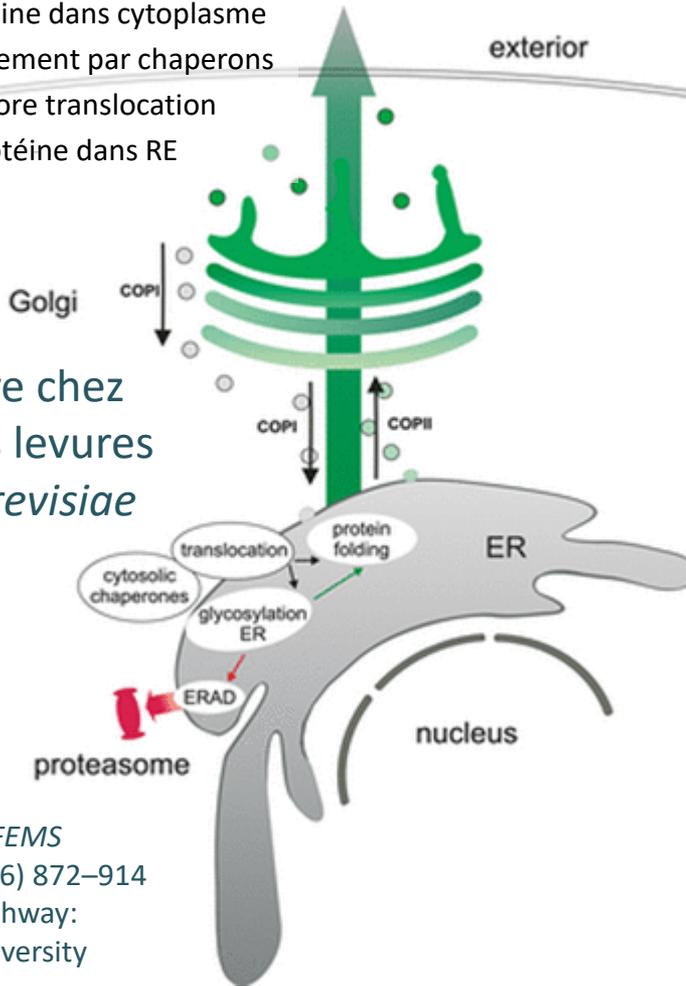
Rosetta host strains are BL21 derivatives designed to enhance the expression of eukaryotic proteins that contain codons rarely used in *E. coli*

➤ Notions générales

• Voies de sécrétion des protéines eucaryotes

▪ Voie **post-traductionnelle** de sécrétion *versus* Voie **co-traductionnelle** de sécrétion

- synthèse protéine dans cytoplasme
- maintien dépliement par chaperons
- transfert par pore translocation
- repliement protéine dans RE



majoritaire chez
plupart des levures
dont *S. cerevisiae*

majoritaire chez
mammifères et
certaines levures
(*P. pastoris*,
Y. lipolytica)

- reconnaissance peptide signal
- blocage traduction
- fixation ribosome à pore translocation
- reprise traduction
- synthèse/repliement simultanés dans RE (aide chaperons)
- **production + efficace protéines complexes**

d'après
Delic *et al.* **2013** *FEMS
Microbiol Rev* **37**(6) 872–914
The secretory pathway:
exploring yeast diversity

INRAE

Systèmes d'Expression
Protéines Hétérologues
C. Madzak

➤ Notions générales

- Modifications post-traductionnelles

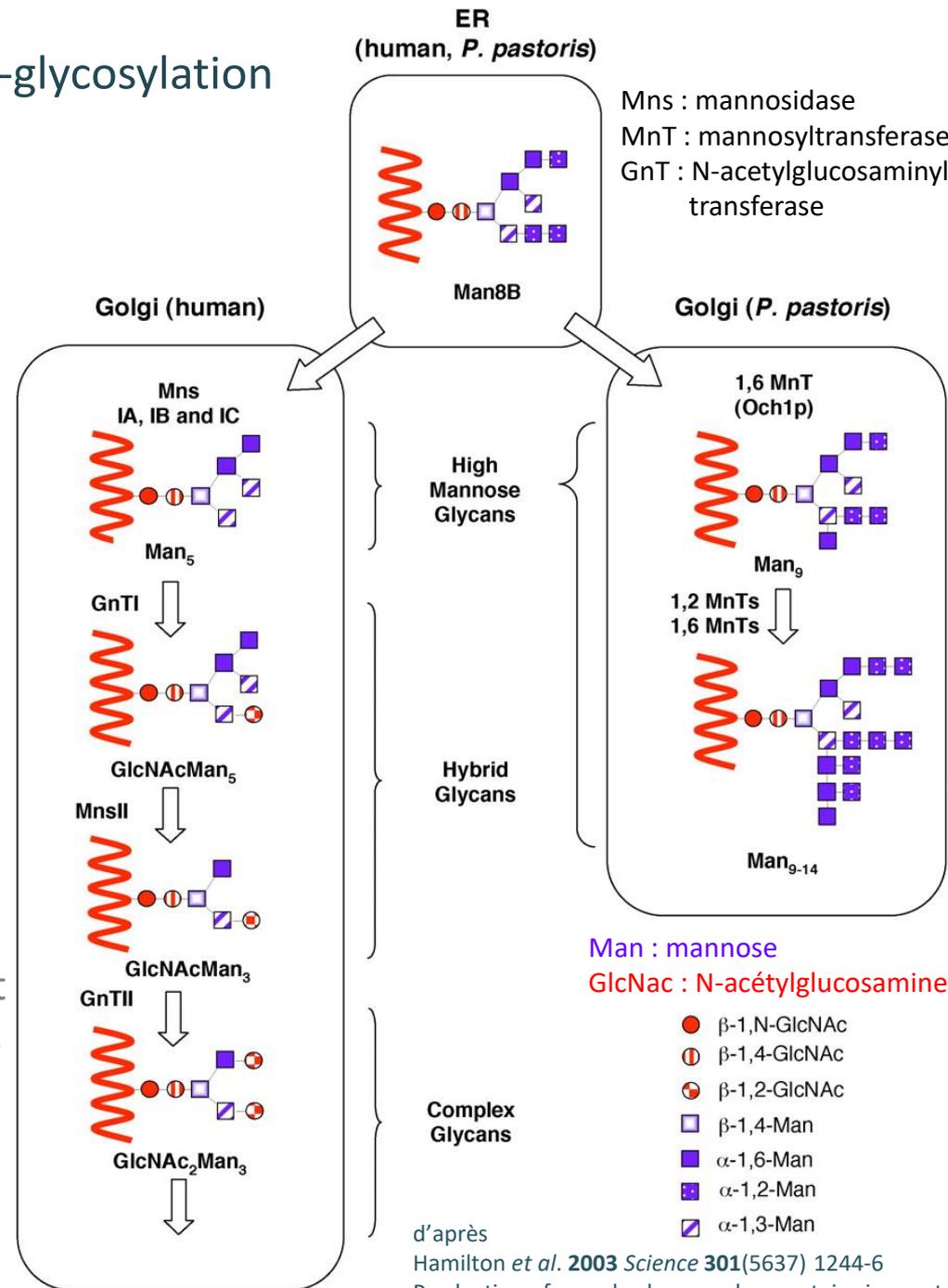
- **Maturation** : coupure du peptide signal par endopeptidase (Procaryotes et Eucaryotes)
- Formation de **ponts disulfure** : Cys-S-S-Cys (RE des Eucaryotes)
 - dans structure tertiaire : stabilisation du repliement de la protéine
 - dans structure quaternaire : association de sous-unités protéiques (ex : anticorps)
- **Phosphorylation** : mécanisme de régulation activité (Procaryotes, cytoplasme Eucaryotes)
- **Glycosylation** : fixation de glucides sur les protéines sécrétées ou membranaires
 - O-glycosylation : résidus -OH de Ser/Thr (Golgi)
 - **N-glycosylation** : Asn de séquence Asn-X(sauf Pro)-Ser/Thr (RE puis Golgi)
- Une N-glycosylation anormale, surtout une **hyperglycosylation**, a un effet possible sur :
 - la masse moléculaire et l'encombrement stérique de la protéine
 - le **repliement** (modifie l'interaction avec les chaperones du RE)
 - la **stabilité** : réduction de l'accessibilité aux protéases (encombrement stérique)
 - l'activité (même si jamais d'intervention directe des glucides dans le mécanisme réactionnel) : réduction de l'**accessibilité des substrats** (encombr. stér.)

- le **comportement *in vivo*** des protéines thérapeutiques :
clearance ralentie et **immunogénicité** augmentée

➤ Notions générales

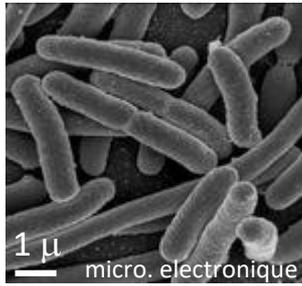
- N-glycosylation

- Complexité des **chaînes glucidiques**
- Différences majeures entre :
 - **levures, champignons** (1 seul type, hyperglycosylation/mannosylation possible : jusqu'à 50-100 Man)
 - **eucaryotes supérieurs** (3 types)
- Chez *P. pastoris* et *Y. lipolytica* : absence d' α -1,3-mannosyltransférase limite l'hypermannosylation
- Différences plus subtiles entre :
 - plantes / insectes / mammifères
 - et même parmi ceux-ci / ex : Erbitux anticorps pour traitement cancer, produit en cellules souris -> présentait liaisons α 1,3-galactose (absentes chez certains primates dont *H. sapiens*) -> réactions anaphylactiques



> Notions générales • Systèmes d'expression : avantages / inconvénients

Bactéries (*E. coli*)



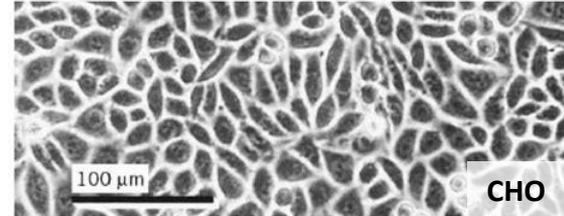
- rapide
- facile
- pas cher
- efficace

Levures (*P. pastoris*, *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*)



- rapide
- facile
- pas cher
- assez efficace
- sécrétion
- modifications post-traductionnelles

Cellules en culture (insectes, mammifères) / Plantes et animaux transgéniques



- modifications post-traductionnelles adéquates ("humaines")

- agrégats insolubles (corps d'inclusion) fréquents

- pas de sécrétion par vésicules

- pas de modification post-traductionnelle

- hyperglycosylation fréquente

- glycosylation "non humaine"

- complexe

- lent

- coûteux

- peu efficace

- éventuels risques de contamination

OK pour protéines non glycosylées

découverte d'une voie de glycosylation chez la bactérie *Campylobacter jejuni* -> souche modifiée d'*E. coli* capable de glycosyler grâce au transfert de ces gènes : Wacker *et al.* **2002 Science** **298** 1790-3

glycosylation "humanisée" chez *Pichia pastoris* (et *Y. lipolytica*) par transfert gènes hétérologues Hamilton ... **2006 Science** **313** 1441-3 de Pourcq *et al.* **2012 PLoS One** **7**(6) e39976

INRAE

Systèmes d'Expression
Protéines Hétérologues
C. Madzak

Chiba & Jigami **2007 Curr Opin Chem Biol** **11** 670-6

Production of humanized glycoproteins in bacteria and yeasts

Systemes d'expression de proteines heterologues

› Notions generales

› Un exemple de valorisation a l'INRA

- La levure "non-conventionnelle" *Yarrowia lipolytica*
- Developpement d'outils pour la production heterologue chez *Yarrowia lipolytica* / Promoteurs recombinants
- Brevets / Breveter a INRAE (organisme de recherche public)
- Un exemple de brevet a l'INRA :
protection du promoteur recombinant hp4d
- Valorisation du brevet "hp4d" : etapes, peripeties et bilan

➤ Exemple de valorisation

- Levure ascomycète **oléagineuse**
- Utilisée depuis 50s dans **procédés industriels**
- Non-pathogène (statut **GRAS**)
- Génomes **séquencés**, gènes annotés
- **Hôte** pour la production de **protéines hétérologues** :

- La levure *Yarrowia lipolytica*



- **sécrète** naturellement et très efficacement de nombreuses protéines
- nombreux marqueurs génétiques et outils moléculaires
- **Comparaison** avec les autres systèmes d'expression "levure" :

Saccharomyces cerevisiae
kit  invitrogen™

Pichia pastoris
kit  invitrogen™

Kluyveromyces lactis
NEW ENGLAND
kit  **BioLabs** Inc.

- meilleure **efficacité** et **reproductibilité** des performances en études comparatives
- caractéristiques de sécrétion et de glycosylation "plus proches des mammifères" :
 - ✓ voie **sécrétion co-translationnelle** (plus efficace pour protéines complexes)
 - ✓ **hyperglycosylation modérée** (moins de problèmes inactivation et immunogénicité)
ex : laccase fongique (glycoprotéine 70 kDa) chez *Pichia* 110 kDa / chez *Yarrowia* 90 kDa



INRAE

Systèmes d'Expression
Protéines Hétérologues
C. Madzak

Madzak *et al.* **2005 FEMS Yeast Res** **5** 635-646

Revue sur système d'expression *Yarrowia* :

Madzak **2015 Appl Microbiol Biotechnol** **99** 4559-77

Madzak **2018 Molecular Biotechnol** **60** 621-35

➤ Exemple de valorisation

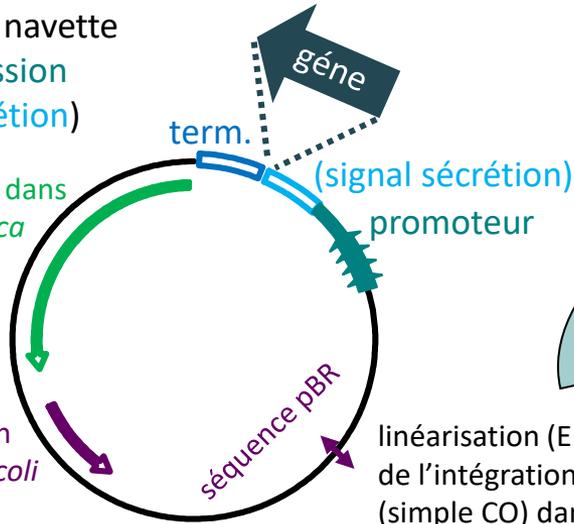
- Dévelop. outils d'expression hétérologue

- Souches mutées **auxotrophes** (pour leucine : **Leu⁻**) et **marqueurs** de sélection (gène **LEU2**)
- Vecteurs navettes **intégratifs** (par recombinaison homologue avec le génome)

Vecteur navette
d'expression
(et **sécrétion**)

sélection dans
Y. lipolytica
LEU2

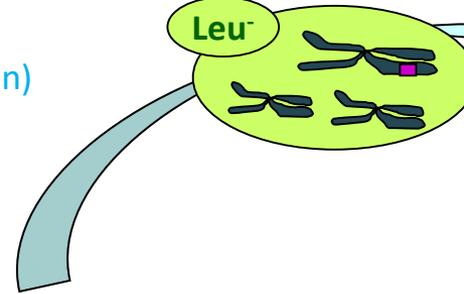
sélection
dans *E. coli*
Amp^R



souche Po1g

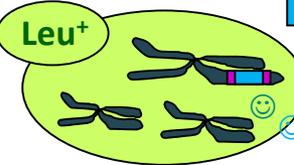
plateforme pBR

Leu⁻



souche productrice
prototrophe

copie intégrée



protéine hétérologue
produite (et sécrétée)

linéarisation (E. restriction) pour ciblage
de l'intégration du vecteur par homologie
(simple CO) dans le génome de *Y. lipolytica*

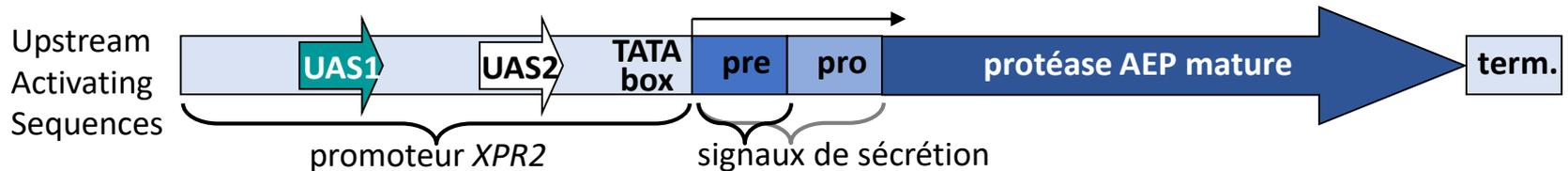
- Quel **promoteur** utiliser ?

- gène **XPR2** encodant **protéase extracellulaire** fortement exprimée en cond. d'induction : utilisation pXPR2 possible pour l'expression hétérologue mais conditions d'induction complexes incompatibles avec une production industrielle
- analyse par **dissection fonctionnelle du pXPR2**, financée par contrats de recherche

➤ Exemple de valorisation

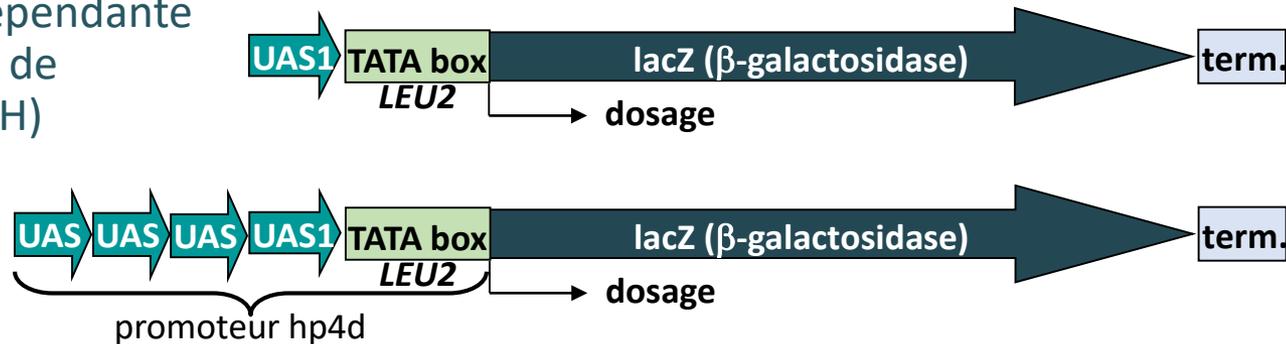
- Dévelop. outils d'expression hétérologue
- Promoteurs recombinants

- Analyse par **dissection fonctionnelle** du pXPR2 (délétions) : identification d'**UASs**



- Construction et analyse de **promoteurs recombinants** : effet des UASs dans un contexte simplifié (en amont de promoteur minimal = TATA box) / gène rapporteur (quantification)

- **UAS1_{pXPR2}** indépendante des conditions de culture (C/N/pH)



- **Promoteur recombinant hp4d** : 4 copies directes de UAS1_{pXPR2} en amont pLEU2min
- Caractéristiques intéressantes pour la production de protéines hétérologues

Madzak *et al.* 1999 *Microbiology* 145(1): 75-87

Functional analysis of upstream regulating regions from the *Yarrowia lipolytica* XPR2 promoter

Madzak *et al.* 2000 *J Mol Microbiol Biotechnol* 2 207-16

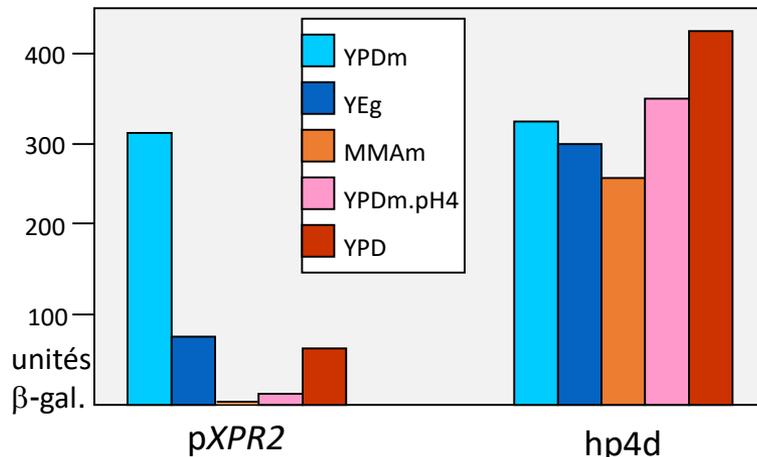
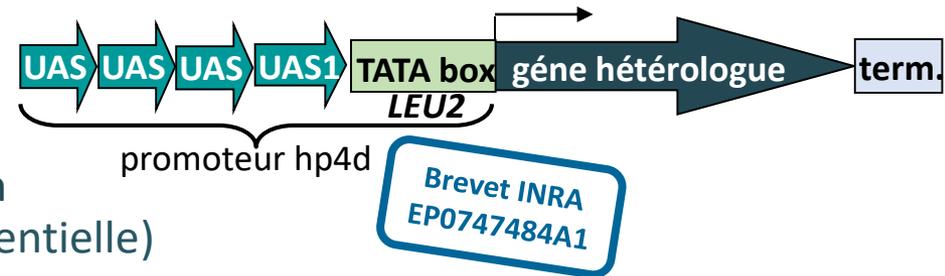
Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*

Exemple de valorisation

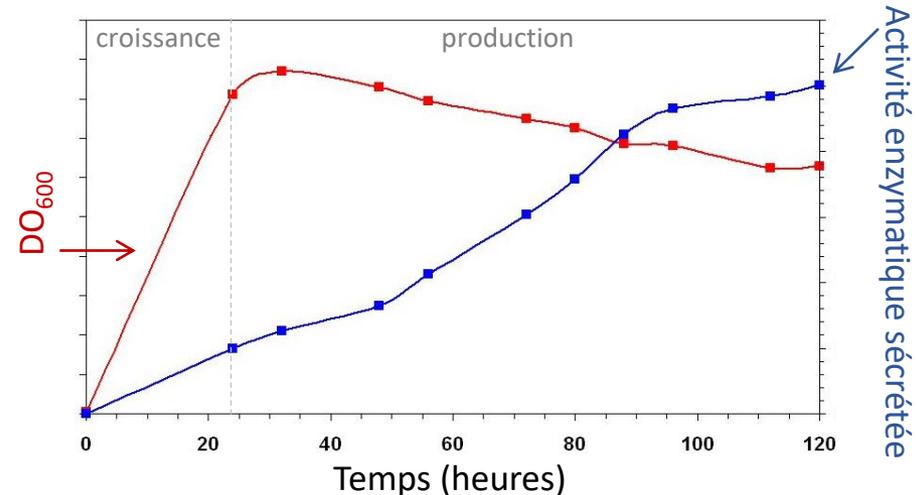
- Promoteur recombinant hp4d

- Caractéristiques intéressantes pour la production de protéines hétérologues :

- niveau d'expression élevé
- indépendance conditions (C/N/pH)
- séparation phases croissance/expression ("auto-induction" en fin de phase exponentielle)



d'après Madzak et al. 2000 *J Mol Microbiol Biotechnol* 2 207-16



d'après Kopecny et al. 2005 *Biochimie* 87 1011-22

- Promoteur le plus utilisé dans le monde pour l'ingénierie de *Y. lipolytica* depuis 20 ans
- Principe de promoteur **hybride** et d'augmentation du **nbre d'UASs** (-> 8 à 32 depuis)



INRAE

Systèmes d'Expression
Protéines Hétérologues
C. Madzak

Madzak et al. 2000 *J Mol Microbiol Biotechnol* 2 207-16

Blazek et al. 2011 *Appl Environ Microbiol* 77(22) 7905-14

Tuning gene expression in *Yarrowia lipolytica* by a hybrid promoter approach

➤ Exemple de valorisation

- Brevets

- Invention protégée pour **20 ans** (à condition de payer les annuités)
- Critères de **brevetabilité** :
 - **Nouveauté**
 - vérification par veille technologique : état de la technique, demandes de brevets
 - absence de divulgation : secret absolu (ni publication ni communication à un congrès)
 - **Application industrielle**
 - l'invention doit constituer une solution technique à un problème technique
 - elle doit pouvoir être fabriquée ou utilisée, être susceptible d'application industrielle
 - **Activité inventive**
 - l'invention ne doit pas découler de manière évidente de la technique connue par "l'homme du métier" (cf. avis d'un Cabinet de Conseil en Propriété Industrielle)



<https://www.inpi.fr/fr>

"praticien du domaine technique concerné, qui dispose de connaissances et d'aptitudes moyennes et qui possède les connaissances générales dans le domaine concerné à une date donnée"



INRAE

Systèmes d'Expression
 Protéines Hétérologues
 C. Madzak

➤ Exemple de valorisation

- Brevets

- Rédaction d'un brevet : appel à un Cabinet de Conseil en Propriété Industrielle conseillé car demande mal rédigée -> protection insuffisante, retard de procédure ou rejet
 - **Description** : compétences techniques
 - **Revendications** ("Claims") : compétences juridiques et techniques
- **Dépôt de brevet** :
 - **français** : par télé-procédure en ligne sur le site de l'**INPI**
 - **européen** : site de l'Office européen des brevets (**OEB**) / European Patent Office (**EPO**) pour une protection dans un maximum de 40 pays européens
cf. serveur de recherche de brevets Espacenet
 - par la **voie PCT** ("Patent Cooperation Treaty") à l'Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (**OMPI**) / World Intellectual Property Organization (**WIPO**), institution liée aux Nations Unies (191 états membres), pour une protection dans de nombreux pays
 - possibilité d'**extension PCT** d'un brevet français ou européen dans un délai d'un an



<https://www.inpi.fr/fr>



https://www.epo.org/index_fr.html



<https://www.wipo.int/portal/fr/>

➤ Exemple de valorisation • Breveter à INRAE (organisme de recherche public)

- **INRAE Transfert**, filiale de l'INRA/INRAE, créée en 2001, société de conseil en management de projets : **valorisation** économique et **transfert de technologies** innovantes



<https://www.inrae-transfert.fr/fr/>

- Organismes de recherche **publics** : **intéressement** des inventeurs
 - une part des **recettes** reversée au Département INRAE et, à sa discrétion, au laboratoire
 - **25% des bénéfices** reversés aux inventeurs et créateurs
activité inventive : conception / activité créative : contribution technique
 - mais bénéfices = après remboursement intégral des frais engagés :
 - ✓ dépôt brevet et annuités
 - ✓ frais Cabinet de conseil en propriété industrielle
 - ✓ frais d'examen du brevet (rapport recherche) dans tous pays (traductions)
- ≥ 100 k€
- **Transfert de technologie** à un partenaire industriel :
 - le plus souvent, 1^{ère} étape **MTA** ("Material Transfer Agreement"), transfert de matériel biologique à titre gratuit, avec limitation dans le temps, pour test en interne (R&D)
 - **Licence sur brevet** (ou sur savoir-faire) avec paiement d'annuités + (si exploitation) un % sur la vente de produits ou de services utilisant le procédé breveté



INRAE

Systemes d'Expression
Protéines Hétérologues
C. Madzak

➤ Exemple de valorisation

- Un exemple de brevet à l'INRA
- Protection du promoteur hp4d

- Un **matériel biologique** (séquence, gène, protéine) n'est **pas brevetable en soi**, mais seulement comme partie d'un procédé susceptible d'application industrielle
- Les **revendications** doivent **prévenir au maximum** les tentatives de détournement du brevet, mais doivent rester **justifiées** au regard de la description de l'invention
- Une invention à protéger : **promoteur pour production de protéines hétérologues**

- Revendications ("Claims") :

- séquences **UASs** et variantes fonctionnelles (% d'homologie de séquence)

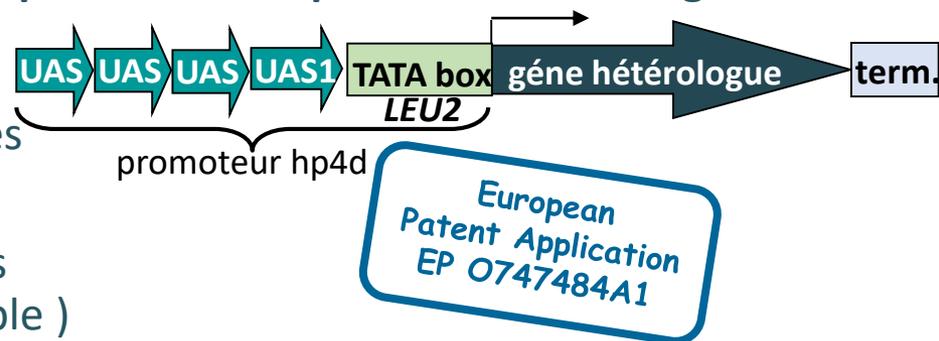
- **promoteurs** recombinants correspondants (nombre UASs variable / prom. min. variable)

- **vecteurs** les contenant (intégratifs / réplcatifs)

- **souches** de levures recombinantes correspondantes (*Y. lipolytica* ou autres espèces)

- **procédés** utilisant ces souches

- Mais "les brevets coûtent, les licences rapportent" -> besoin de contacts industriels



➤ Exemple de valorisation

- Valorisation du brevet "hp4d" : étapes, péripéties et bilan

- Brevet : "parcours du combattant" long, coûteux, générateur de paperasse
- Valorisation pas forcément rentable en 20 ans : tests R&D de plusieurs années



- Pfizer (USA), partenaire **industriel financeur**, intéressé par une licence exclusive mais **changement de stratégie** de Recherche et Développement en 1995
-> arrêt total de la production de protéines hétérologues 
- Campagne de "démarchage" effectué par la société de **Conseil en Innovation** Alcimed : environ 100 contacts industriels -> 10 MTAs -> sans suite 
- Heureusement, contacts plus fructueux par relations du labo (expertise vis-à-vis d'industriels, PostDocs étrangers), congrès et publications



Licences sur brevet : 1^{ère}

3

1

1

Licence sur matériel



INRAE

Systemes d'Expression
Protéines Hétérologues
C. Madzak

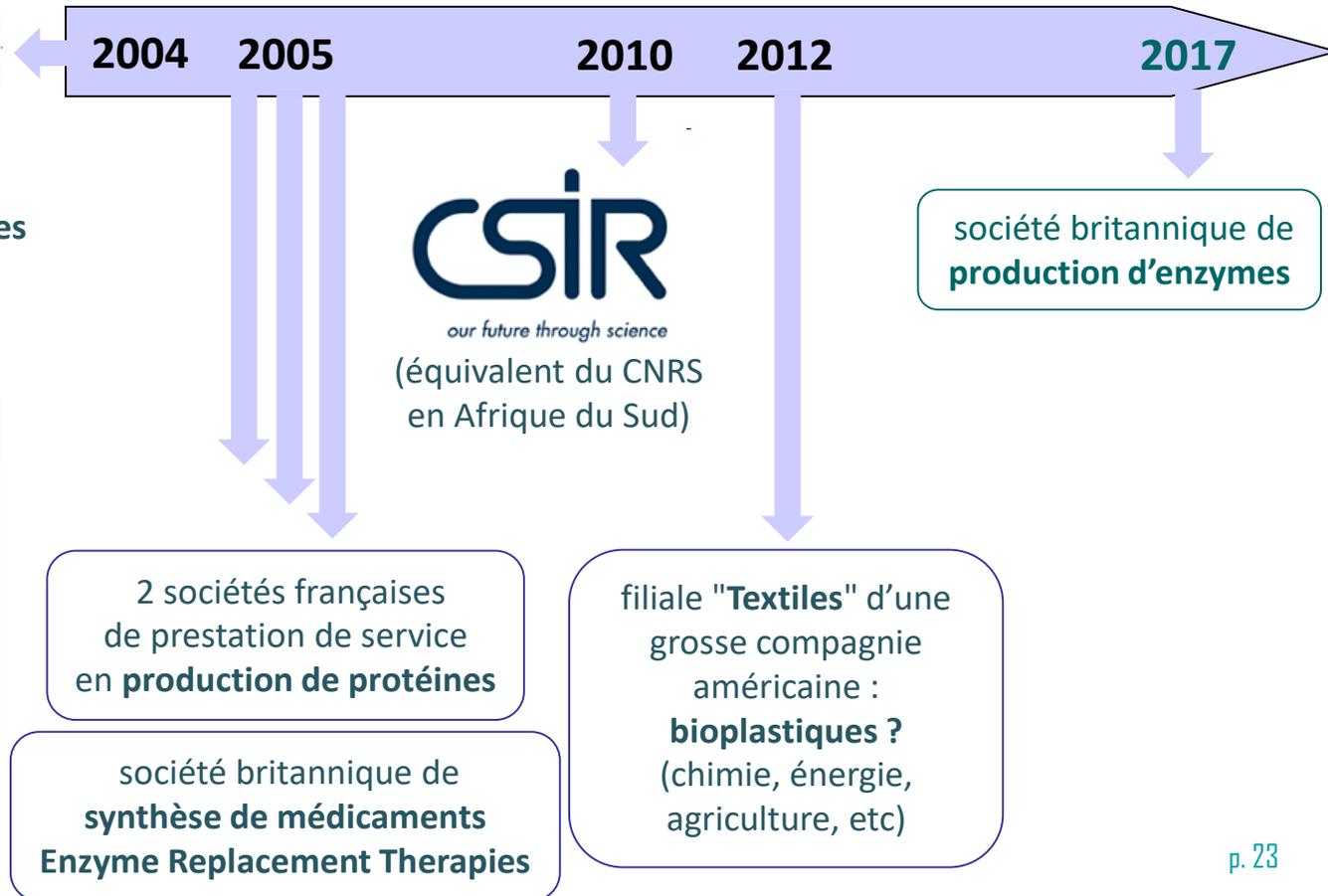
➤ Exemple de valorisation

- Valorisation du brevet "hp4d" : étapes, péripéties et bilan

- **Bilan** de la valorisation du brevet "hp4d" : **6 Licences sur brevet** + 1 Licence sur matériel
- Reflet de la **polyvalence** de *Y. lipolytica*, non seulement pour la **production de protéines** hétérologues mais aussi pour des utilisations en tant qu'**usine cellulaire** ("cell factory")



Yeastern Biotech Co. (Taiwan) :
développement d'un **kit**
d'expression/sécrétion de protéines
hétérologues chez *Y. lipolytica*
(2 vecteurs + souche, cf. p. 15)
<http://www.yeastern.com>



Systemes d'expression de proteines heterologues

› Un exemple de valorisation à l'INRA

▪ **Valorisation** du brevet "hp4d" : **bilan**

- les meilleures années : plusieurs 10 k€ de **recettes pour le Département MICA** de l'INRA, dont **20%** ont été **reversés au(x) labo(s)** des inventeurs (non retraités)
- **pas de bénéfice pour les inventeurs** avec ce brevet (mais un brevet sur une variété de colza utilisé mondialement -> doublement des salaires des inventeurs et créateurs !)

▪ **Bilan personnel** : satisfaction intellectuelle et impact sur carrière scientifique

- voir son travail de paille se transformer en un kit commercial
- intérêt de la communauté scientifique : 115 MTAs (dont 15 avec des industriels)
- nombreuses collaborations académiques ayant généré plus de 60 publications
- invitations à des missions à l'étranger et dans des congrès internationaux

▪ Questions sur le cours ? -> catherine.madzak@inrae.fr