



HAL
open science

**Compte-rendu scientifique final du projet
pre-maturation INRA 2018-2020 PROVIDEFENSE
Titre du projet : Production de défensines aviaires
recombinantes pour la santé animale**

Anne-Christine Lalmanach, Jean-Marc Nicaud, Gwenaëlle André-Leroux

► **To cite this version:**

Anne-Christine Lalmanach, Jean-Marc Nicaud, Gwenaëlle André-Leroux. Compte-rendu scientifique final du projet pre-maturation INRA 2018-2020 PROVIDEFENSE Titre du projet : Production de défensines aviaires recombinantes pour la santé animale. INRAE. 2020, 7 p. hal-04188500

HAL Id: hal-04188500

<https://hal.inrae.fr/hal-04188500>

Submitted on 25 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.



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

Compte-rendu scientifique final du Projet Pré maturation INRA 2018 PROVIDEFENSE

Titre du Projet : Production de défensines aviaires recombinantes pour la santé animale

Partenaire 1 (porteur du projet) : UMR 1282 ISP/ Equipe PCA-SPVB (Anne-Christine LALMANACH)/ INRAE Val de Loire, Nouzilly.

Partenaire 2 : UMR 1319 MICALIS/ Equipe BIMLip (Jean-Marc NICAUD)/ INRAE Domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas.

Partenaire 3 : UR 1404 MaIAGE / Equipe StatInfOmics (Gwenaëlle ANDRÉ-LEROUX)/ INRAE Domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas.

Résumé du projet :

Les défensines sont des peptides antimicrobiens naturels de l'immunité innée des animaux. Deux défensines aviaires nommées AvBD2 et AvBD7, extraites et purifiées à partir de la moelle osseuse du poulet, sont actives contre des bactéries pathogènes Gram- et Gram+ et sont remarquablement résistantes à la protéolyse. De manière importante, l'efficacité antimicrobienne de l'AvBD7 a été récemment démontrée dans un modèle murin de salmonellose systémique. Ces propriétés particulières font de l'AvBD2 et de l'AvBD7 des candidats thérapeutiques prometteurs en alternative aux antibiotiques. Par ailleurs, la production de ces molécules à grande échelle est nécessaire à leur développement industriel. Le présent projet vise donc à faire la preuve de concept de production recombinante d'AvBD2 et d'AvBD7 fortement antimicrobiennes. L'objectif premier sera de développer un système d'expression (i) chez la levure *Yarrowia lipolytica* qui bénéficie d'outils performants (promoteurs inductibles, nouvelles séquences de sécrétion) pour la production de protéines hétérologues et (ii) chez la cellule S2 d'insecte qui a fait ses preuves pour produire des molécules structurellement très proches des défensines. Le second objectif sera de définir et exprimer des variants d'AvBD2 et d'AvBD7 substitués sur certains acides aminés choisis pour augmenter l'activité antibactérienne des molécules. Le gain d'activité antimicrobienne des défensines recombinantes obtenues sera validé sur un panel de souches bactériennes pathogènes en comparant cette activité à celle des molécules naturelles. Le troisième objectif sera de monter en échelle de production des variants les plus actifs et de fournir des protocoles de production et de purification des défensines transférables. Les retombées en termes d'application thérapeutique alternative aux antibiotiques sont attractives, en particulier pour l'industrie pharmaceutique, avec une demande importante en santé publique et vétérinaire. C'est pourquoi le projet a un fort potentiel de valorisation avec l'objectif de protéger les variants d'AvBD2 et d'AvBD7 grâce au dépôt d'une demande de brevet.

Rappel des objectifs

- Développer un système d'expression chez la levure *Y. lipolytica* et chez la cellule S2 d'insecte pour produire des protéines hétérologues que sont les défensines aviaires AvBD2 et AvBD7
- Définir des variants d'AvBD2 et d'AvBD7 substitués sur certains acides aminés choisis pour augmenter l'activité antibactérienne in vitro
- Monter en échelle de production des AvBDs et leurs variants les plus actifs

Sommaire :

1. Constructions, clonages et cultures de cellules recombinantes pour exprimer le gène des AvBDs
2. Identification d'acides aminés substituables dans la séquence des AvBDs afin d'augmenter l'activité antimicrobienne
3. Analyse des milieux de culture par Western Blot et par ELISA
4. Montée en niveau de production et test antibactérien
5. Conclusions – perspectives défensines
6. Conclusions – perspectives système d'expression hétérologues chez *Y. lipolytica*

2. Identification d'acides aminés substituables dans la séquence des AvBDs afin d'augmenter l'activité antimicrobienne

L'analyse bioinformatique des séquences et structures des deux défensines déposées dans la Protein Data Bank (Derache et al, 2012 ; Bailleul et al, 2016) a été réalisée par le partenaire 3 afin d'identifier les acides aminés les plus conservés, ceux impliqués dans la structure tridimensionnelle tels que les résidus cystéine tous engagés dans des ponts disulfures, les résidus glycine et proline qui ont un engagement distinct et fort dans la liaison peptidique, ainsi que ceux du « core » protéique et qui ne peuvent pas être substitués. A l'inverse, les résidus proposés à la mutation ont été identifiés sur la base d'une conservation inférieure ou égale à 70% et d'une interaction entre eux dans l'espace 3D (Figure 2). Cette analyse a permis de pointer ces acides aminés comme exposés, et d'émettre l'hypothèse raisonnée que leur substitution pourrait accentuer le caractère amphiphile des défensines, et ainsi augmenter leur pouvoir antimicrobien. Il a également été tenu compte des contraintes stériques de substitution (encombrement des chaînes latérales des acides aminés) et de l'avantage de ponts salins entre chaînes latérales dans la structure. Ainsi, en ce qui concerne l'AvBD2, 5 acides aminés substituables ont été mis en évidence et 5 combinaisons possibles ont été identifiées. Ce sont les substitutions rationnelles suivantes : L1F/K31R/N35D ; L1F/N35D ; K31R ; S7D ; S22R. Sur la Figure 2, les acides-aminés L1 et N35 apparaissent verrouiller la structure déjà resserrée par 3 ponts disulfures sur une séquence de seulement 36 résidus. Particulièrement, les acides aminés S7, S22 et K31 forment une colonne vertébrale le long de l'axe longitudinal de la protéine, les ponts disulfures étant eux plutôt sur l'axe latitudinal. De plus, l'analyse visuelle effectuée avec PyMOL montre que K31 agit comme un "hub" en interagissant à la fois avec les résidus terminaux L1 et N35 et avec les résidus S22 et S7. En ce qui concerne l'AvBD7, après une analyse similaire, sa séquence et sa structure apparaissent optimisées *in natura*, au moins contre les protéases, avec un verrouillage de l'extrémité C-terminale par l'extrémité N-terminale elle-même verrouillée par un pont salin. Il est apparu qu'aucune mutation ne peut être proposée sans risque pour l'intégrité structurale et fonctionnelle de la molécule.

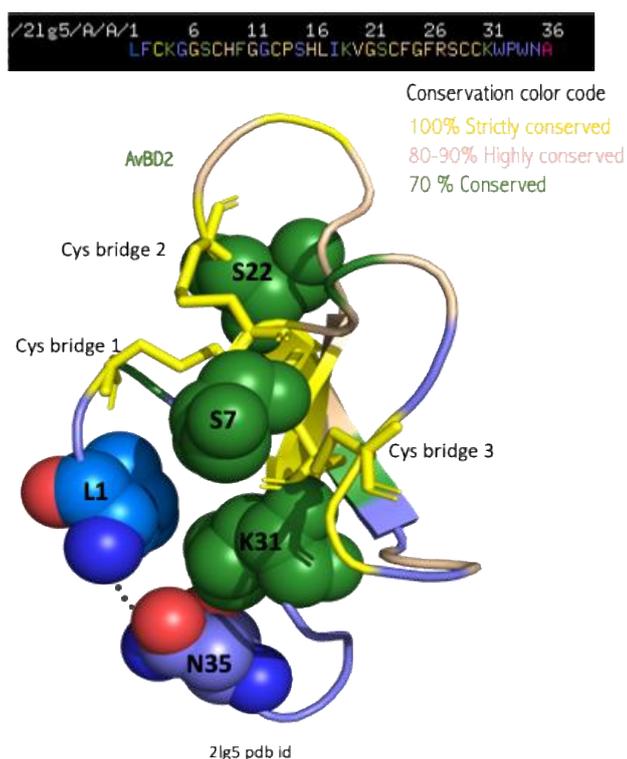


Figure 2 : Cartographie de la conservation des résidus sur la structure RMN d'AvBD2. Les chaînes latérales des acides aminés proposés à la mutation sont en sphères. Les ponts cystéines (Cys) sont en jaune. Image effectuée avec PyMOL Schrödinger.

3. Analyse des surnageants de culture par Western Blot et par ELISA

Des anticorps polyclonaux de lapin anti-AvBD2 et anti-AvBD7 peptides naturels préparés au laboratoire à partir de moelle osseuse de poulet ont été obtenus (Eurogentec, Belgique). L'analyse des surnageants de culture de cellules S2 ou de levures YI recombinantes par méthode Western Blot n'a montré aucune détection d'AvBD2 (3,9 kDa) ou d'AvBD7 (5,3 kDa), alors que le témoin positif peptide AvBD2 ou peptide AvBD7 naturel (1 µg pur ou en extrait protéique de la moelle osseuse) a présenté un signal avec les anticorps spécifiques, signal correspondant à la masse protéique de chaque peptide (Figure 3).

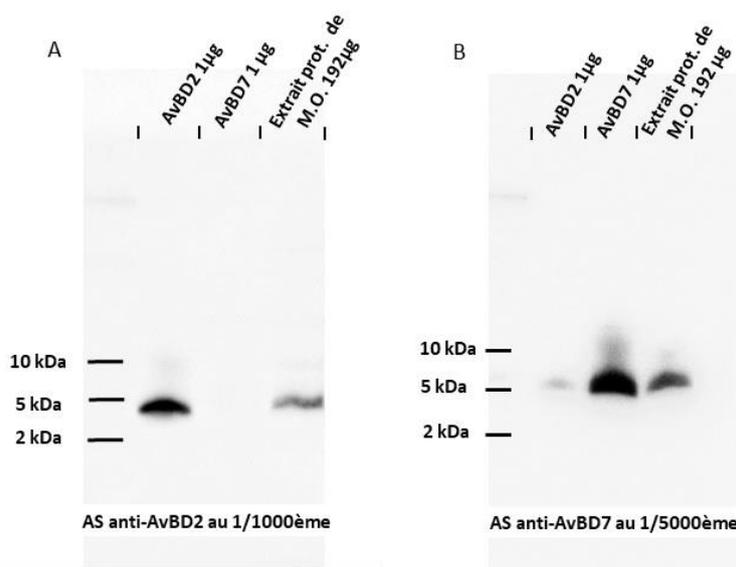


Figure 3 : Western Blot des défensines aviaires AvBD2 ou AvBD7 purifiées ou contenues dans l'extrait protéique de moelle osseuse (M.O.). Les protéines (25µL par piste) sont séparées par électrophorèse en gel d'acrylamide 16% en Tris-tricine et transférées sur membrane de nitrocellulose 0,2 µm (Biorad, France). Après saturation et lavage, la membrane est incubée avec les IgG de l'antisérum (AS) de lapin anti-AvBD2 ou anti-AvBD7 à la dilution indiquée. Après lavage, la membrane est incubée avec un anticorps de chèvre anti-Ig de lapin couplé à la peroxydase, puis avec le substrat (ECL Clarity Western, Biorad, France).

La méthode ELISA, mise au point au laboratoire avec les anticorps spécifiques, a montré une plus grande sensibilité (d'un facteur 10) que la méthode Western Blot. En réalisant une gamme d'étalonnage de chaque défensine naturelle, il est possible de détecter au minimum 50 ng d'AvBD2 ou d'AvBD7. L'analyse par ELISA des surnageants de culture de cellules S2 transformées n'a pas révélé la présence d'AvBD2 ou d'AvBD7 produite. En revanche, l'analyse par ELISA des surnageants de culture de levures, comparativement à une gamme d'étalonnage de peptide naturel réalisée dans les mêmes conditions, a permis de quantifier l'AvBD7. Deux clones nommés 6B et 13B du 3^{ème} essai, construits avec la séquence d'adressage complète pré-pro-Lip2 native (SSLP) et respectivement avec l'un ou l'autre des deux promoteurs utilisés, ont montré une concentration de 0,27 µg/mL et de 0,39 µg/mL d'AvBD7. L'étape suivante a consisté à améliorer la construction par adjonction du gène d'une protéine chaperonne de *Yarrowia* afin d'améliorer le repliement et la sécrétion de la défensine à structure tridimensionnelle complexe. L'analyse du surnageant de culture des levures ayant intégré cette nouvelle construction a donné une concentration de 1,27 µg/mL par dosage ELISA, ce qui montre une augmentation de la production d'AvBD7 environ d'un facteur 3 en présence de la protéine chaperonne. Le même type de construction a été réalisé pour l'AvBD2. Les partenaires se sont finalement accordés sur l'hypothèse d'une augmentation possible du rendement de production de l'AvBD2 et de l'AvBD7 en la réalisant en fermenteur à une plus grande échelle.

4. Montée en niveau de production et test anti-bactérien

Un essai de production à l'échelle industrielle a été réalisé en fermenteur de 10L à partir des nouvelles levures recombinantes pour AvBD2 et pour AvBD7 (NewMilkLab, Belgique). Les milieux collectés ont été centrifugés, les surnageants ont été filtrés sur membrane de 0,2µm et congelés à -20°C par le partenaire 2.

4.1 Analyse du sécrétome de *Y. lipolytica* au cours de la fermentation en condition industrielle pour l'expression de protéines hétérologues avec le promoteur inducible (Brevet INRAE).

L'analyse, au cours de la fermentation, de la production du sécrétome et de la production de défensine a été réalisée par le partenaire 2 et par la plateforme de protéomique PAPPISO (UMR 1319 MICALIS, INRAE Domaine de Vilvert). Le profil de migration électrophorétique des protéines sécrétées (Figure 4) montre les bandes de protéines majoritaires (B1 à 4) qui ont été découpées et analysées par spectrométrie de masse pour une meilleure caractérisation de ces protéines et une analyse de la couverture des protéines sécrétées (Tableau 1). Ce travail nous a permis (i) d'identifier les protéines majoritaires du sécrétome de *Y. lipolytica*, (ii) de confirmer la sécrétion de défensine avec ses fragments peptidiques générés par le spectromètre de masse couvrant plus de 90% de la séquence de l'AvBD7, et (iii) d'identifier des protéases potentiellement impliquées dans la dégradation des défensines produites. L'ensemble de ces informations devraient permettre non seulement d'améliorer la production mais aussi de réduire le temps de fermentation.

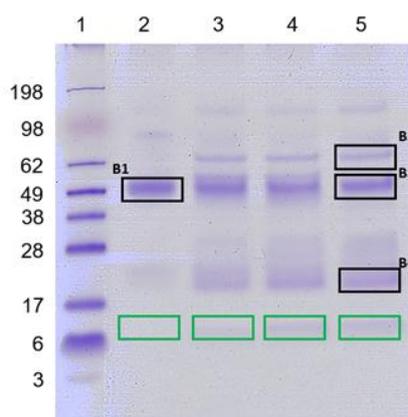


Figure 4 : Sécrétome de la levure *Y. lipolytica* au cours de la fermentation de la souche productrice de défensine AvBD7. Les protéines (15µL par piste) sont séparées par électrophorèse en gel d'acrylamide 16% en Tris-tricine, et sont colorées au bleu de coomassie pour visualisation. 1 ; marqueur de poids moléculaire, 2 ; SN à t=18h avant induction, 3 ; T=62h, 4 ; T=84h et 5 ; T=96h à la récupération du surnageant. Les bandes noires ont été découpées pour l'analyse du sécrétome, les bandes vertes pour l'analyse de la couverture d'AvBD7.

Tableau 1 : Protéines majoritaires identifiées dans le sécrétome de *Y. lipolytica* en condition de fermentation industrielle. Les colonnes B1 à B4 donnent le nombre de peptides couvrant la séquence de la protéine identifiée par son N° d'accèsion dans la Protein Data Base (première colonne) et sa description (deuxième colonne), à partir de chaque bande électrophorétique B1 à B4 prélevée (voir Figure 4) et analysée par spectrométrie de masse.

accession	description		B1	B2	B3	B4
YALI1_D26263g / YALIOD20680g	Similar to uniprot P53334 Saccharomyces cerevisiae YGR279C SCW4 (ohnolog of YMR305C) Cell wall protein with similarity to glucanases	1	58	4	27	3
YALI1_E40502g / YALIOE34155g	Some similarities with uniprot P38081 Saccharomyces cerevisiae YBR056w similarity to glucan 1,3-beta- glucosidase		16	0	9	0
YALI1_E39796g / YALIOE33539g	Similar to uniprot P53616 Saccharomyces cerevisiae YNL066W (ohnolog of YIL123W) SUN4		16	0	5	0
YALI1_A18133g / YALIOA17919g	Similar to uniprot P38288 Saccharomyces cerevisiae YBR162c (TOS1)	2	15	2	12	3
YALI1_D06131g / YALIOD04851g	Uniprot Yarrowia lipolytica YALIOD04851g PHR2 Cell surface glycosidase expressed at acidc pH		11	10	8	0
YALI1_E16731g / YALIOE13706g	Uniprot Yarrowia lipolytica YALIOE13706g KAR2 dnaK-type molecular chaperone involved in ER translocation of secretory proteins	3	1	104	37	6
YALI1_F08075g / YALIOF05390g	Uniprot Yarrowia lipolytica YALIOF05390g EXG1 Glucan 1, 3-beta-glucosidase precursor (Exo-1, 3-beta- glucanase)		4	3	14	0
YALI1_E34494g / YALIOE29205g	Weakly similar to uniprot P43599 Saccharomyces cerevisiae YFR018c		4	2	0	14
YALI1_C26377g;YALIOC19107g	Some similarities with uniprot Q6CD23 Yarrowia lipolytica YALIOC04389g		6	1	0	0
YALI1_C05857g	W29 specific;Q6CD23;No description in CLIB122		1	0	0	0

4.2 Analyse de la production d'AvBD7 au cours de la fermentation en condition industrielle.

Les surnageants de culture ont ensuite été décongelés par le partenaire 1 qui a dosé les défensines par ELISA et obtenu la concentration respective en AvBD2 et en AvBD7 de 3,43 et de 3,16 µg/mL. L'analyse fonctionnelle des surnageants, réalisée par diffusion radiale en gélose (Lehrer et al, 1991) contenant une souche bactérienne de référence, ne permet pas de détecter ni de quantifier l'activité antibactérienne car la concentration minimale inhibitrice (CMI) des AvBDs naturelles est de l'ordre de 5 µg/mL (Bailleul et al, 2016), concentration qui n'est pas atteinte en condition de culture industrielle. Les surnageants ont alors été traités par dialyse (membrane de « cut off MW » à 2kDa) pour éliminer les sels et petits solutés du milieu de culture pouvant inhiber l'activité antimicrobienne. Puis ils ont été concentrés 4 à 5X par rapport au volume initial et ont finalement été dosés par ELISA. Une concentration respective de 1,54 et de 2,02 µg/mL d'AvBD2 et d'AvBD7 a été obtenue à partir des surnageants dialysés et concentrés. Ces résultats indiquent une perte des défensines comparativement au surnageant de départ, possiblement au travers de la membrane de dialyse compte-tenu de la petite taille de ces molécules très repliées. Cette perte a été confirmée par les données obtenues en spectrométrie de masse (Plateforme PIXANIM, UMR 85 PRC, INRAE Val de Loire), en comparant les surnageants non traités aux surnageants dialysés et concentrés. Une procédure de purification des défensines serait nécessaire à développer pour pouvoir mesurer l'activité antimicrobienne. Cependant elle nécessite une mise au point particulièrement adaptée aux conditions physico-chimiques du milieu de production des molécules.

5. Conclusions – Perspectives / défensines

Il ressort de ce bilan le point positif de la construction du gène de l'AvBD7 dans *Yarrowia lipolytica* comprenant la séquence d'adressage complète pré-pro-Lip2 native (SSLP) qui permet de produire plus efficacement la défensine. De plus, la méthode de dosage développée par le partenaire 1 a permis d'évaluer la quantité produite. Cette quantité a été améliorée par le partenaire 2 en jouant sur la surexpression d'une protéine chaperonne (PDI) de *Yarrowia*, sur la composition de son milieu de culture, et sur les conditions de fermentation et d'induction du promoteur au cours du feedbatch. Cependant, le milieu de la culture industrielle utilisé est un milieu synthétique qui rend difficile la quantification de la production de défensines par ELISA. Ces résultats confirment la difficulté d'obtention de ces molécules à des concentrations permettant la mesure de l'activité biologique.

Les résultats montrent que nous avons réussi :

1. A faire produire chaque défensine par *Yarrowia Lipolytica* en optimisant le promoteur et la séquence signal de la construction génique, ce qui n'avait jamais été fait auparavant.
2. A multiplier par dix le niveau de production en ajoutant la protéine chaperonne de YI et en augmentant l'échelle de production.
3. A identifier des acides aminés potentiellement cibles de mutations visant à augmenter l'activité antimicrobienne.

En conclusion, même si les deux défensines aviaires ont pu être produites en fermenteurs à des concentrations non exploitables (de l'ordre de 3mg/L), il faut se rendre à l'évidence que leur production chez l'hôte naturel par les cellules hétérophiles doit se faire probablement dans des conditions particulièrement difficiles à transposer en système levure et à l'échelle industrielle. Il reste toutefois imaginable que la production de ces molécules à activité antimicrobienne puisse être amplifiée *in vivo* pour faire barrière aux infections en jouant sur la stimulation de l'animal hôte par voie alimentaire ou par voie de vaccination.

6. Conclusions – Perspectives / système d'expression hétérologues chez *Y. lipolytica*

Un autre résultat important de ce projet porte sur les avancées du système d'expression hétérologue de protéines chez la levure *Yarrowia lipolytica*. Les résultats ont permis :

1. Une meilleure expertise de l'utilisation des promoteurs hybride-inductible par l'erythritol (brevet INRAE ; « INDUCIBLE PROMOTER FOR GENE EXPRESSION AND SYNTHETIC BIOLOGY » filed on the 18 May 2017 under the N° EP17305575.7).

2. L'identification de séquences de "peptide signal" permettant une production efficace de protéines hétérologues.
3. L'identification de chaperonnes et de modification génétique (abolition de la filamentation) permettant une production améliorée de protéines hétérologues chez cette levure
4. Le développement d'un procédé industriel de protéines hétérologues basée sur des souches châssis plus performantes et les promoteurs hybrides inductibles par l'erythritol.
5. Une bonne caractérisation du sécrétome de *Y. lipolytica* en condition de fermentation industrielle.

En conclusion, ce projet a aussi permis d'augmenter notre expertise sur le système d'expression de protéines hétérologues chez *Y. lipolytica*, la construction des cassettes d'expression, la culture en fiole et jusqu'à une production à l'échelle de fermenteur industriel 10L. Il nous a permis aussi d'identifier des points clefs pour perfectionner notre système d'expression de protéines hétérologues chez *Y. lipolytica*, en particulier en neutralisant certaines protéases de la levure. Ce travail permettra une meilleure valorisation du système d'expression auprès des licenciés et de mieux valoriser notre brevet sur les promoteurs inductibles. Finalement, ce travail va faire l'objet d'une publication.

Remerciements

Le partenaire 1 tient à remercier pour leur assistance : Nathalie Lallier lors de l'extraction et de la purification des défensines naturelles ; Christophe Gitton et Angéline Trotereau lors des constructions et clonages en vecteur S2 ; Benjamin Fradet lors des cultures de cellules S2 et des analyses immunochimiques ; Florence Gilbert lors des essais de dialyse et concentration des peptides à partir des milieux de production ; Emilie Maugrion, Ana-Paula Teixeira et Valérie Labas lors des analyses par spectrométrie de masse des défensines natures purifiées et des défensines recombinantes des surnageants de culture industrielle. Le partenaire 1 tient aussi à remercier Catherine Schouler pour son expertise scientifique en génétique bactérienne et pour son soutien logistique.

Le partenaire 2 tient à remercier Léa Vidal pour son implication remarquable pour les constructions des nombreuses cassettes d'expressions, de souches productrices de défensines et de leur production en fiole ; Celine Henry et Aaron Milan-Oropeza de la plateforme de protéomique PAPPISO pour les analyses protéomiques des défensines et du sécrétome des cultures en fioles et en fermenteurs ; Djamilia Onesime pour l'analyse du sécrétome de *Y. lipolytica* et Franck Fudalej de la société NewMilkLab pour les cultures en fermenteur en conditions industrielles.

Les partenaires tiennent à remercier la Direction Partenariat, Transfert et Innovation d'INRAE pour le financement de ce projet jusqu'à son étape Go/NoGo.

Références

- Bailleul G et al, PLoS One. 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0161573. PMID: 27561012; PMCID: PMC4999073.
- Bailleul G et al, Front Microbiol. 2019 doi: 10.3389/fmicb.2019.00541.
- Celińska E et al, Appl Microbiol Biotechnol. 2018. doi: 10.1007/s00253-018-8966-9. PMID: 29704042; PMCID: PMC5959983.
- Larroude M et al, Microb Biotechnol. 2019. doi: 10.1111/1751-7915.13427. PMID: 31148366; PMCID: PMC6801146.
- Larroude M et al, Biotechnol Lett. 2020. doi: 10.1007/s10529-020-02805-4. PMID: 31974649; PMCID: PMC7101291.
- Lehrer RI et al, J Immunol Methods. 1991. doi: 10.1016/0022-1759(91)90021-7. PMID: 1901580.
- Röhrl J et al, J Biol Chem. 2010. doi: 10.1074/jbc.M109.091090.
- Soudier P et al, Methods Mol Biol. 2019. doi: 10.1007/978-1-4939-9024-5_6.
- Védrine M et al, PLoS One. 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0202664.