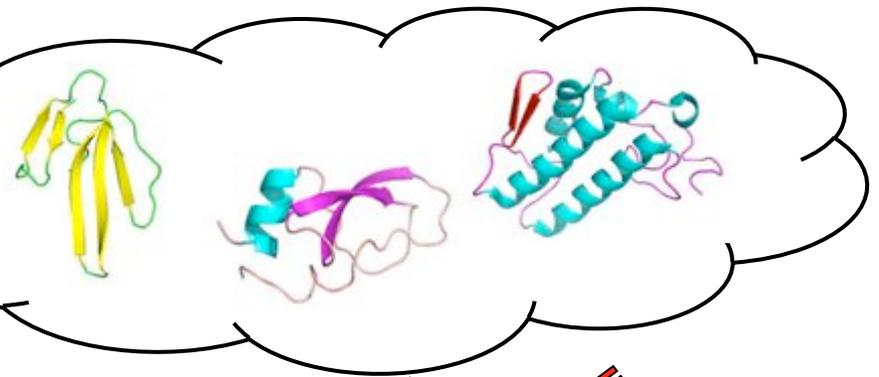


*Diversité des toxines
d'origine animale
et
stratégies d'ingénierie
de peptides et de protéines*

*Diversité
moléculaire
des toxines
d'origine animale*

Venins et toxines animales !

- des outils pharmacologiques,
- des médicaments,
- des moyens de se protéger...



Qu'est ce qu'un animal venimeux ?



Animal doté d'un appareil venimeux !

- Produit un fluide, une substance « toxique » pour l'organisme receveur
- Système d'injection/d'administration (dard, crochets, épines, dents....) efficace relié à un système de production (glande à venin/salive) de la substance « toxique »

À quoi sert le système venimeux ?



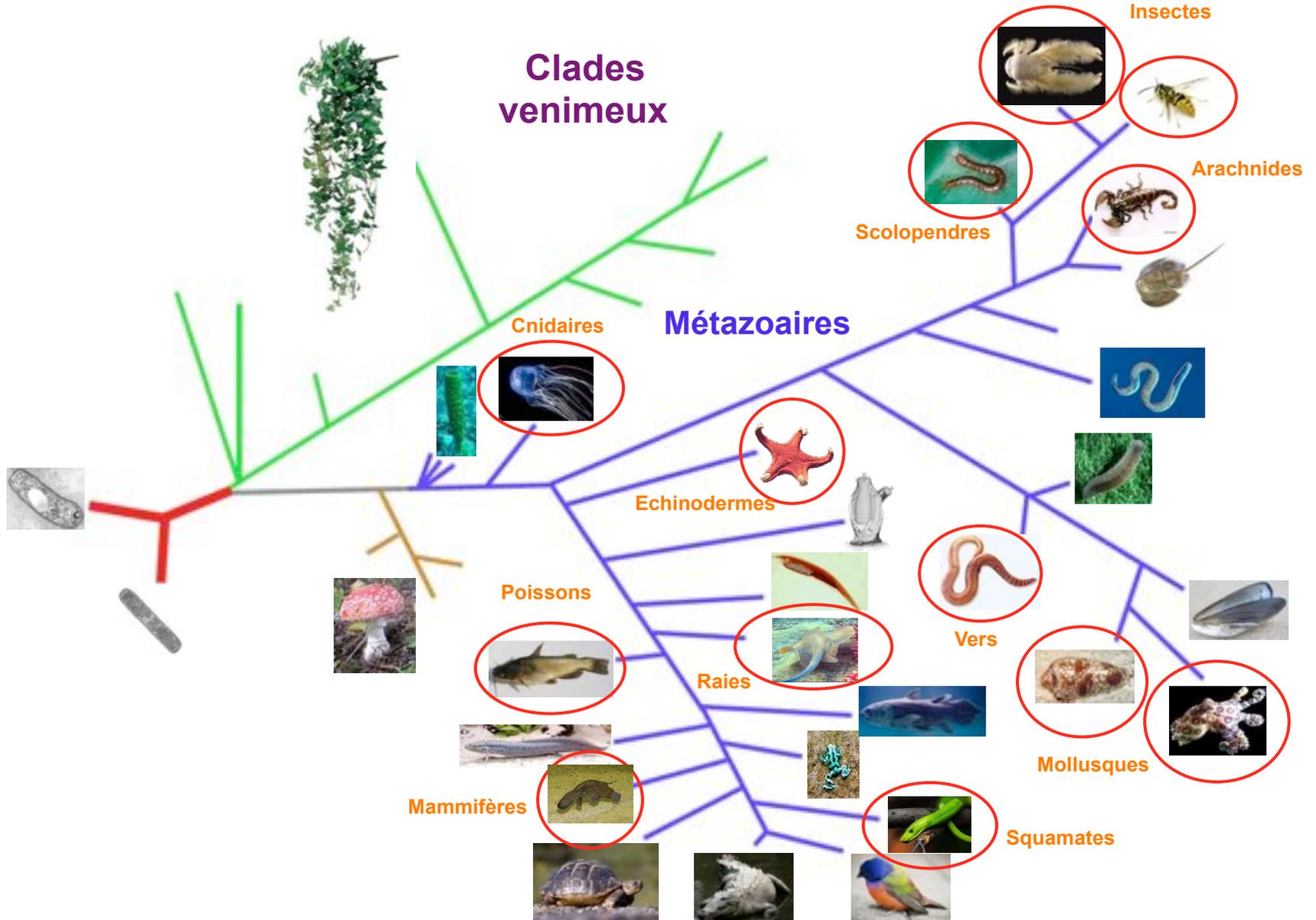
Prédation



Défense



Quels sont les animaux venimeux ?



Qu'est ce qu'un venin ?



Un milieu complexe



Fraction non peptidique

Amines biogènes :

- ✓ histamine,
- ✓ sérotonine,
- ✓ Acétylcholine...

Sucres

Sel

Nucléotides

Nucléosides

Acides nucléiques :

- ✓ ARNm,
- ✓ ADNg.



Fraction protéique et peptidique (90% du poids sec du venin!)

Protéines : bcp d'enzymes :

- ✓ nucléases (1^{ère} description en 1952 !)
- ✓ protéases
- ✓ acétylcholinesterases,
- ✓ hydrolases
- ✓ phospholipases...

- Peptides :

- ✓ différents structures et cibles
- ✓ aussi appelées « toxines »

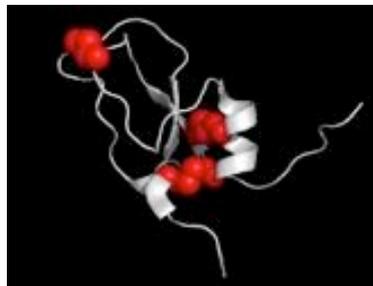
Peptides des venins/toxines : généralités



Toxines « trois doigts » (3FTx)

- Composés sécrétés,
- De 10 à 150 acides aminés,
- Riches en ponts disulfure,
- Très stables,
- Présentent de multiples structures !
- Peu immunogéniques,
- Présence de modifications post-traductionnelles dans certains cas,
- Très haute affinité et spécificité pour : récepteurs, canaux ioniques, enzymes...

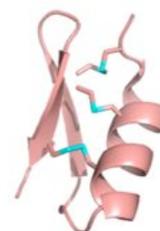
→ Familles structurales contenant de nombreuses isoformes !



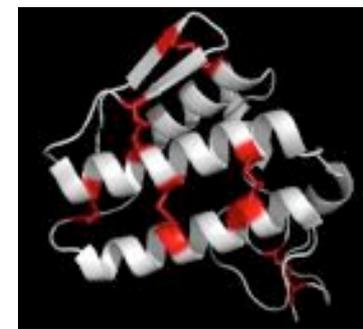
Toxines de type Kunitz (BPTI)



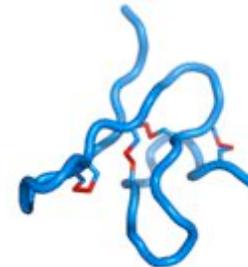
Omega-conotoxin
mviic



Alpha-toxin
Scorpion



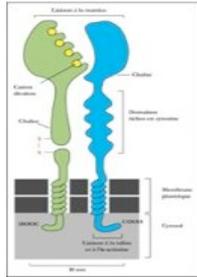
Phospholipases A2 (PLA2)



Delta-palutoxin IT1
Motif ICK (Inhibitory Cystine
Knot) Spider

→ Les peptides des venins des objets moléculaires, recrutés, sélectionnés, résultant de processus continus et dynamiques d'évolution : divergence ou convergence fonctionnelle !

Diversité fonctionnelle divergente : l'exemple des toxines à trois-doigts de serpents.



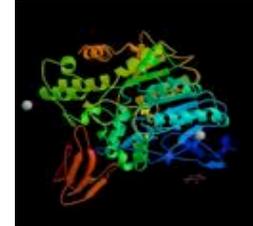
disintegrines

Récepteurs aux intégrines

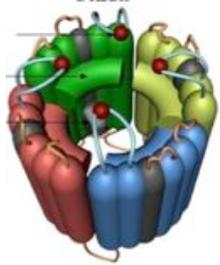


Phospholipides
Cytotoxines

Fasciculines



Acétylcholine estérases



Canaux calcium

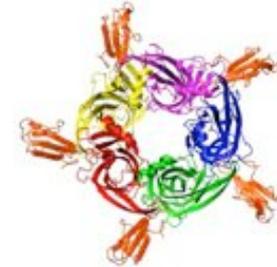
Calciseptines

Hemexstines



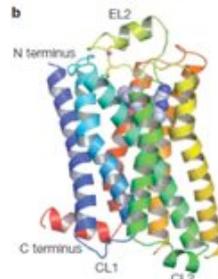
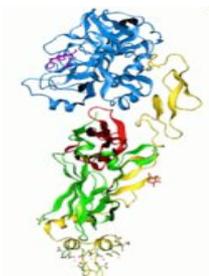
Toxines
aminergiques

Mambalgines

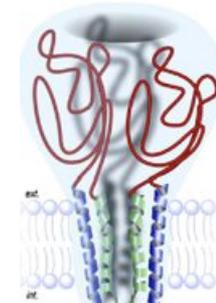


nAChR

Facteur VIIa



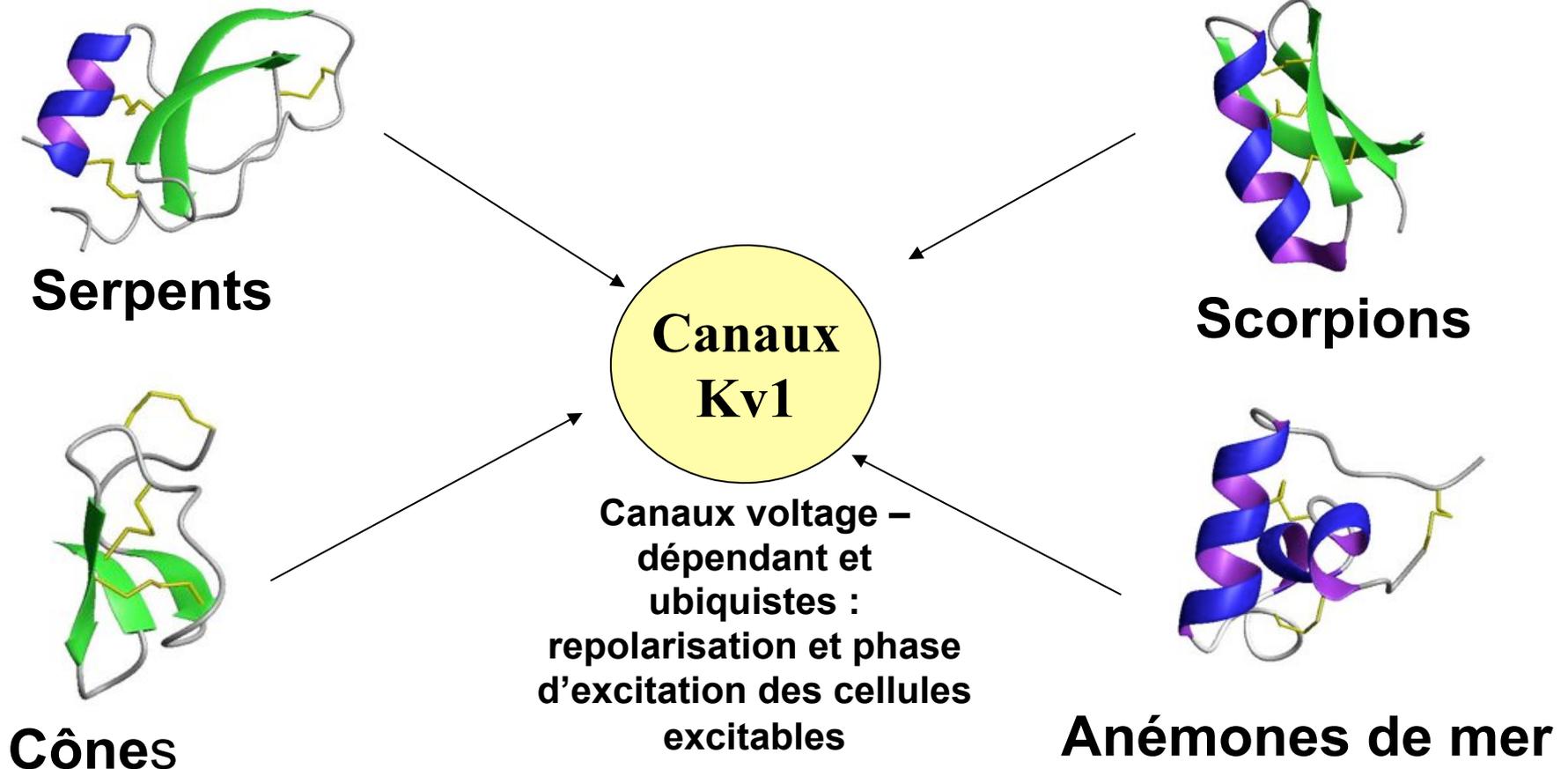
Récepteurs aux amines biogènes (acid sensing ion channels)



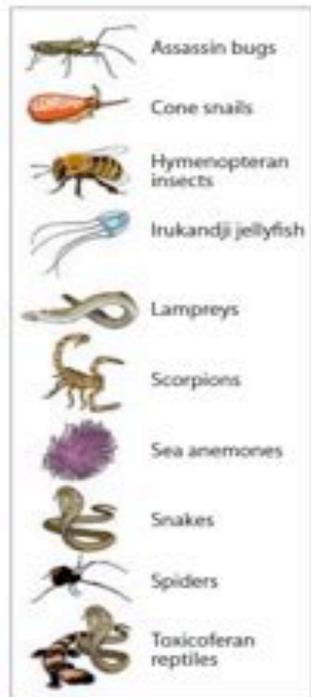
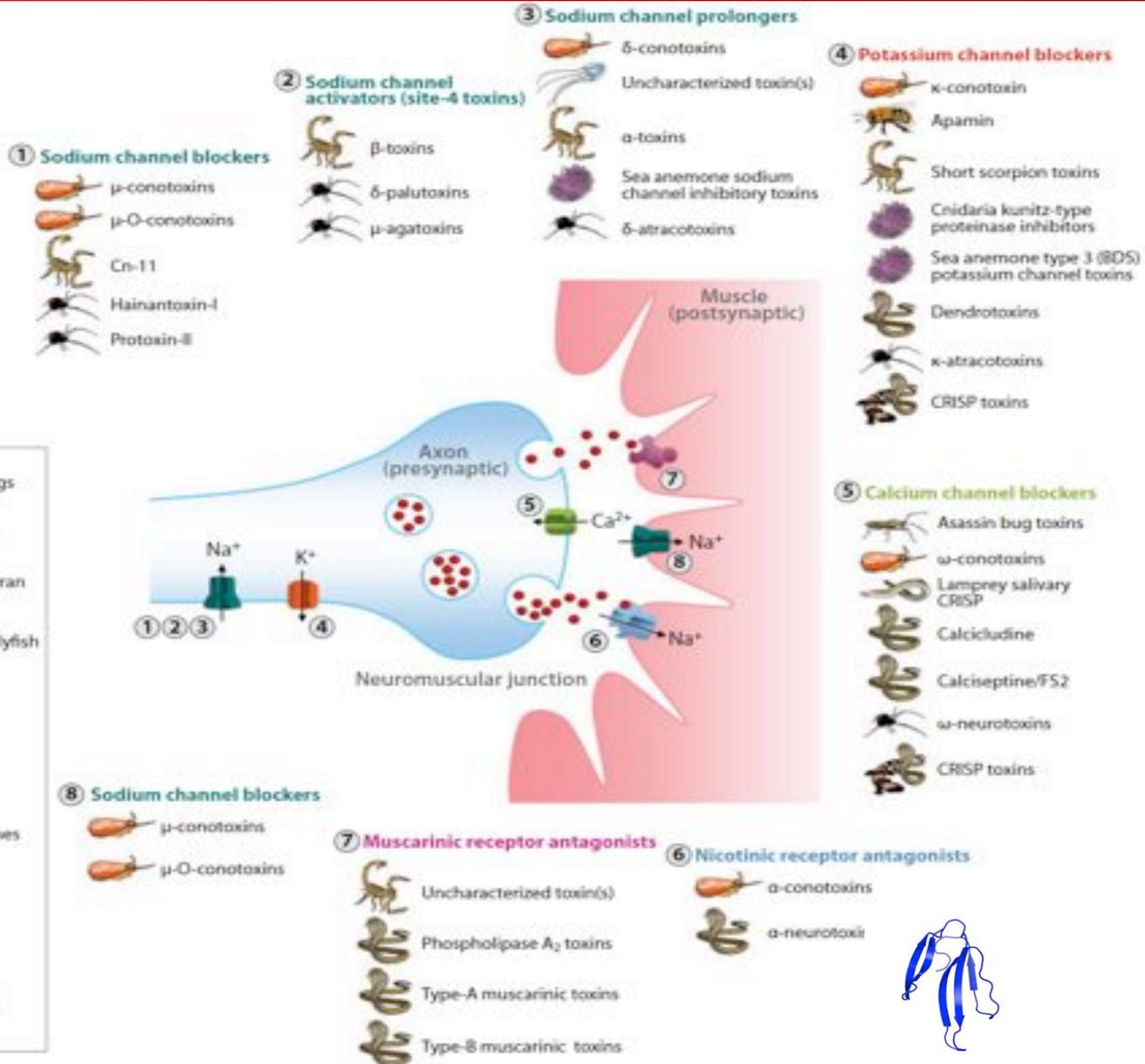
ASICs

Diversité structurale et convergence fonctionnelle : l'exemple de ligands de canaux ioniques

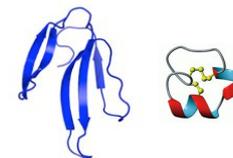
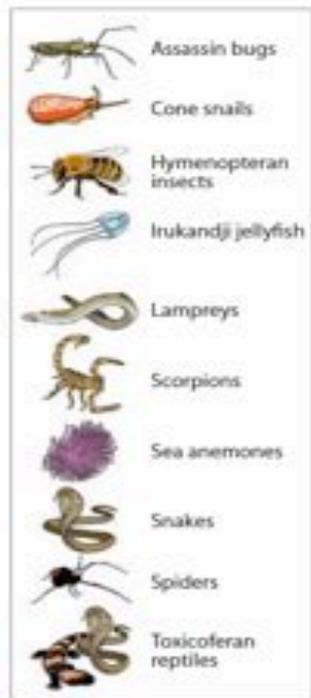
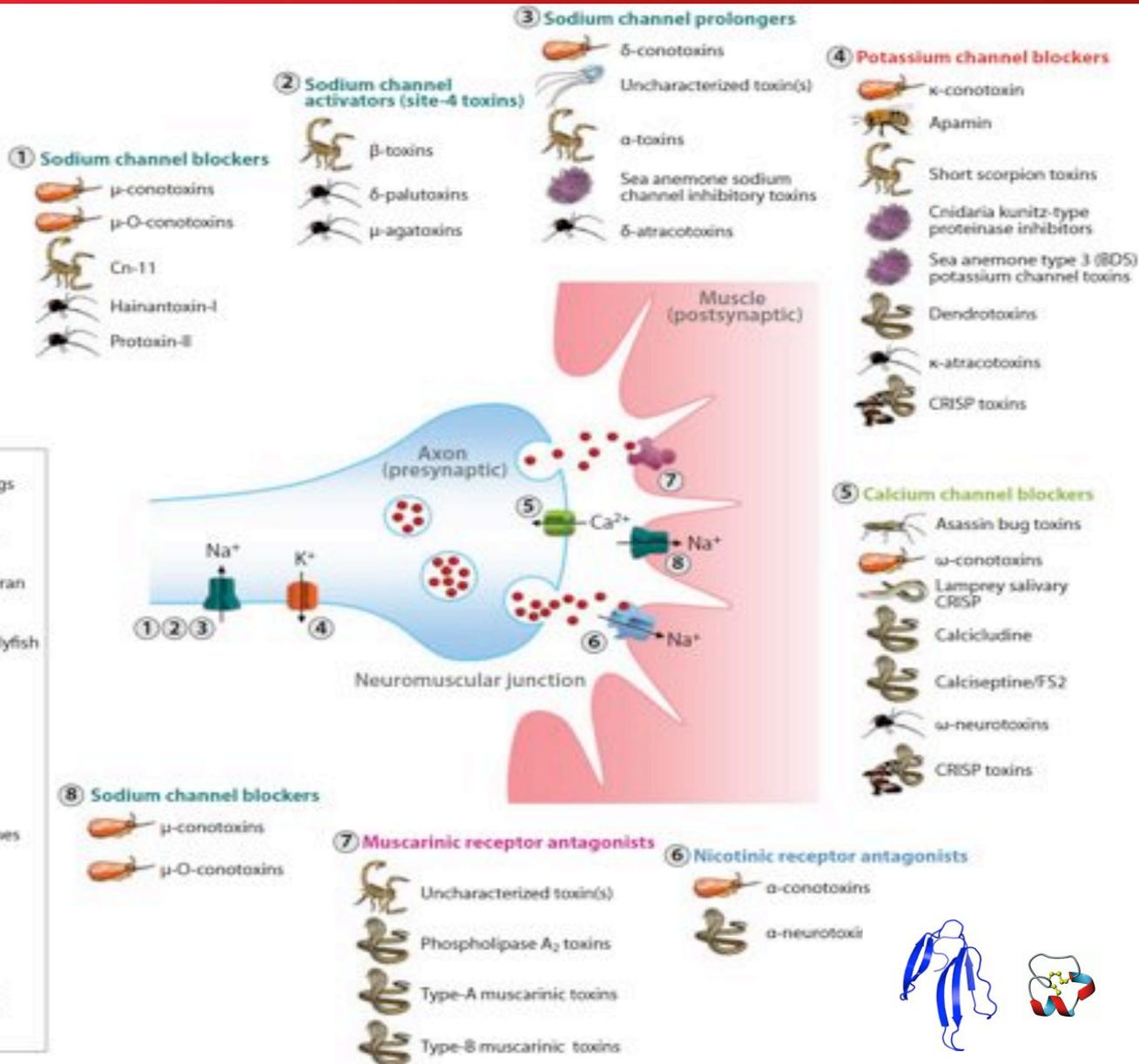
- *On observe également qu'un même mode d'action biologique peut être porté par différentes plateformes structurales !*



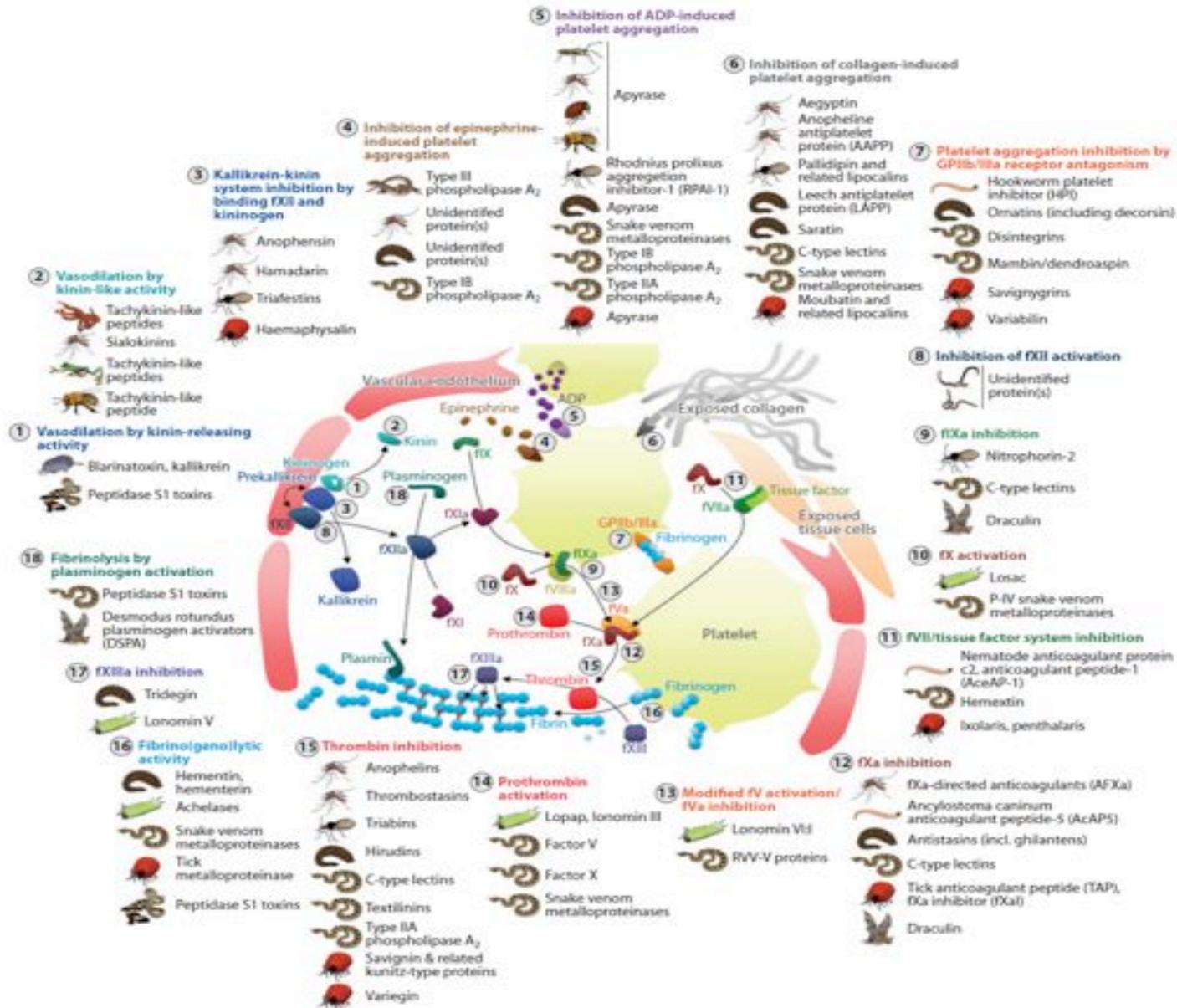
Convergence fonctionnelle/physiologique : La synapse neuromusculaire !



Convergence fonctionnelle/physiologique : La synapse neuromusculaire !



Convergence fonctionnelle/physiologique : le système sanguin !

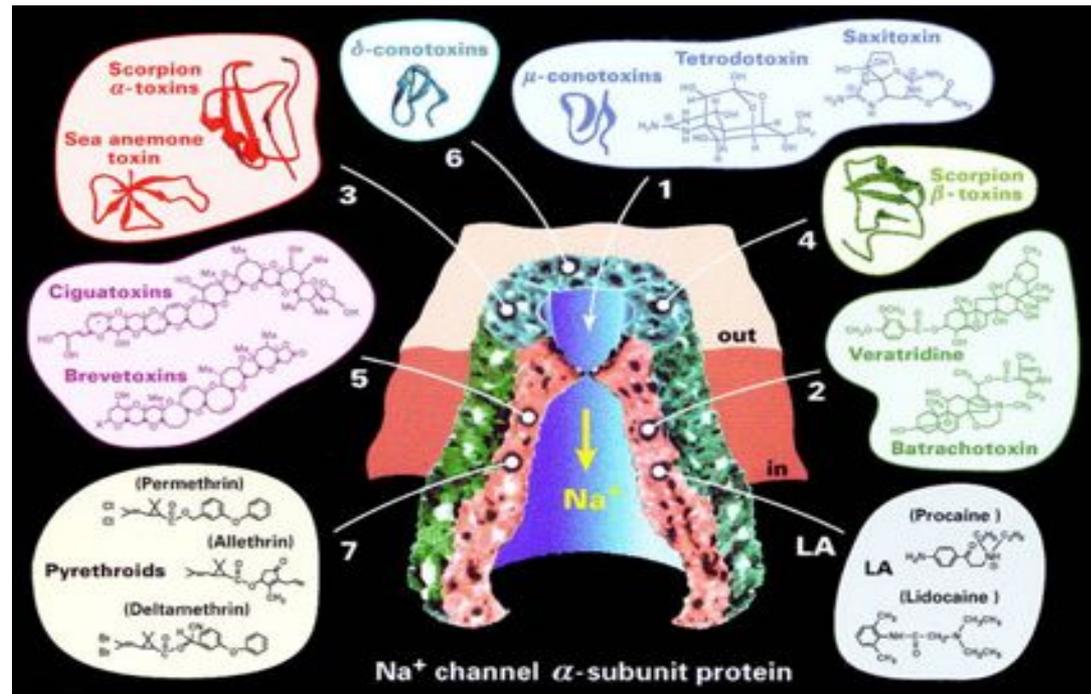


Propriétés :

- Forte affinité et sélectivité pour une cible
- Cible impliquée dans une voie biologique importante
- Marquage « facile » pour l'imagerie (peptide)
- Modifications recombinantes ou chimiques (aa non-naturels)

Utilisations :

- Compréhension des interactions moléculaires ligand/cible et du fonctionnement de la cible
- Localisation tissulaire des cibles (imagerie)
- Blocage spécifique d'une cible thérapeutique

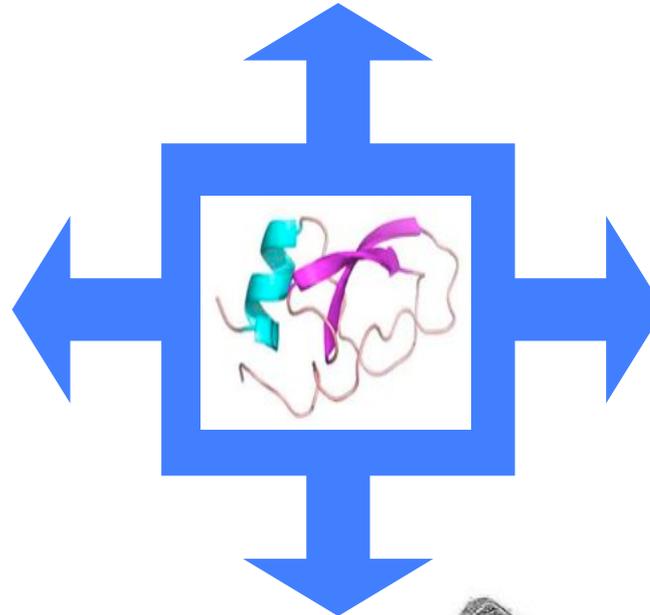


Les toxines : potentiel thérapeutique



Douleur

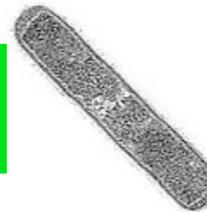
Système sanguin :
coagulation,
Vasoconstriction
dilatation)



Oncologie :
angiogenèse
cytoxicité...

→ Infections virales...

**Peptides
antimicrobiens**



Des toxines animales : plusieurs sont d'ores et déjà des médicaments !

Name	Peptide	Species	Target/ related protein	Disease	Clinical stage	Company
------	---------	---------	----------------------------	---------	----------------	---------

Synthetic/modified venom peptides

Prialt™ (SNX-111, Ziconotide)	ω-Conotoxin MVIIA	<i>Conus magus</i>	Voltage-Gated Ca ²⁺ Channels Ca _v 2.2	Severe chronic inflammatory and neuropathic pain associated with cancer and AIDS	Granted FDA Approval (Dec. 2004)	Elan Corporation (www.elan.com)
AM336	ω-Conotoxin CVID	<i>Conus catus</i>	Voltage-Gated Ca ²⁺ Channels Ca _v 2.2	Severe chronic pain associated with cancer	Phase II	Amrad Corporation (www.amrad.com.au)
ACV1	α-Conotoxin Vc1.1	<i>Conus victoriae</i>	Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors	Chronic neuropathic pain, and acceleration of recovery of injured neurons	Preclinical	Metabolic Pharmaceuticals (www.metabolic.com.au)
Xen2174	γ-Conotoxin γMrlA	<i>Conus marmoreus</i>	Norepinephrine transporter (NET)	Nociceptive and neuropathic pain	Phase I	Xenome Ltd (www.xenome.com)
	ρ-Conotoxin ρTIA	<i>Conus tulipa</i>	α ₁ -adrenoreceptor	Nociceptive and neuropathic pain	Preclinical	Xenome Ltd (www.xenome.com)
CGX-1160	Contulakin-G	<i>Conus geographus</i>	Neurotensin Receptor agonist	Short-term management of post-operative pain	Completed early Phase I	Cognetix Inc. (www.cognetix.com)
CGX-1007	Conantokin-G	<i>Conus tulipa</i>	NMDA receptors NR2B subtype	Nociceptive pain and control of seizures in intractable epilepsy	Phase II	Cognetix Inc. (www.cognetix.com)
TM-601	¹³⁵ I-Chlorotoxin	<i>Leiurus quinquestriatus</i>	Cl ⁻ channel	Brain tumors	Phase II	TransMolecular Inc. (www.transmolecular.com)
TM-701	I-Chlorotoxin	<i>Leiurus quinquestriatus</i>	Cl ⁻ channel	Chronic monotherapy and pharmaceutical sensitizer co-administered drug cocktails for cancer	Preclinical	TransMolecular Inc. (www.transmolecular.com)
Alfimeprase	Fibrolase	Southern copperhead viper (<i>Agkistrodon contortrix</i>)	Fibrin	Thrombolytic agent and catheter occlusion	Phase II	Nuvelo Inc. (www.nuvelo.com)
	Contortrostatin	Southern copperhead viper (<i>Agkistrodon contortrix</i>)	Integrin	Breast cancer	Preclinical	Pivotal Biosciences/ University of Southern California (www.pivotalbiosciences.com)
Exenatide	Exendin-4	Gila monster (<i>Heloderma suspectum</i>)	Glucagon-like peptide-1	Type-2 diabetes and related metabolic disorders		Amylin Pharmaceuticals (www.amylin.com)

Peptomimetics or small molecular weight derivatives

Capoten® (Captopril)		Brazilian arrowhead viper (<i>Bothrops jararaca</i>)	Angiotensin Converting Enzyme (ACE)	Antihypertensive	Granted FDA approval	Bristol-Myers Squibb (www.bms.com)
Integrilin® (Eptifibatide)		Southeastern pygmy rattlesnake (<i>Sistrurus millarius barbouri</i>)	Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor Inhibitors	Acute coronary syndrome (ACS) and for patients without ACS undergoing percutaneous coronary intervention	Granted FDA approval	Schering-Plough Millennium Pharmaceuticals (COR Therapeutics) (www.schering-plough.com) (www.millennium.com)
Aggrastat® (Tirofiban)		African saw-scaled viper	Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor Inhibitors	Acute coronary syndrome (ACS)	Approved for use with heparin and aspirin for the treatment of ACS	Merck (www.merck.com)
Viprinex™ (Ancrod)		Malaysian pit viper (<i>Agkistrodon rhodostoma</i>)		Heparin-induced thrombocytopenia	Phase III	Neurobiological Industries Inc. (www.ntii.com)
Exanta™ (Ximelagatran)		Cobra venom	Thrombin inhibitors	Atrial fibrillation and blood clotting after orthopedic surgery	Seeking FDA approval, sold in Europe	AstraZeneca (www.astrazeneca.com)
Delucemine (NPS 1506)		Spider venom toxin	NMDA blocker	Protection of brain cells from ischaemia	Phase I	NPS Pharmaceuticals (www.npsp.com)



Douleur

Oncologie

Diabète

Pression sanguine

Antithrombotiques

Un marché validé et important !



CAPOTEN[®] (Captopril)
AGGRASTAT[®] (Tirofiban)
INTEGRILIN[®] (Eptifibatide)

(>10 bn\$)
(337 m\$ 2007)
(71 m\$ 2007)



BYETTA[®] (Exenatide)

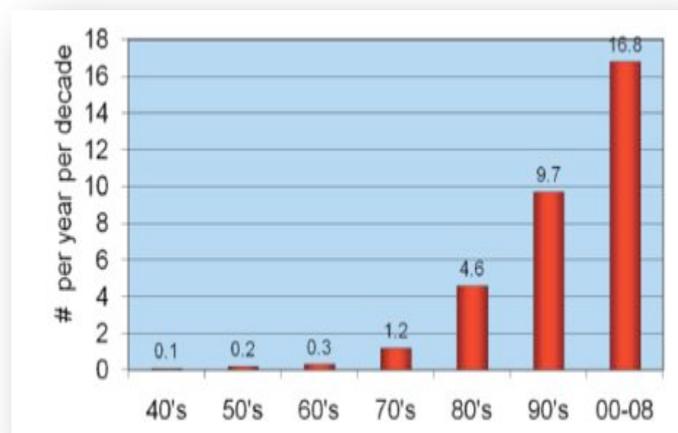
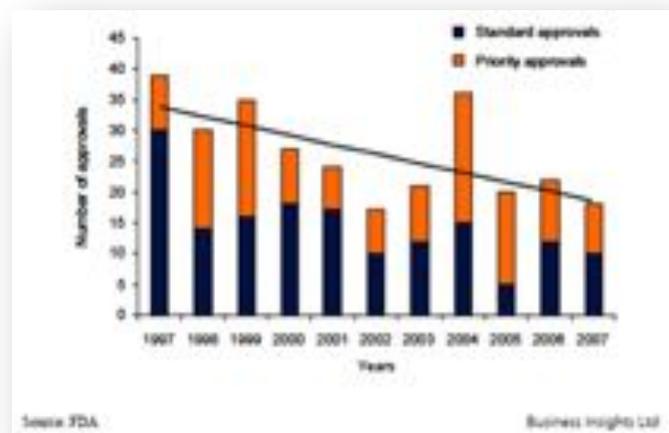
(> 1.2 bn\$)



PRIALT[®] (Ziconotide)

(25 m\$ 2010)

Pourquoi étudier/explorer les venins ?



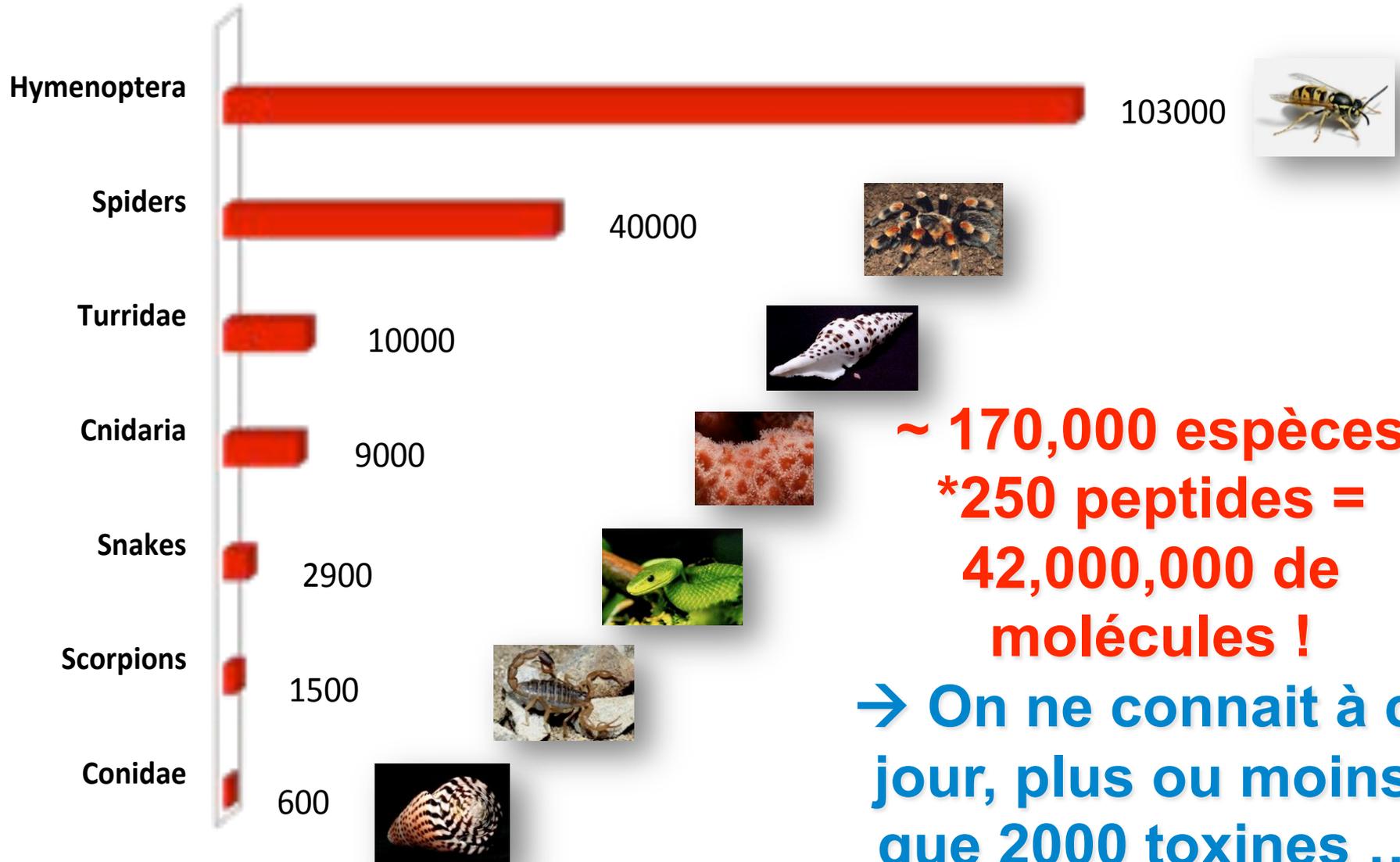
Il y a besoin de nouvelles molécules thérapeutiques



Les molécules thérapeutiques de nature peptidique ou protéique ne cessent de croître !

Les venins constituent donc une ressource naturelle immense en molécules bio-optimisées et bio-actives !

Les venins : une ressource immense !!



**~ 170,000 espèces
*250 peptides =
42,000,000 de
molécules !**

**→ On ne connaît à ce
jour, plus ou moins,
que 2000 toxines ...**

Comment explorer cette ressource !?

- **LES STRATÉGIES ET APPROCHES MISES EN ŒUVRE ONT ÉVOLUÉ AU COURS DES 50 DERNIÈRES ANNÉES !!**
- **ÉVOLUTIONS TECHNOLOGIQUES**
- **ÉTUDES INDIVIDUELLES, CIBLÉES... (ANNÉES 1960 À 2000)**
- **STRATÉGIES PLUS GLOBALES, MASSIVES : LES TECHNOLOGIES « OMIQUES »... (ANNÉES 2000...)**

À partir de 1950... l'ère des enzymes

Techniques de biochimie « classiques »

- Etudes électrophorétiques / chromatographie sur papier
- Etudes enzymatiques (1^{ères} ribonucléases de serpents en 1952 !)
- Etudes physiologiques (pression sanguine, système nerveux)
- Immunité et traitement (sérum antivenimeux, cross-neutralisation)
- Début de l'isolement de toxines (1960)

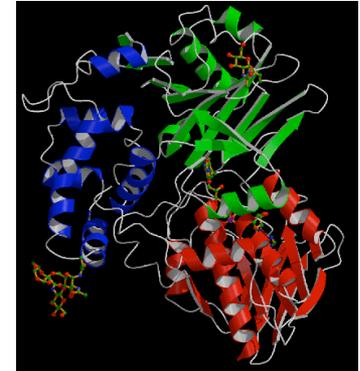
Isolation of the neurotoxic component of the venom of the sea snake, *Enhydrina schistosa*.
CAREY JE, WRIGHT EA.
Nature. 1960 Jan 9;185:103-4.



Studies on sea-snake venoms. Crystallization of erabutoxins a and b from *Laticauda semifasciata* venom.
Tamiya N, Arai H.
Biochem J. 1966 Jun;99(3):624-30



« Tricot rayé »



L-amino acide oxydase

Proceedings of the National Academy of Sciences
Vol. 67, No. 3, pp. 1241-1247, November 1970

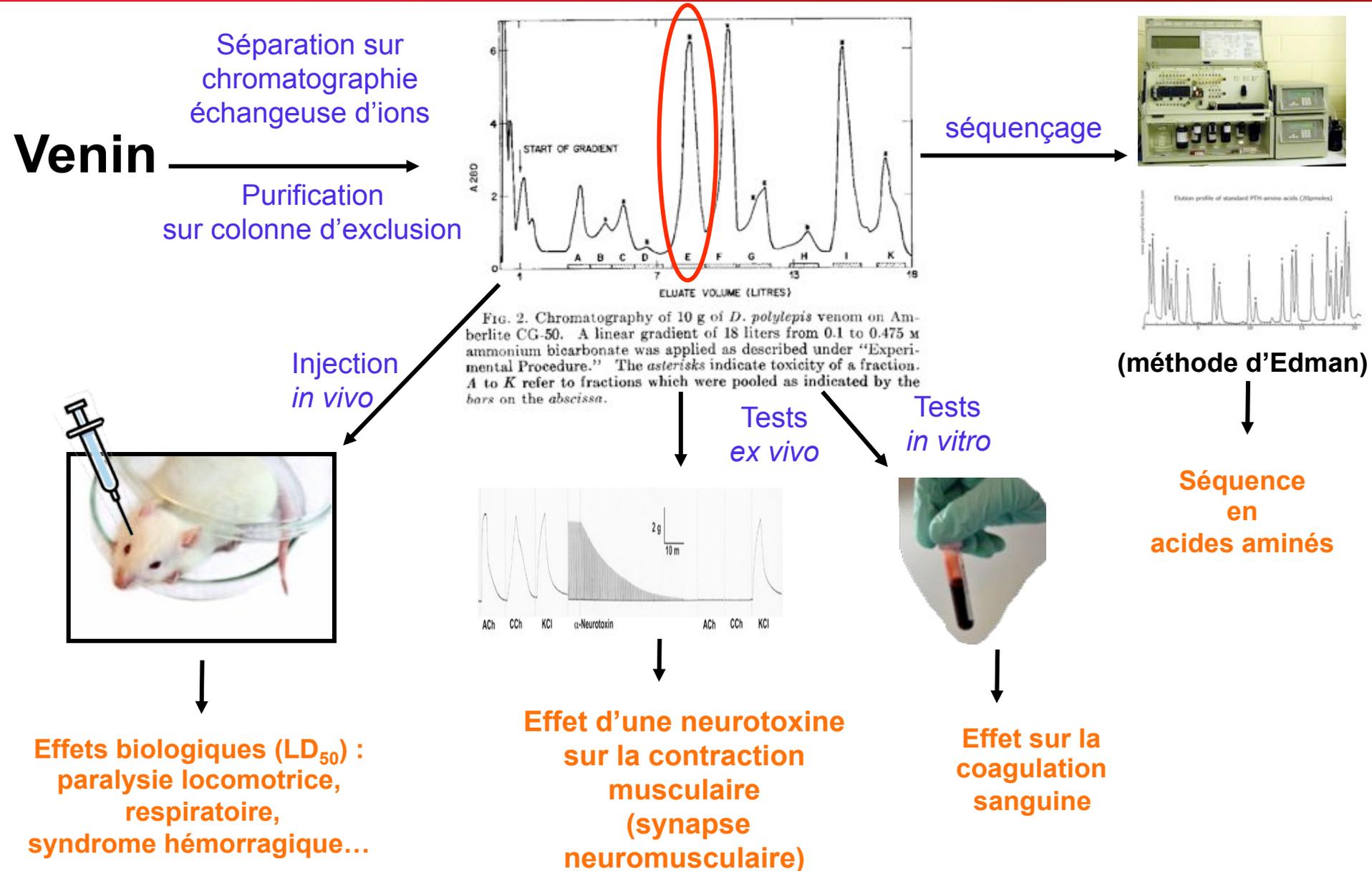
Use of a Snake Venom Toxin to Characterize the Cholinergic Receptor Protein*

Jean-Pierre Changeux†, Michiki Kasai‡, and Chen-Yuan Lee‡

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE, INSTITUT PASTEUR, PARIS†; AND PHARMACOLOGICAL INSTITUTE, COLLEGE OF MEDICINE, NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY, TAIPEI, CHINA‡

Communicated by Jacques Monod, July 30, 1970

Les années 70-80 : étudier l'origine de la toxicité des venins



Les années 70-80

Venin → Séquences → Fonctions ?

Short
neurotoxins

Laticauda semifasciata (Ec) RIC--FNRQSSQFQTT-KTCSFGESSCYHKQMSD----FRGTIIERGGG--CPVVKP-GIKLSCCSESEVCMN
Laticauda semifasciata (Eb) RIC--FNRQSSQFQTT-KTCSFGESSCYHKQMSD----FRGTIIERGGG--CPVVKP-GIKLSCCSESEVCMN
Laticauda semifasciata (Ea) RIC--FNRQSSQFQTT-KTCSFGESSCYHKQMSD----FRGTIIERGGG--CPVVKP-GIKLSCCSESEVCMN
Laticauda laticaudata (La) RRC--FNRPSSQFQTN-KSCPPGENSCYHKQMRD----HRGTITERGGG--CPVVKP-GIKLTCQSQSEDCMN
Laticauda laticaudata (La') RRC--FNRPSSQFQTN-KSCPPGENSCYHKQMRD----HRGTITERGGG--CPQVKS-GIKLTCQSQSDDCMN
Naja sputatrix (toxin α) LAC--HNQSSSQFPTT-KTCSFGETHCYKKVMRD----HRGTIIERGGG--CPVVKP-GIKLACCTTTHCMN
Naja atra (cobrotoxin) LAC--HNQSSSQFPTT-TCCSGETHCYKKVMRD----HRGTITERGGG--CPVVKM-GIEINCCCTTTHCMN
Naja nigricollis (neurotoxin α) LEC--HNQSSSQFPTT-KTC-PGETHCYKKVMRD----HRGTIIERGGG--CPVVKP-GIKLACCTTTHCMN
Naja melanoleuca (neurotoxin D) MEC--HNQSSSQFPTT-KTC-PGETHCYKKQMSD----HRGTIIERGGG--CPVVKK-GVKINCCCTTTHCMN
^{*)} *Naja haje annulifera* (toxin CM-10) MTC--YHQSSQLQFPIT-TVC-PGEKHCYKKQMSG----HRGTIIERGGG--CPVVKK-GIEINCCCTTTHCMN
^{*)} *Dendroaspis jamesoni kaimosae* (toxin I) RIC--YHQSTTPPATY-KSC--GENSCYKKTWSD----HRGTIIERGGG--CPKVKQ-GIHLHCCQSDSCMN
^{*)} *Astrotia stokesii* (toxin A) MTC--CNQSSSQFKTT-TMC--AGNSCYKKTWSD----HRGTIIERGGG--CPQVKS-GIKLECCHTNECMN
^{*)} *Hydrophis ornatus* (toxin * 73a) MTC--CNQSSSQFKTT-TMC--AGNSCYKKTWSD----HRGTIIERGGG--CPQVKS-GIKLECCHTNECMN
^{*)} *Hydrophis ornatus* (toxin * 75a) MTC--CNQSSSQFKTT-TMC--AESSCYKKTWRD----FRGTIERGGG--CPQVVKP-GIKLECCHTNECMN
^{*)} *Aipysurus laevis* (short neurotoxin A) LTC--CNQSSSQFKTT-TLC--ADNSCYKKTWQD----HRGTIERGGG--CPQVVKP-GIKLECCHTNECMN
^{*)} *Aipysurus laevis* (short neurotoxin C) LTC--CNQSSSQFKTT-TDC--ADNSCYKKTWMD----HRGTIERGGG--CPQVVKP-GIKLECCHTNECMN
^{*)} *Aipysurus laevis* (short neurotoxin B) LTC--CNQSSSQFKTT-TDC--ADNSCYKKTWRD----HRGTIERGGG--CPQVVKP-GIKLECCHTNECMN
^{*)} *Naja haje haje* (toxin CM-2) FTC--FTTPT---DTS-ETCPDQNIICYEKRMIS----HQGVEI-KGCVASCPFEFESRERYLLCCRIIDNCRK
^{*)} *Ophiophagus hannah* (neurotoxin) TRC--YHQSTTFETT-EICPDGGYCYKSSMID----GREGRIERGCTFTCPELTPGKVVYCCSRDECMQ

Long
neurotoxins

^{*)} *Boiga irregularis* (iridotoxin chain A) QAVGPPYTLCEFCNENHTSSDCSTALRC--YRGSCTYLKRPDE--NCELSWAVKGCNETCPYAGP-NERVKCCSRPRCND
^{*)} *Boiga irregularis* (iridotoxin chain B) QARGPPYTLCEFCNERTCSMCFKDNRCPPYHRTCYTLKRPDG--NGEMWAVKGCANTCPYAGP-GESVCCMTPKONDY
^{*)} *Boiga dendrophila* (denmotoxin) QAVGLPHGFTQCNKRTWSMCSIGHRCPLPYHMTCYTLKRPDE--NGEMWAVKGCAPMCPYAKS-GERVKCCSTGASQMSD
^{*)} *Laticauda semifasciata* (LsIII) REC--YLG----FHDT-QTCSGQEI CYVKSWCNACSSRGRVLEFGCAATCPVHT-GTEINCCSADKQNTYP
^{*)} *Astrotia stokesii* (toxin B) LSC--YLG----YKHS-QTCSPPGENVCFVKTWCDGFCNTRGERIHWGCAATCPYAKS-GVHLACCSTDNQNTYASNGS
^{*)} *Astrotia stokesii* (toxin C) LSC--YLG----YKHS-QTCSPPGENVCFVKTWCDAPFCSTRGERIHWGCAATCPYAKS-GVHLACCSTDNQNTYASNGS
^{*)} *Bungarus multicinctus* (α-bungarotoxin) IVC--HTTATS-PI SA-VTCSPPGENLCYRKHWCDADFSSRGRVLEFGCAATCPSEKP-YEIVTCCSTDNQNTYASNGS
^{*)} *Dendroaspis polylepis* (toxin γ) RIC--NRTF---SDQS-KICPPGENICYTKTWCDAMWCSQRGRVLEFGCAATCPKVA-GVEIFCCSTDNQNTYASNGS
^{*)} *Naja naja siamensis* (α-cobrotoxin) IPC--FITP---DITS-KDCPMG-HVCTYKTWCDAPCSIRGRVLDGCAATCPVKT-GVDIACCSTDNQNTYASNGS

Les années 70-80

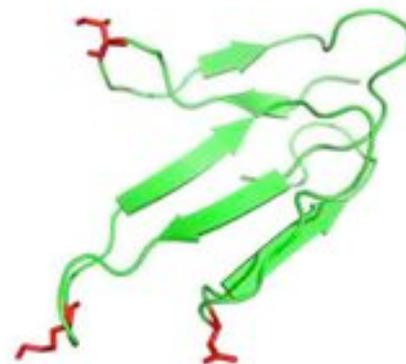
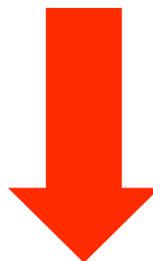
Comprendre l'origine de la toxicité des venins : **isoler les toxines**

Venin



- Toxines **majoritaires** et **minoritaires**
- Quantités limitées
- Contaminations lors des purifications

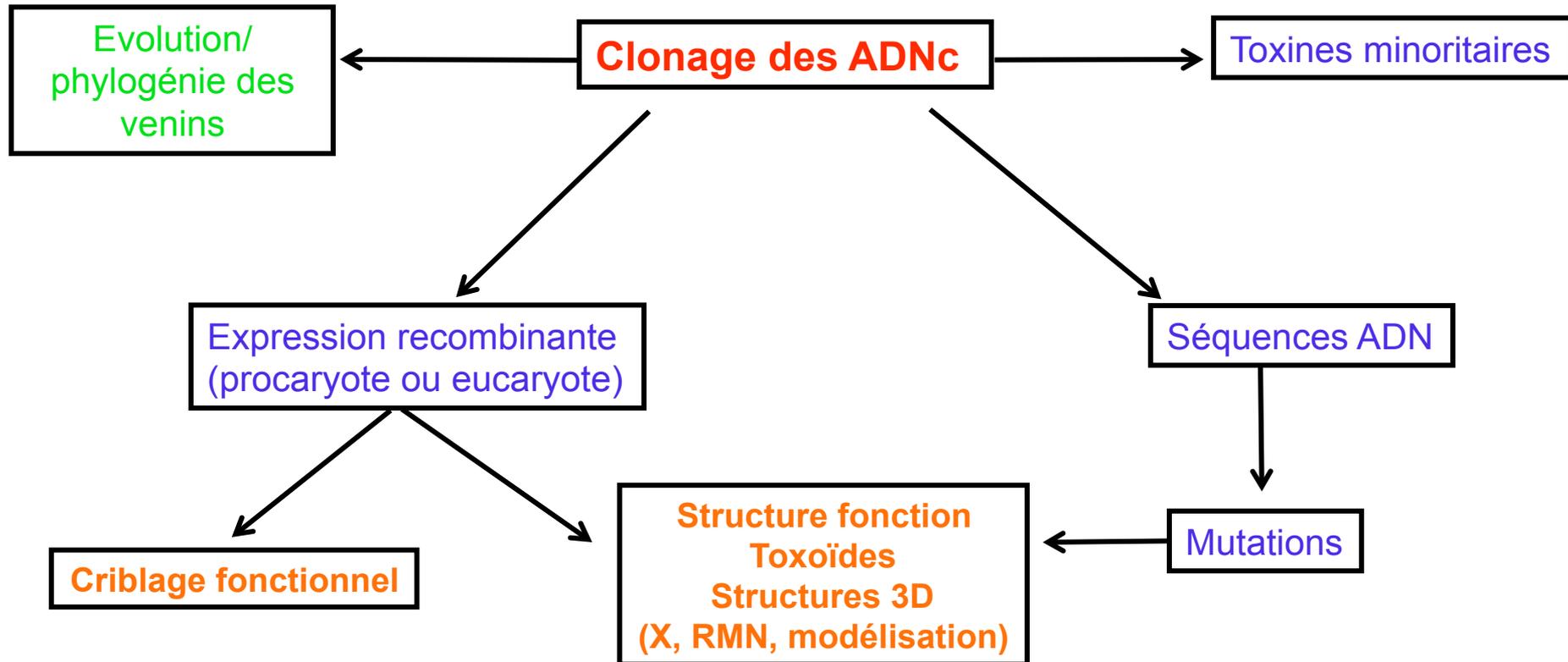
Pas de **système efficace de production** des toxines
Mutagénèses/modifications **très limitées** (modifications chimiques)



**Compréhension moléculaire des interactions toxines/cibles
très limitée...**

→ La **biologie moléculaire** entre en jeu...

- Accéder aux séquences des **précurseurs** (ARNm) des toxines
- Maîtriser leur **expression**





→ Les précurseurs des toxines animales

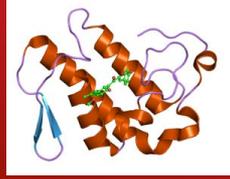
```

TCCGAAAAGATCGCAAG ATG AAA ACT CTG CTG CTG ACC TTG GTG GTG GTG 51
      M   K   T   L   L   L   T   L   V   V   V
ACA ATC GTG TGC CTG GAC TTA GGA TAC ACC AGG ATA TGT TTT AAC CAT 99
  T   I   V   C   L   D   L   G   Y   T   R   I   C   F   N   H
CAG TCA TCG CAA CCG CAA ACC ACT AAA ACT TGT TCA CCT GGG GAG AGC 147
  Q   S   S   Q   P   Q   T   T   K   T   C   S   P   G   E   S
TCT TGC TAT AAC AAG CAA TGG AGC GAT TTC CGT GGA ACT ATA ATT GAA 195
  S   C   Y   N   K   Q   W   S   D   F   R   G   T   I   I   E
AGG GGA TGT GGT TGC CCC ACA GTG AAG CCC GGT ATT AAA CTC AGT TGT 243
  R   G   C   G   C   P   T   V   K   P   G   I   K   L   S   C
TGC GAA TCA GAG GTC TGC AAC AAT TAG CTCTACGAGTGGCTAAATTCCTTGAGT 297
  C   E   S   E   V   C   N   N   stop
TTTACTCTCATTCATCAAGGACCATCCTTCAAATGTATGCTTCTGGCCTTTACCACCACATG 360
GTCCATCATCCCCCTCTCCCCTGCTGTCTTTGACACCTCAACATCTTTCCCTTTTCTCTTGAT 423
CTGTAAGTTTCCTTCTGCTAGTTCTGTAGTTTGAGAATCAAATAAACCTCAGCATTCAAAAAA 486
AAAAA507

```

Précurseur de l' érabutatoxine a de *Laticauda semifasciata* (Tamiya *et al*, 1985).

La séquence signale est soulignée. Le site de poly-adénylation est souligné et en italique.

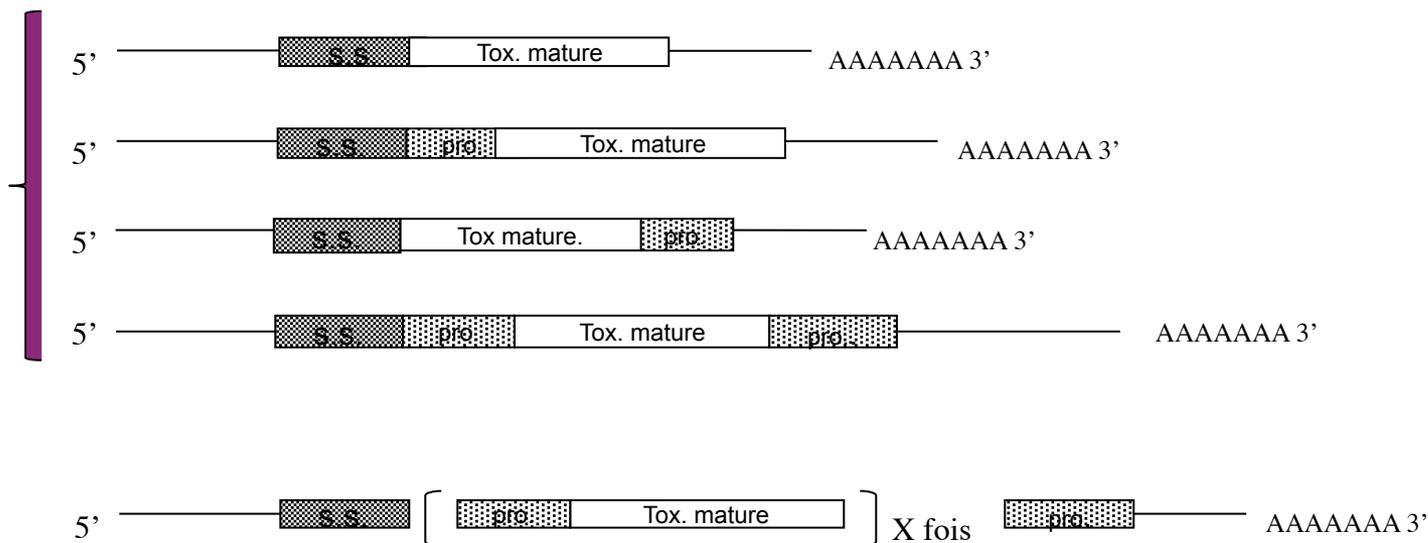


→ Les précurseurs des toxines animales

TGCAGCTTCACCACTGACAAA	ATG	TAT	CCT	GCT	CAC	CTT	CTG	GTC	CTG	TTG	51					
	<u>M</u>	<u>Y</u>	<u>P</u>	<u>A</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>L</u>						
GCA	GTT	TGT	GTC	TCC	CTC	TTA	GGA	GCC	GCC	AGC	ATT	CCT	CCG	CTG	CCT	99
<u>A</u>	<u>V</u>	<u>C</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	
CTC	AAC	GTC	GCA	CAA	TTC	GAC	AAC	ATG	ATT	GAA	TGT	GCC	AAC	TAT	GGC	147
<i>L</i>	<i>N</i>	<i>V</i>	<i>A</i>	<i>Q</i>	<i>F</i>	<i>D</i>	<i>N</i>	<i>M</i>	<i>I</i>	<i>E</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>N</i>	<i>Y</i>	<i>G</i>	
AGT	CGA	CCT	TCT	TGG	CAT	TAT	ATG	GAG	TAC	GGT	TGC	TAT	TGC	GGC	AAA	195
<i>S</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>S</i>	<i>W</i>	<i>H</i>	<i>Y</i>	<i>M</i>	<i>E</i>	<i>Y</i>	<i>G</i>	<i>C</i>	<i>Y</i>	<i>C</i>	<i>G</i>	<i>K</i>	
GAA	GGT	AGC	GGG	ACT	CCG	GTA	GAT	GAG	TTG	GAT	AGG	TGC	TGC	AAA	GCA	243
<i>E</i>	<i>G</i>	<i>S</i>	<i>G</i>	<i>T</i>	<i>P</i>	<i>V</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>L</i>	<i>D</i>	<i>R</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>K</i>	<i>A</i>	
CAT	GAC	GAC	TGC	TAT	ACT	GAA	GCC	GAA	AAA	CGA	AGA	TGC	CAC	CCC	AAG	291
<i>H</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>C</i>	<i>Y</i>	<i>T</i>	<i>E</i>	<i>A</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>C</i>	<i>H</i>	<i>P</i>	<i>K</i>	
TTC	TCG	GCA	TAT	AGT	TGG	AAA	TGT	GGC	AGC	GAT	GGA	CCC	ACC	TGC	GAT	339
<i>F</i>	<i>S</i>	<i>A</i>	<i>Y</i>	<i>S</i>	<i>W</i>	<i>K</i>	<i>C</i>	<i>G</i>	<i>S</i>	<i>D</i>	<i>G</i>	<i>P</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	
CCA	GAA	ACG	GGG	TGT	AAA	CGT	ACT	GTG	TGT	GAT	TGT	GAT	GCC	ACA	GCA	387
<i>P</i>	<i>E</i>	<i>T</i>	<i>G</i>	<i>C</i>	<i>K</i>	<i>R</i>	<i>T</i>	<i>V</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>A</i>	
GCC	AAG	TGC	TTT	GCC	AAA	GCC	CCT	TTC	AAC	CAG	GCA	AAC	TGG	AAT	ATC	435
<i>A</i>	<i>K</i>	<i>C</i>	<i>F</i>	<i>A</i>	<i>K</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>N</i>	<i>Q</i>	<i>A</i>	<i>N</i>	<i>W</i>	<i>N</i>	<i>I</i>	
GAC	ACC	GAG	ACA	CAT	TGC	CAA	TGA	TATTTGAGAGGCTTCAGCGCAAGGACTGTGG	490							
<i>D</i>	<i>T</i>	<i>E</i>	<i>T</i>	<i>H</i>	<i>C</i>	<i>Q</i>	end									
CAGTTACTCACCTGCGCGTGGCAATTCTCTGGATGGGCCTCTATTATATATATAAAAAATAGAA	553															
CATTATATATATATAATTATTAAAAACAAAAGGAAGTTCCTGAACAATAAAGTGAGGTG	616															
CCGATAACCGGAAAAAAA	634															

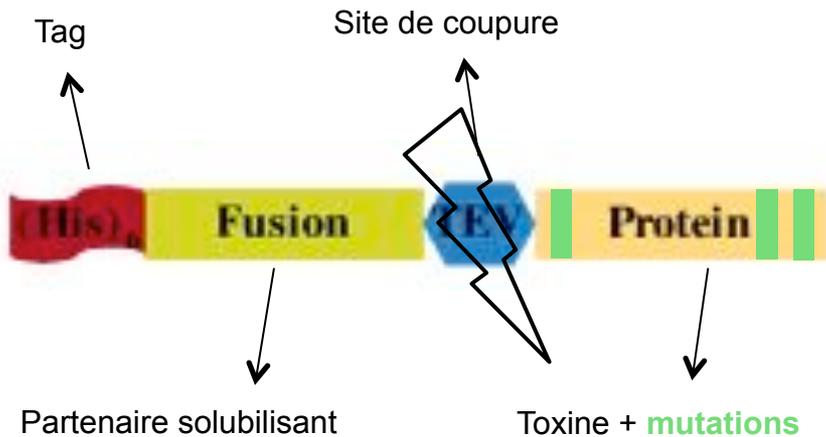
Précurseur de la PLA₂ 24' 2 de *Notechis scutatus scutatus* (Ducancel *et al.*, 1991).
La séquence signal est soulignée. Le pro-peptide est en italique. Le site de polyadénylation est souligné et en italique.

→ Les précurseurs des toxines animales



- ☞ *Disposer du matériel génétique nécessaire aux études structure/ fonction.*
- ☞ *Déterminer la séquence en acides aminés des toxines de haut poids moléculaire.*
- ☞ *Étudier la structure et l'organisation des précurseurs des formes matures des toxines :*
 - ⇒ existence de formes pré? pré-pro?
 - ⇒ précurseurs mono- ou poly-cistroniques ?
 - ⇒ mise en évidence d'évènements de maturation post-traductionnelle particuliers ?
 - ⇒ comparaison des précurseurs : ➡ processus évolutifs ?

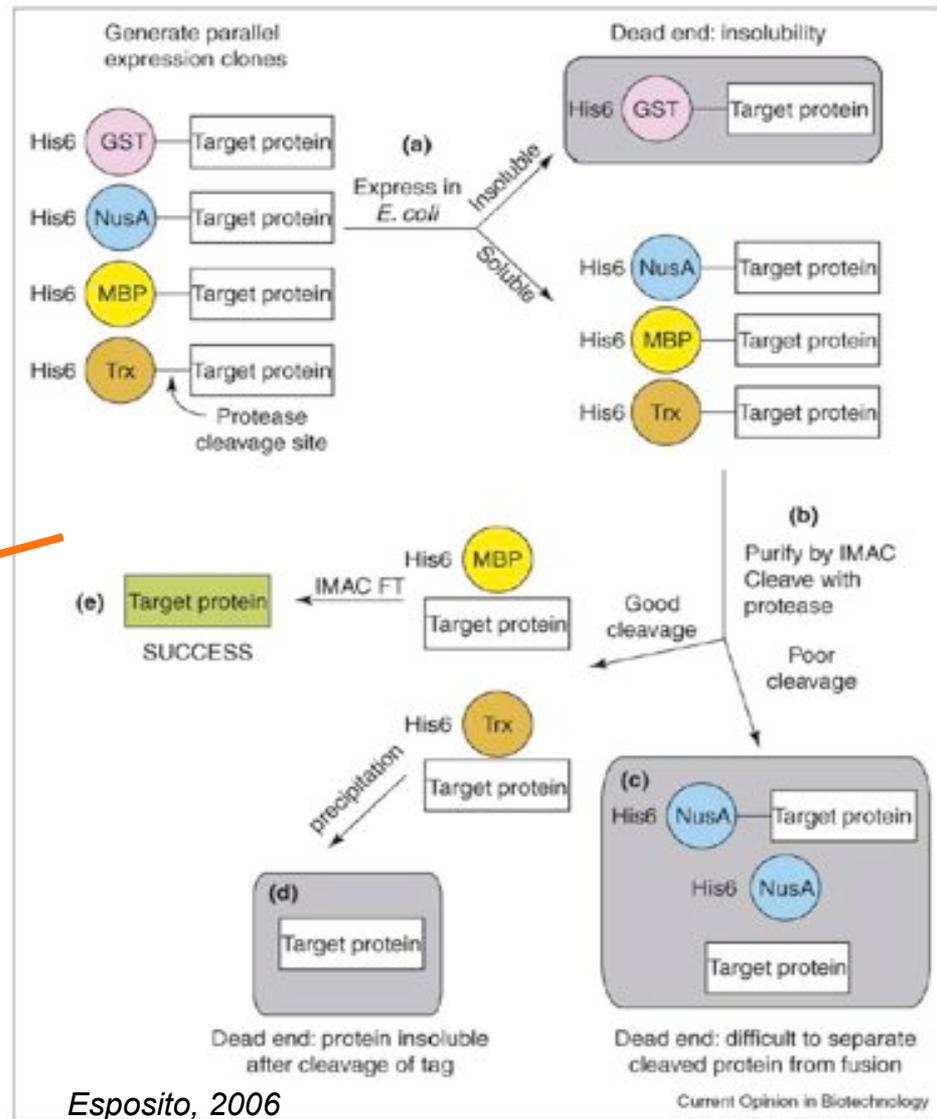
→ Production de toxines par voie recombinante



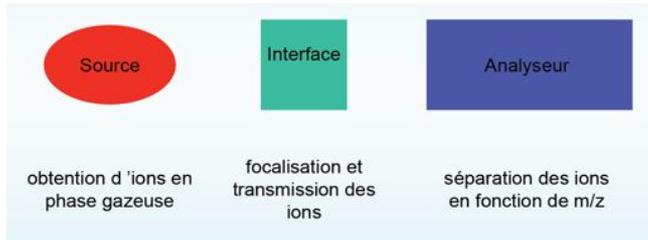
Oxydation de la toxine et purification de la forme oxydée (RP-HPLC)



Comprendre les bases moléculaires des interactions pour créer de nouvelles molécules aux propriétés choisies

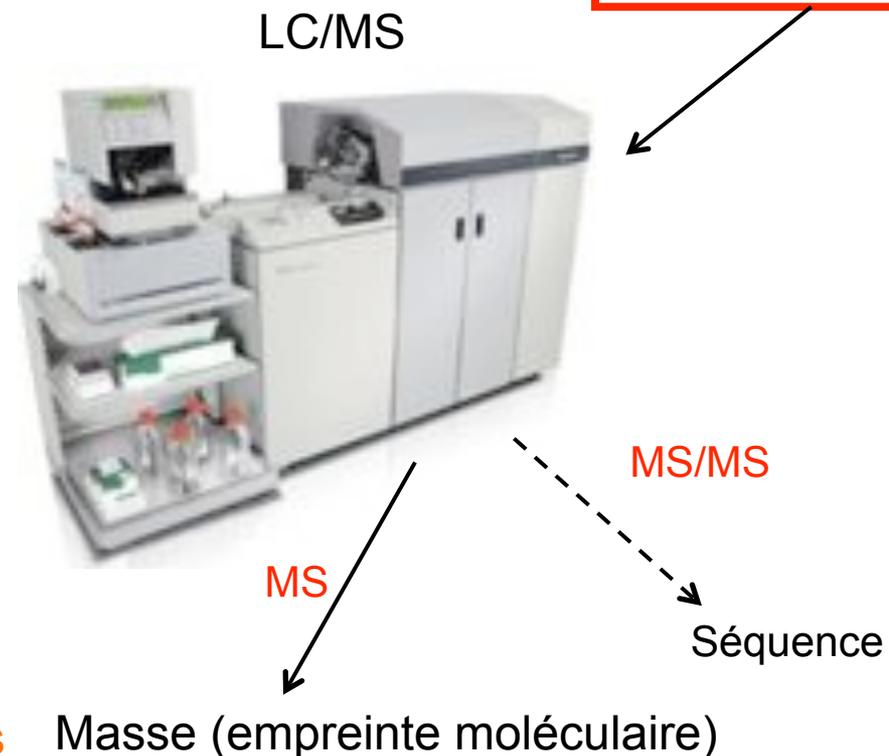


→ La spectrométrie de masse : analyses protéomiques



L'ionisation laser assistée par matrice (MALDI) } Utilisées en Douce
L'électronébulisation (electrospray: ES ou ESI) } PROTEOMIQUE Douce

Quantités faibles



Accès aux :

- Peptides et protéines produits
- modifications post-traductionnelles

→ **Rapide et prometteur mais gros investissement financier...**

→ La spectrométrie de masse : analyses protéomiques

JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY
J. Mass Spectrom. 2008; **43**: 279–295
Published online in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/jms.1389

JMS

**SPECIAL FEATURE:
PERSPECTIVE**

Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry

P. Escoubas,^{1*} L. Quinton² and G. M. Nicholson³

RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY
Rapid Commun. Mass Spectrom. 2004; **18**: 1024–1032
Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/rcm.1442

RCM

Nanospray analysis of the venom of the tarantula *Theraphosa leblondi*: a powerful method for direct venom mass fingerprinting and toxin sequencing

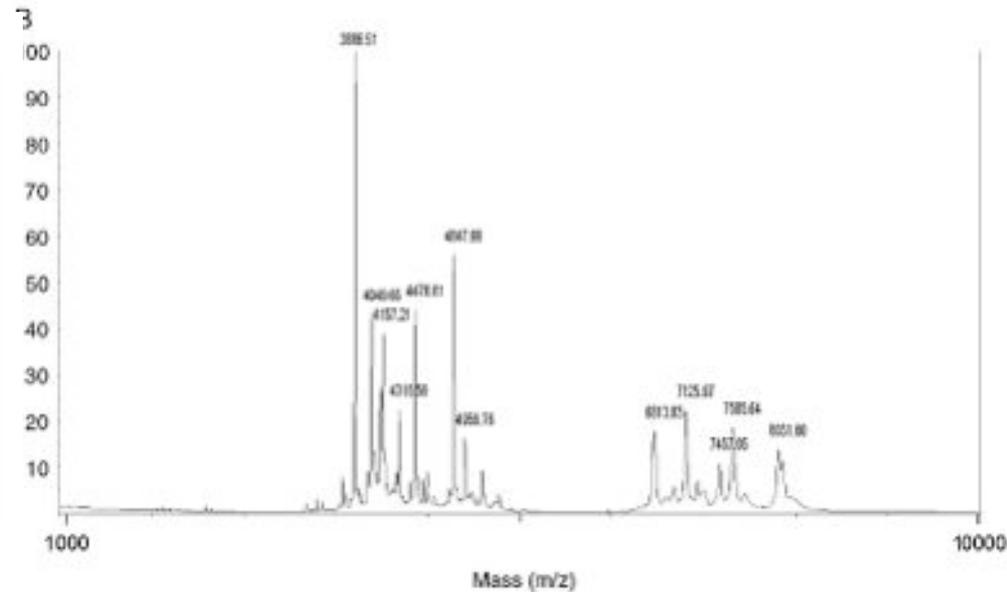
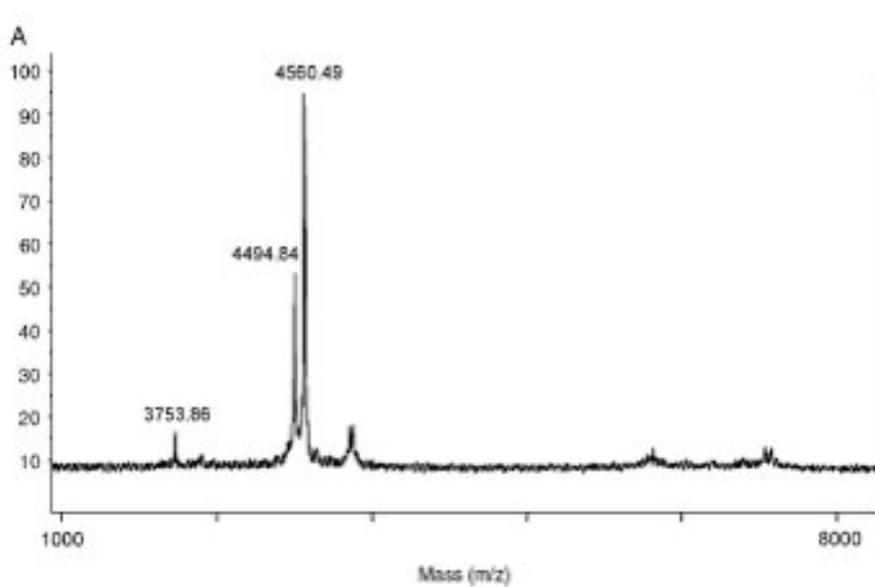
Christian Legros¹, Marie-Louise Célérier², Maud Henry^{3†} and Catherine Guette^{3*}

JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY
J. Mass Spectrom. 2004; **39**: 548–557
Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jms.624

JMS

Determining sequences and post-translational modifications of novel conotoxins in *Conus victoriae* using cDNA sequencing and mass spectrometry

→ La spectrométrie de masse : empreinte moléculaire du venin



Brachypelma vagans

Empreinte d'un venin

≠

Interspécifique
Intra-spécifique
Individuelle...



Hadronyche versuta

→ La spectrométrie de masse : empreinte moléculaire du venin

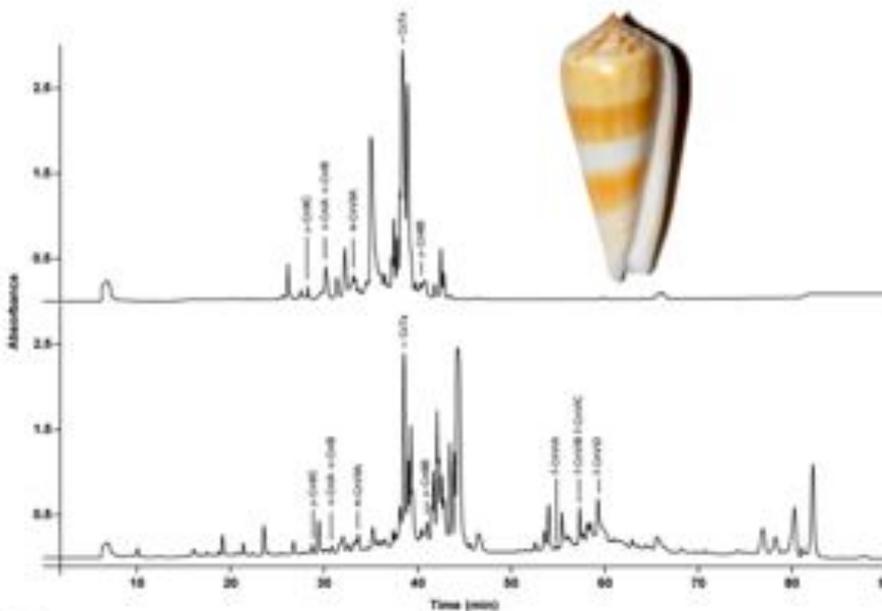
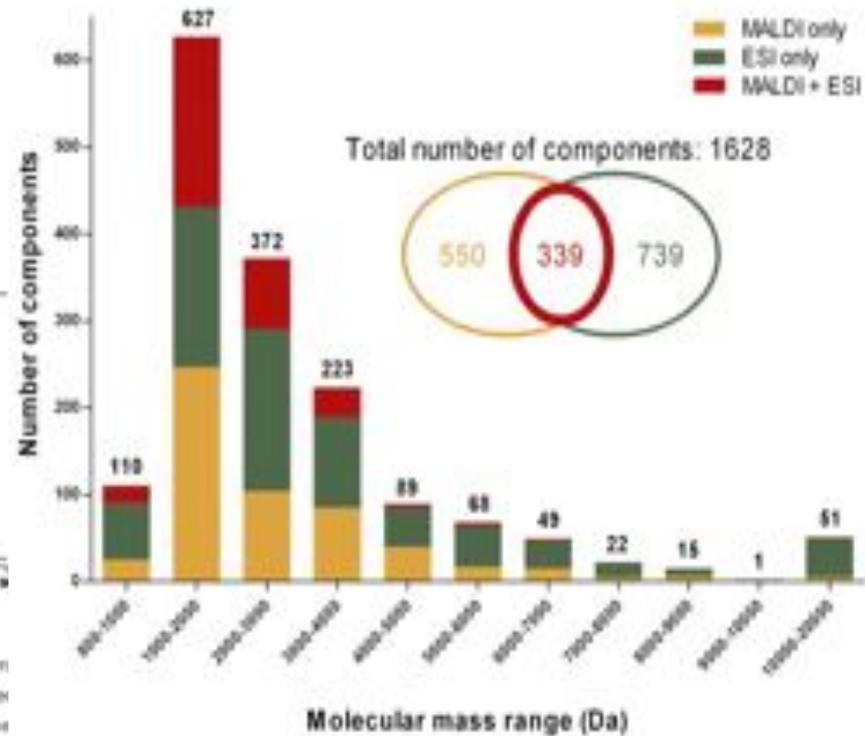


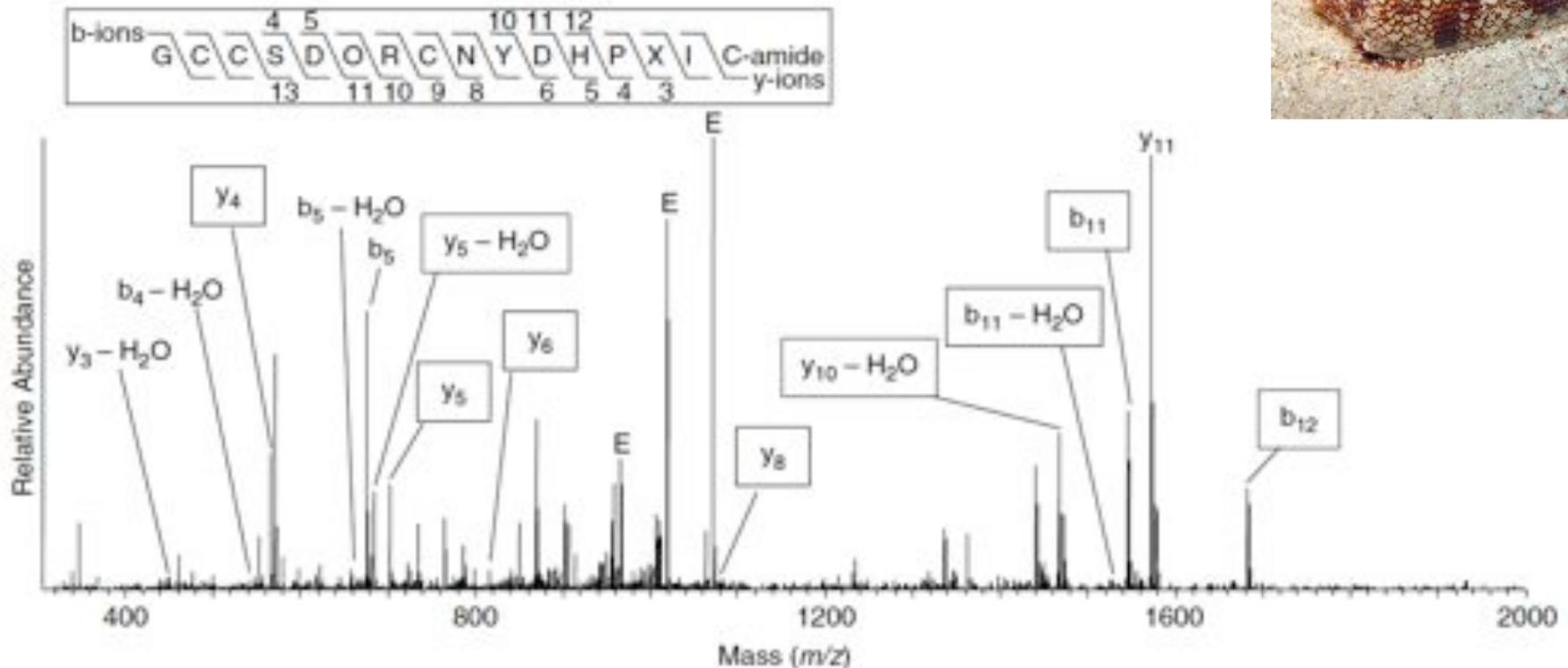
Fig. 3.
UV chromatograms at 214 nm obtained by RP-HPLC fractionation of milked venom (top) and dissected venom (bottom) of the cone snail, *Conus consors*. Dissected venom appears to be richer in hydrophobic components than milked venom. Masses matching known *Conus consors* amino acid sequences are pointed out on each chromatogram. Inset image represents a typical shell of *Conus consors* from the Chesterfield Islands.



→ Très grande diversité moléculaire !

→ Situation variable en fonction des espèces !

→ La spectrométrie de masse : séquençage *de novo*



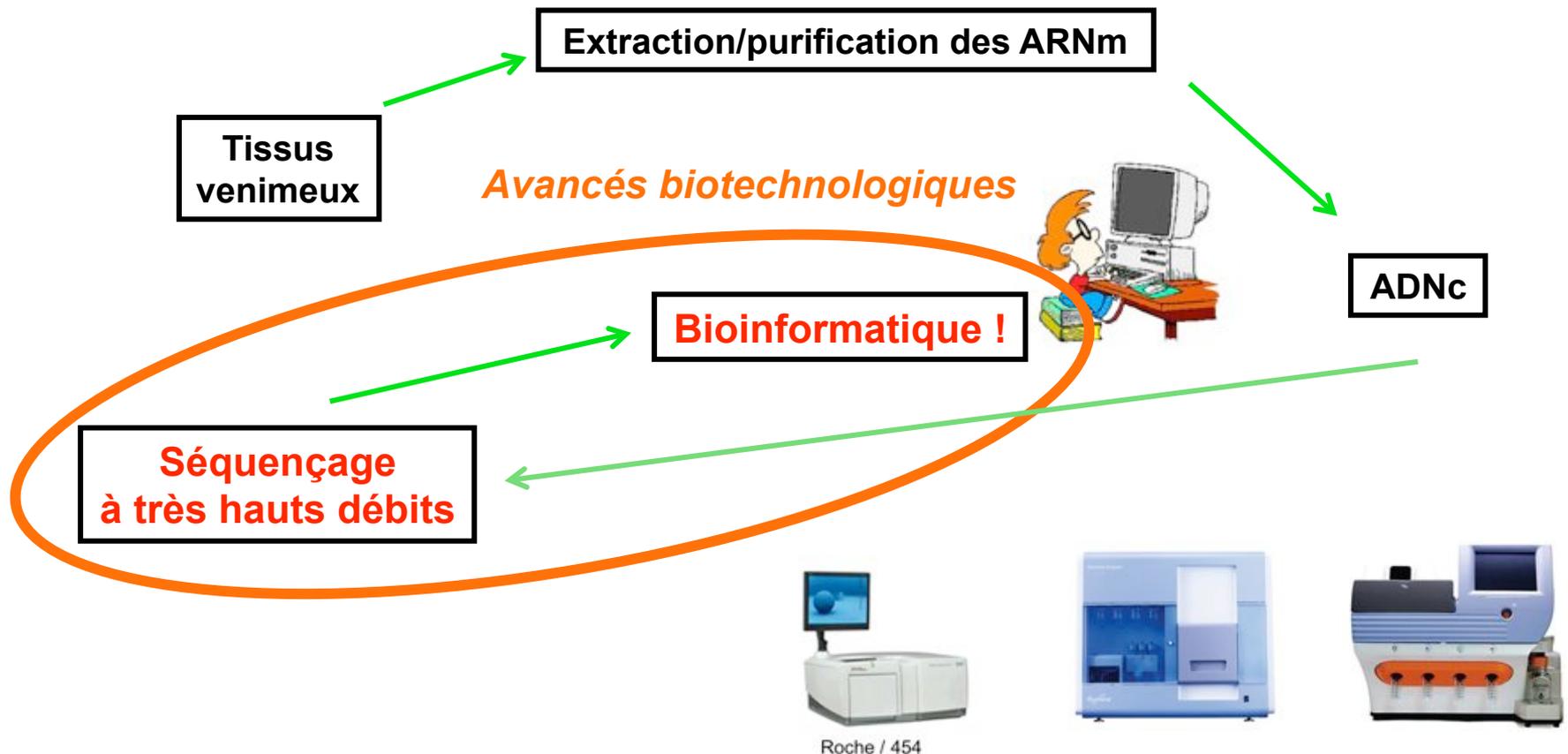
**Séquences de
composés présents
dans le venin**

**Accès aux
modifications post-
traductionnelles**

2000's l'ère « Omique »

→ La transcriptomique massive : inventaires globaux de l'activité de synthèse des glandes à venin...

→ Transposer et adapter les stratégies classiquement utilisées jusqu'à maintenant dans le cadre d'études de génomique : Next Generation Sequencing (NGS).

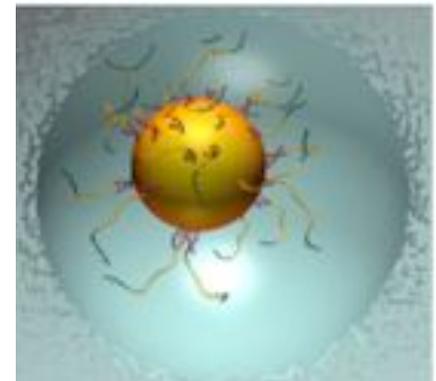


Le pyroséquençage : 454/GS FLX (Roche)

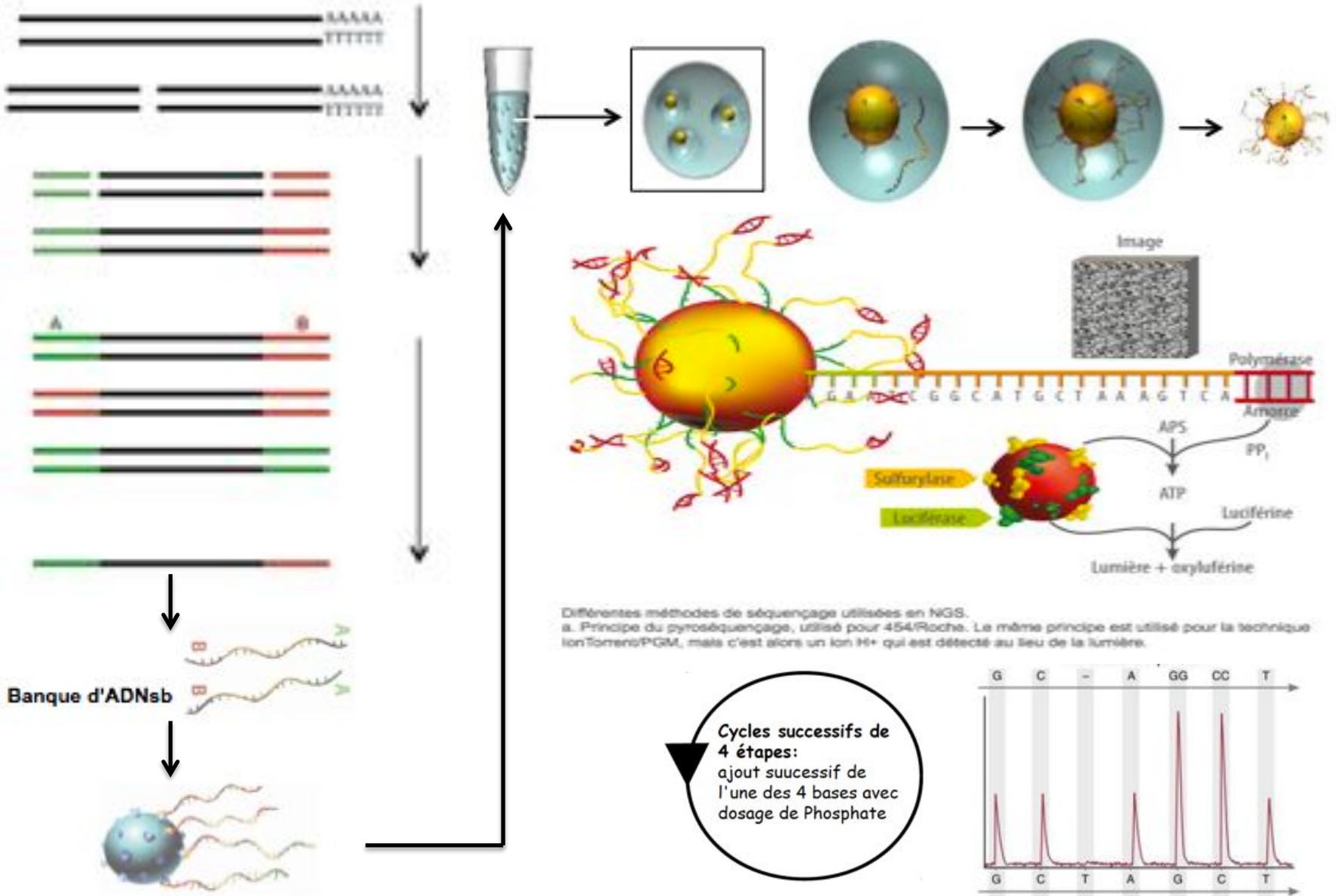
- Nanotechnologie
- Pas de clonage, pas de repiquage de colonies : gain de temps !
- Amplification en émulsion sur bille : 1 bille/1 type d'ADN/1 puits
- Séquençage à haut débit en temps réel !
- Environ 1.10^4 bases nucléotidiques lues par seconde...
- Fragments d'environ 200-300 paires de base (EST)
- 500.10^6 paires de base/cycle de séquençage !!!
- Faible coût...



Roche / 454



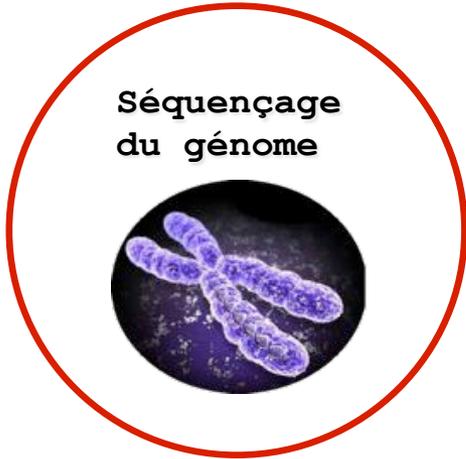
Le pyroséquençage : 454/GS FLX (Roche)



Différentes méthodes de séquençage utilisées en NGS.
a. Principe du pyroséquençage, utilisé pour 454/Roche. Le même principe est utilisé pour la technique IonTorrent/PGM, mais c'est alors un ion H⁺ qui est détecté au lieu de la lumière.

Transcriptomes de glandes à venin

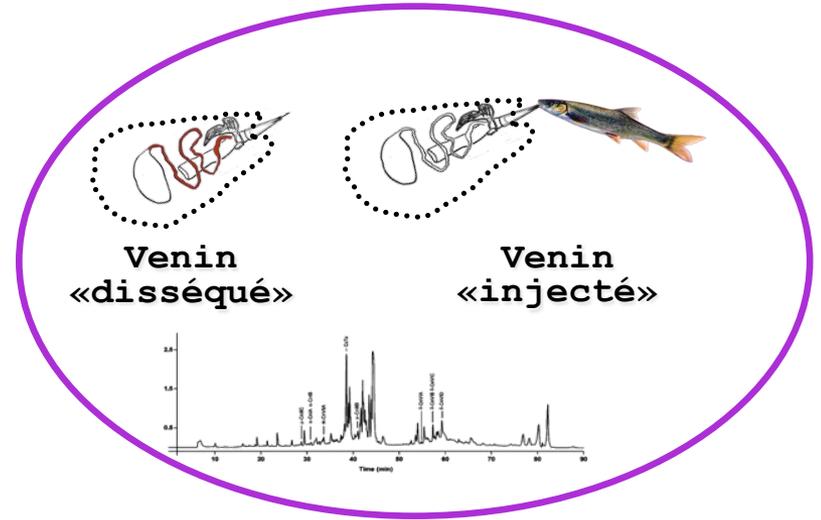
Animal species	454	454 GS FLX	illumina	Ion Torrent	Reference
Snakes					
<i>Crotalus adamanteus</i>		X			Rokyta et al., 2011
		X	X		Rokyta et al., 2012
<i>Ovophis akevensis</i>					
<i>Protobothrops flavoviridis</i>			X		Air et al., 2013
8 Costa Rican snakes		X			Durban J et al., 2011
<i>Atractaspis aterrima</i>		X			Terrat Y et al., 2013
<i>Crotalus horridus</i>			X		Rokyta et al., 2013
<i>Crotalus simus simus</i>		X			Durban J et al., 2013
<i>Micurus flavivus</i>			X		Margres et al., 2013
Cone snails					
<i>Conus consors</i>		X			Terrat Y et al., 2012
<i>Conus pulcherrimus</i>	X				Ulusma AO et al., 2012
<i>Conus geographus</i>		X			Hu H et al., 2012
<i>Conus miles</i>		X			Jin AH et al., 2013
<i>Conus marmoreus</i>		X			Dutertre S et al., 2013
Scorpions					
<i>Pandinus imperator</i>	X				Roeding F et al., 2009
<i>Centruroides noxius</i>		X			Rendón-Anaya M et al., 2012
5 Australian scorpions		X			Sunagar K et al., 2013
Spiders					
<i>Latrodectus tredecimguttatus</i>			X		He Q et al., 2013
<i>Selenatypus plumipes</i>			X		Wong ESW et al., 2013
<i>Gasteracantha arcuata</i>					
<i>Gasteracantha hasselti</i>			X		Zhao YJ et al., 2013
<i>Nasopanaria sinensis</i>					
Mammals					
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>					
<i>Tachyglossus aculeatus</i>			X		Wong ESW et al., 2013
Crustaceans					
<i>Speleonectes tulumensis</i>			X		von Reumont BM et al., 2013
Ants					
<i>Dinaponera quadricaps</i>				X	Torres AF et al., 2014



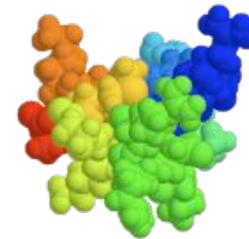
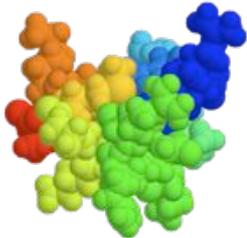
génomique



transcriptomique



protéomique



Génération de la banque d'EST



Extraction des ARNt

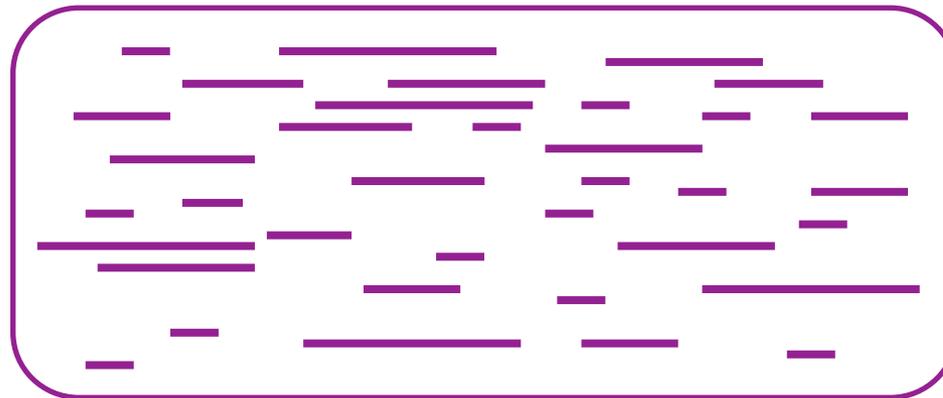


Purification des ARNs messagers



Synthèse des ADNc

Séquençage
des
ESTs



► 213 561
Expressed
Sequence Tags
de 218 bp en
moyenne.



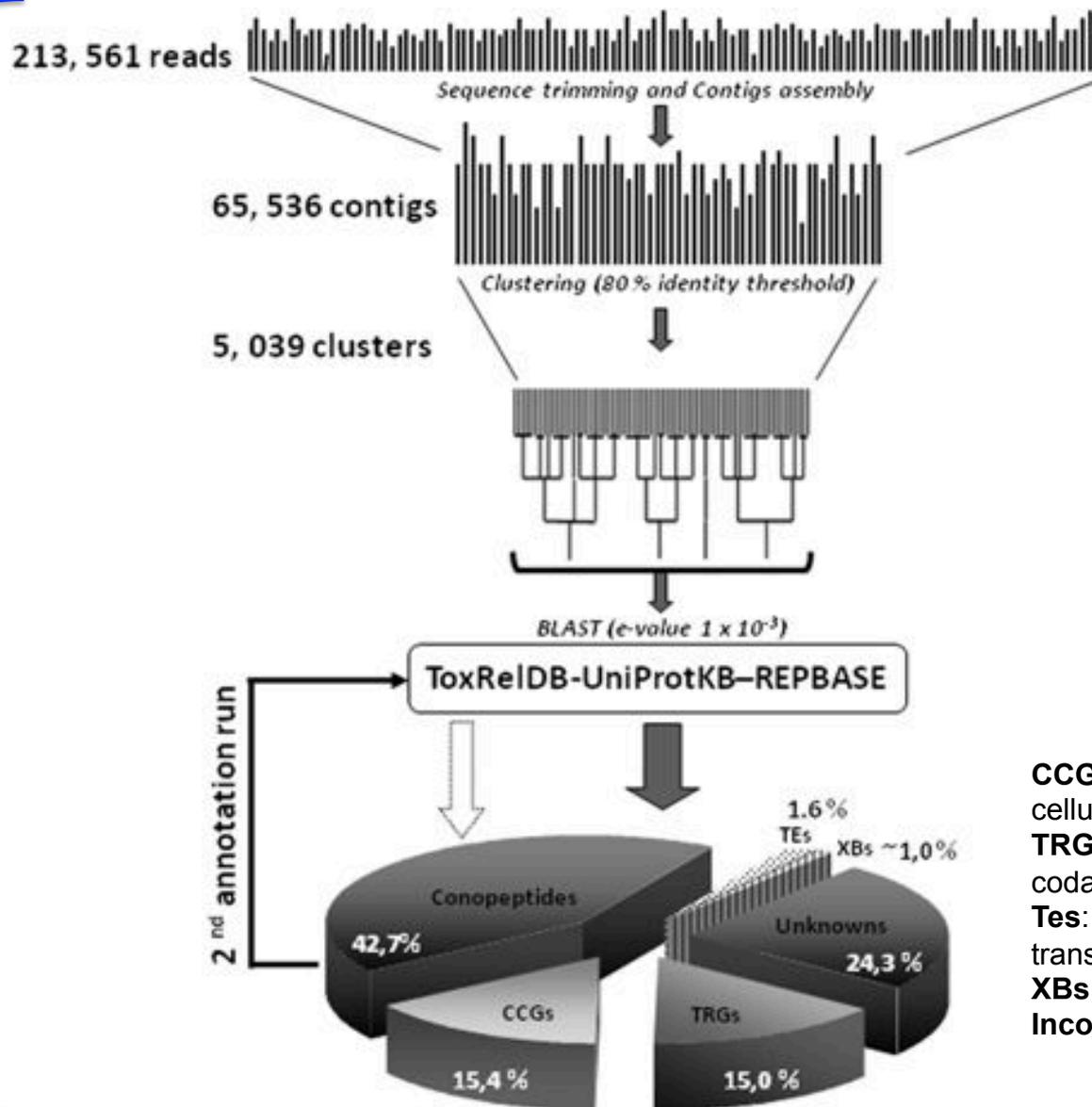
Assemblage
des
contigs



► Assemblage
en
65 536
Contigs !



Bio-
informatique !

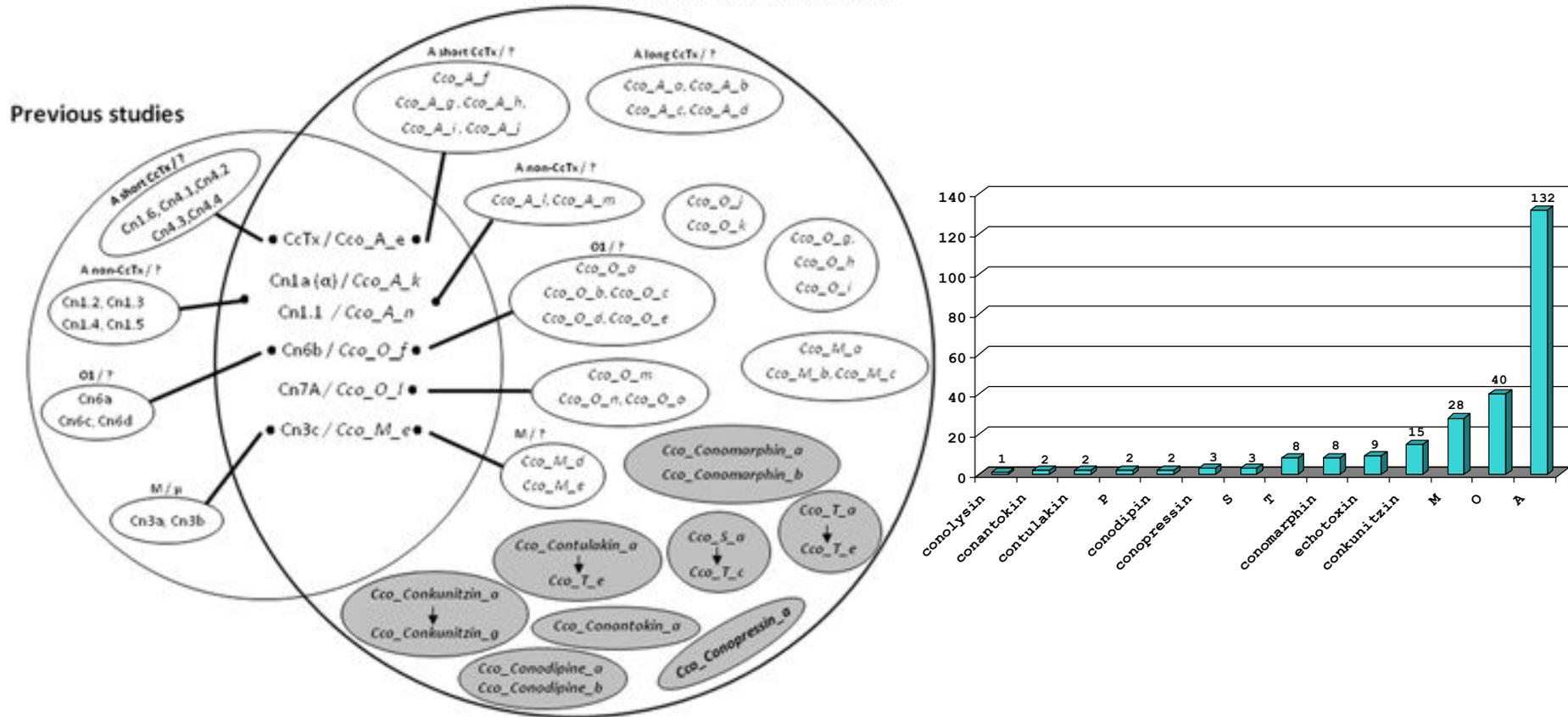


CCGs: Gènes cellulaires communs
TRGs: Gènes codant des toxines
TEs: Eléments transposables
XBs: Xénobiotiques
Inconnus : !!??

Annotation du transcriptome de *C. Consors* : bilan du contenu en conopeptides !

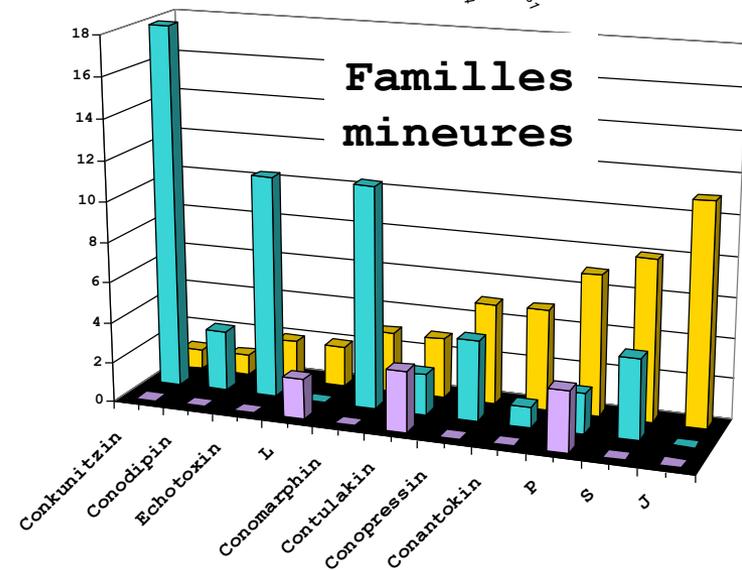
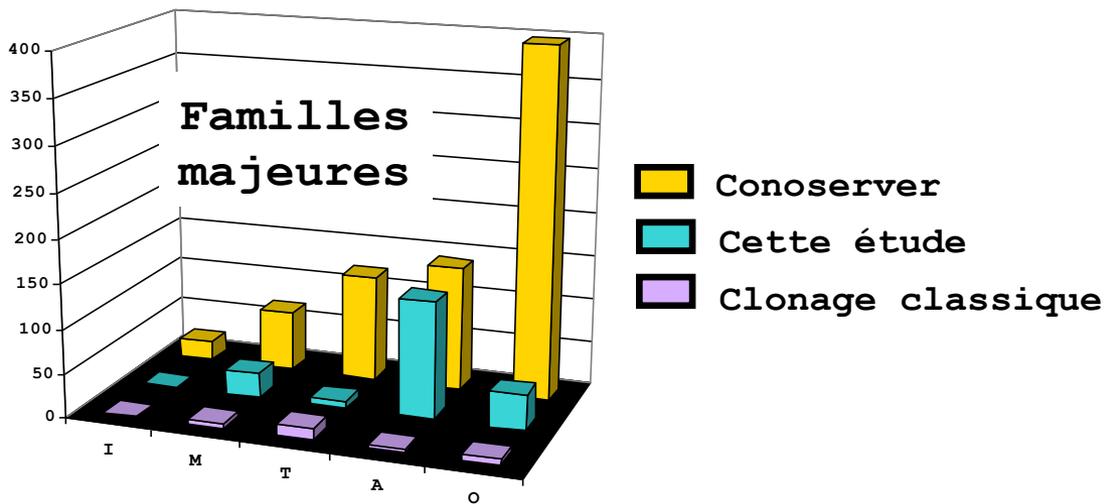
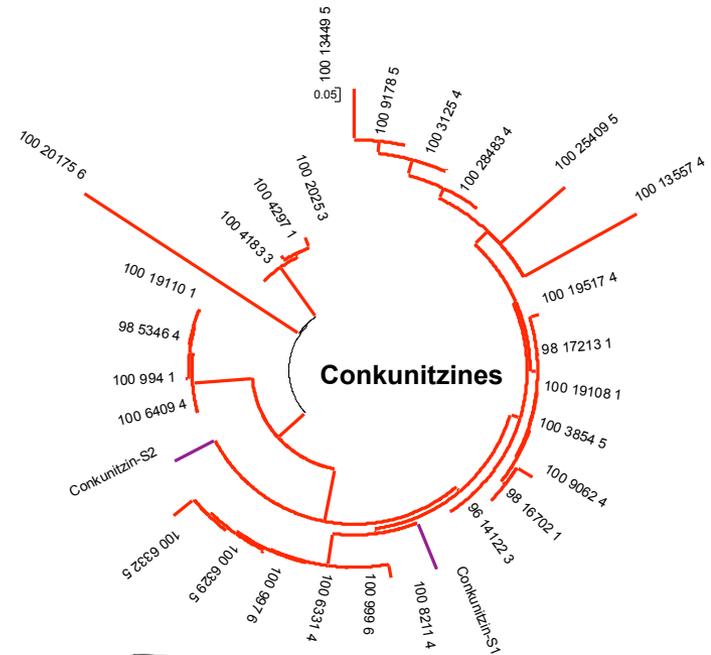
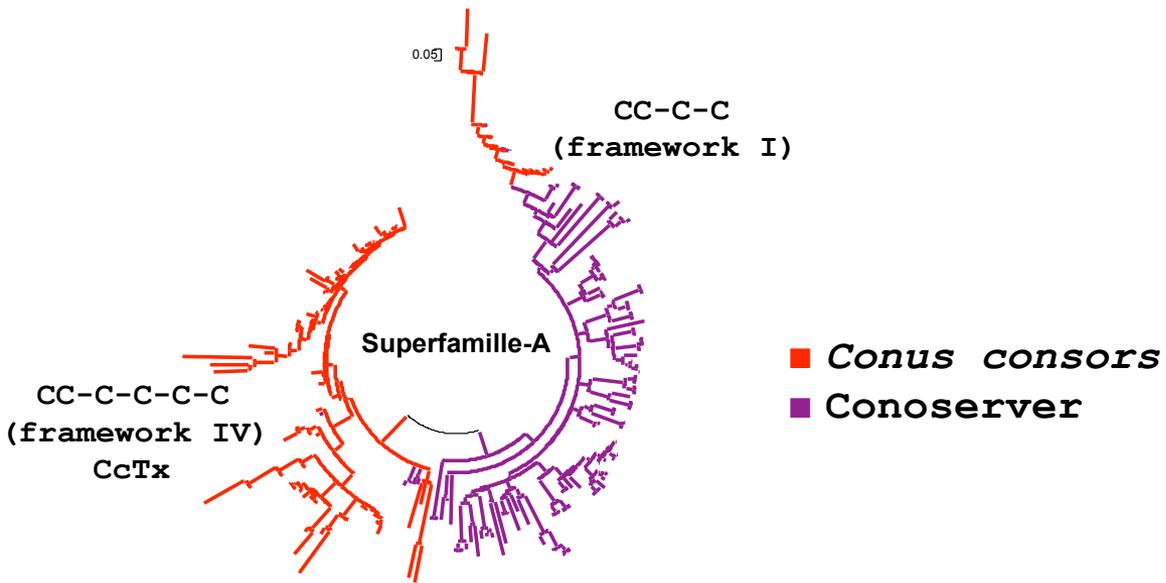


Conus consors 454 transcriptome

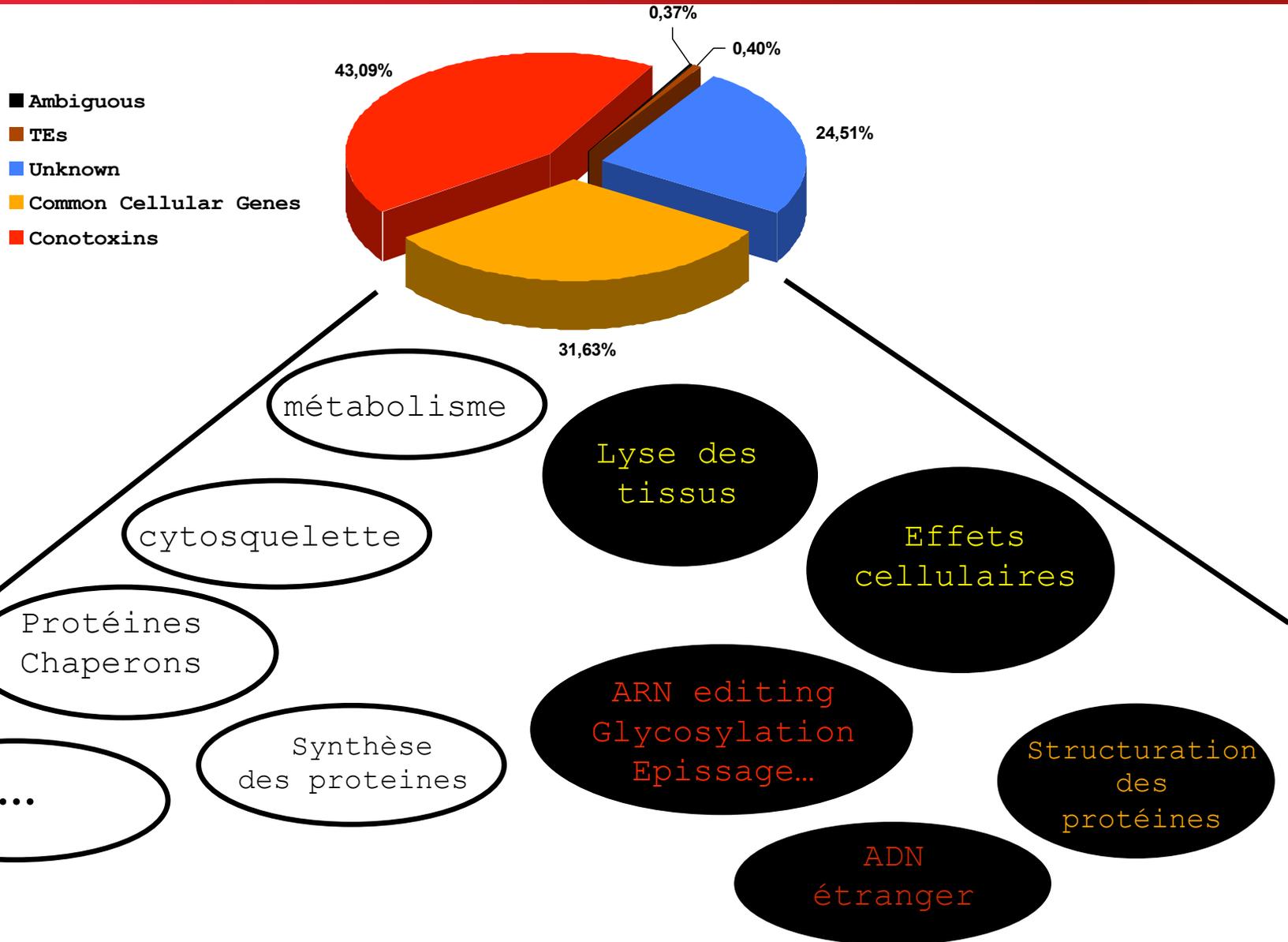


- 17 familles différentes de conopeptides dans le transcriptome de *C. consors* !
- 255 isoformes différentes de conopeptides identifiées dans *C. consors* !
- Les familles A, O et M sont les plus abondantes et diverses !
- 6 isoformes communes trouvées au regard des études précédentes !
- 8 nouvelles familles de conopeptides identifiées dans *C. consors* !
- 2 familles totalement nouvelles de conopeptides ont été découvertes !

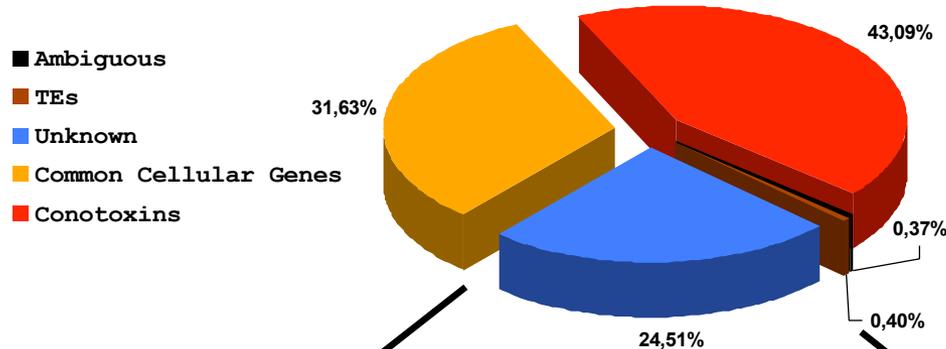
Quelques exemples de diversité moléculaire



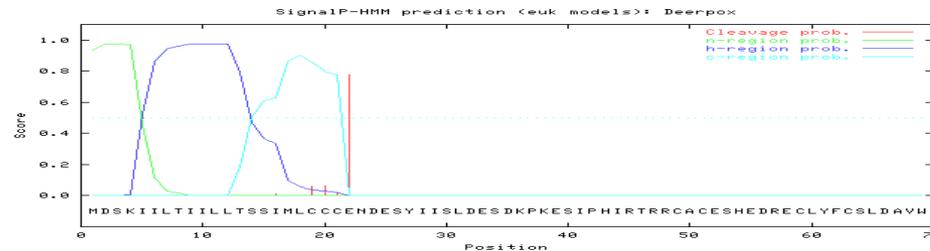
Au delà des conotoxines (1)



Au delà des conotoxines (2)



Pre Pro Mature



- ▶ Détection de novo de peptides et de protéines totalement inconnus : structure ? fonctions ?
 → Un « Eldorado » moléculaire..

DE LA RECHERCHE À L'INDUSTRIE

cea

Transcriptomic studies within the FP7-Health VENOMICS Project (2011-2015)

200 transcriptomes différents !!

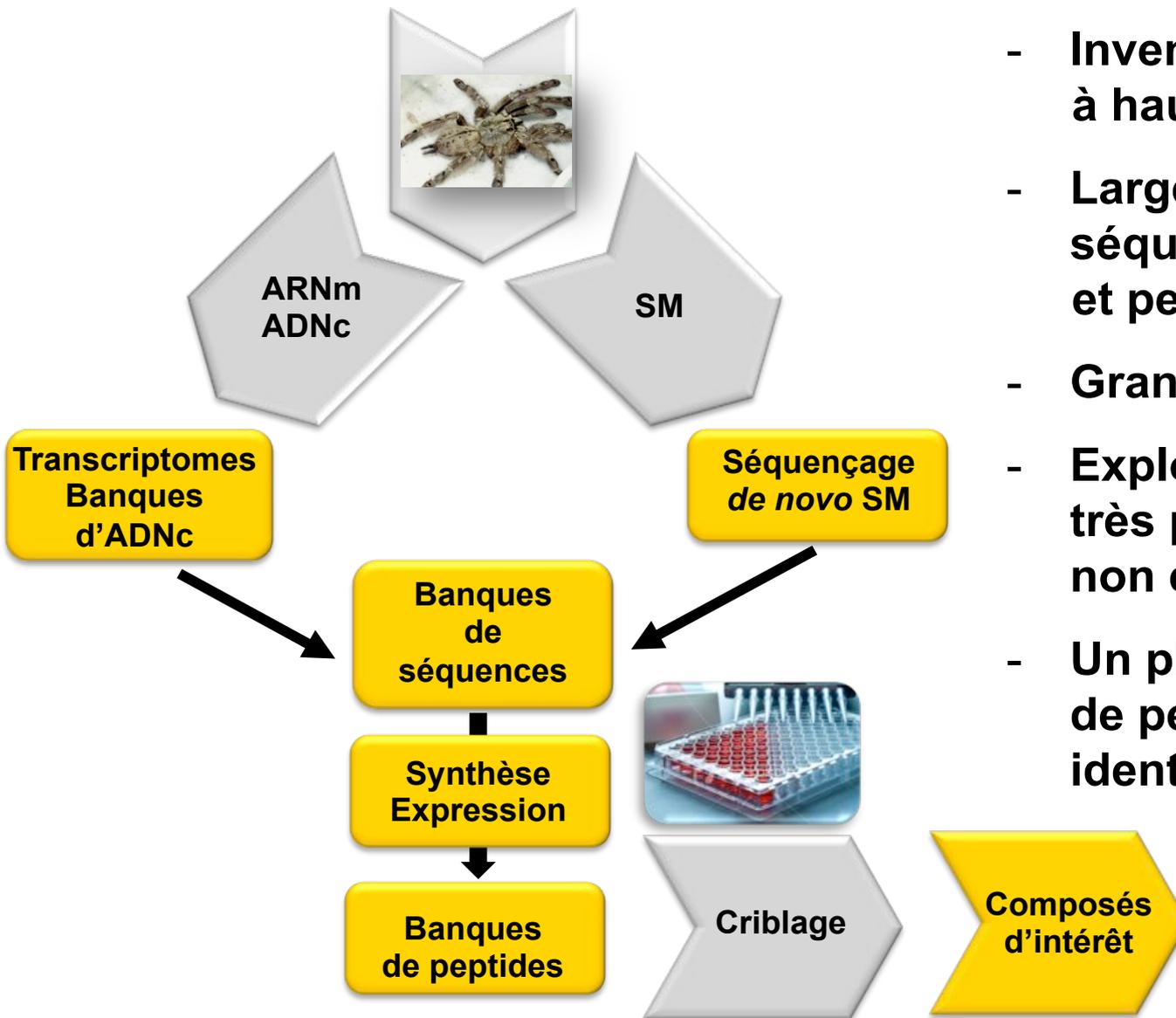


DES GLANDES à VENIN... À DES BANQUES DE PEPTIDES !

The banner features the Venomics logo on the left, a navigation menu with links for HOME, PROJECT, PARTNERS, MEDIA, PARTNERSHIPS, LINKS, CONTACT, and ENTRANET, and three images: a yellow sea anemone, a blue fish, and a black spider. Below the images, the text reads: **VENOMICS, A FP7 PROJECT DEDICATED TO THE EXPLORATION OF BIODIVERSITY FOR PUBLIC HEALTH**. At the bottom, a short paragraph states: **The VENOMICS project aims at exploiting animal venom compounds for the development of novel therapeutics. VENOMICS will implement an innovative workflow involving cutting-edge transcriptomics, proteomics and high-throughput peptide production technologies to decipher venom diversity.**

www.cea.fr

Nouvelles stratégies : se libérer des venins !



- Inventaires moléculaires à hauts débits
- Grandes banques de séquences nucléiques et peptidiques
- Grande biodiversité
- Exploration des peptides très peu abondants donc non étudiés !
- Un plus grand nombre de peptides candidats, identifiés plus vite !

LES VENINS ET LEURS COMPOSÉS

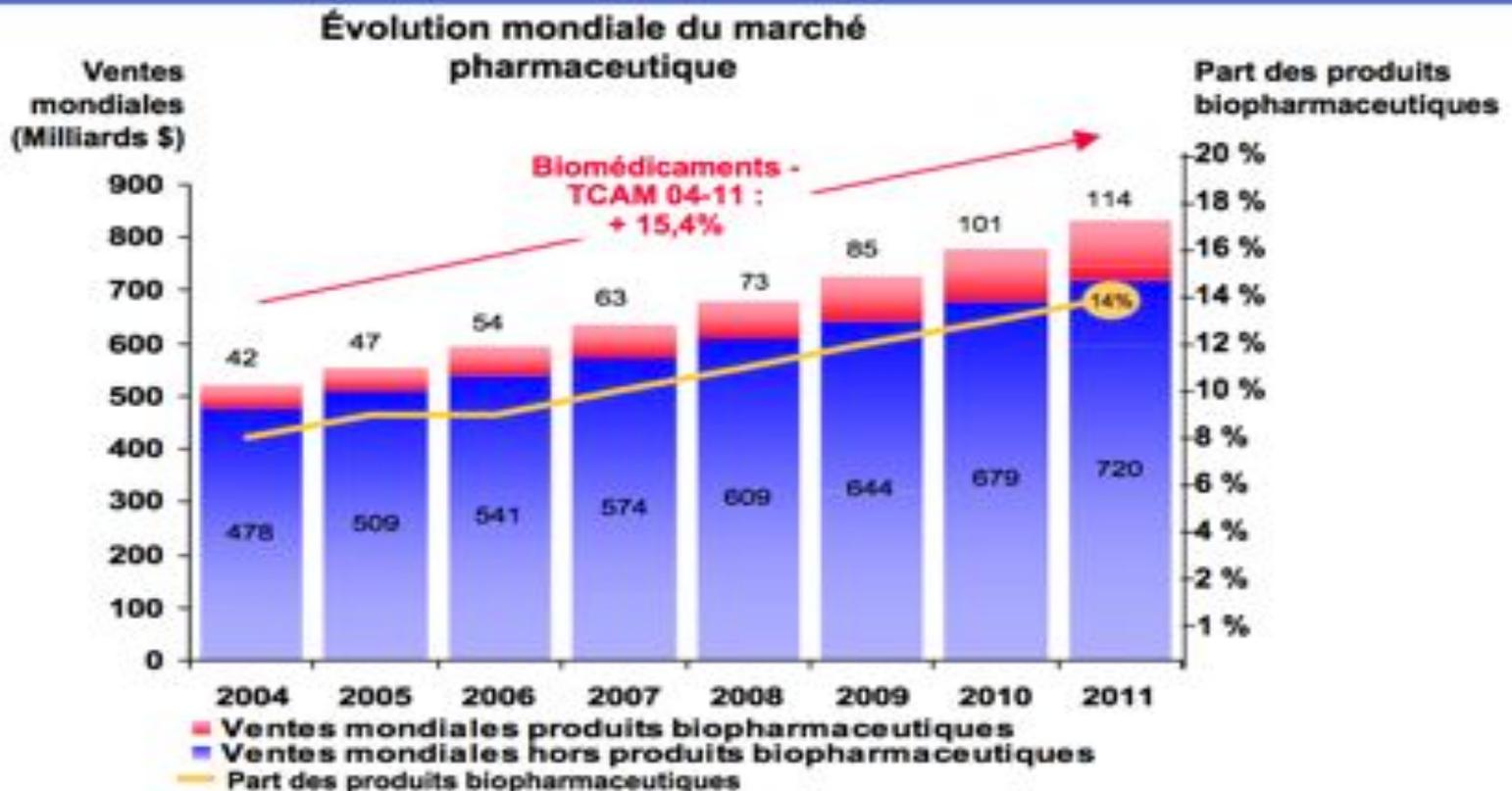
- *Une ressource naturelle immense*
- *Exploration liée aux évolutions technologiques et aux moyens biotechnologiques !*
- *Un potentiel en recherche fondamentale*
- *Des applications prometteuses qui ne font que commencer à être développées/exploitées*
- *Venins : source de composés bio-optimisés*
 - *Toxines : une source d'inspiration...*

*Stratégies d'ingénierie
de peptides
et
de protéines*

Les peptides et protéines sont les objets moléculaires qui présentent la plus grande diversité de modes d'action et d'activités biologiques : ce sont des acteurs clés du vivant !

➡ Exploitation et mise au service de l'homme du potentiel biologique des peptides et des protéines, plus particulièrement dans les domaines de la recherche, de la santé, de l'industrie, de l'agro-alimentaire, de l'écologie etc...

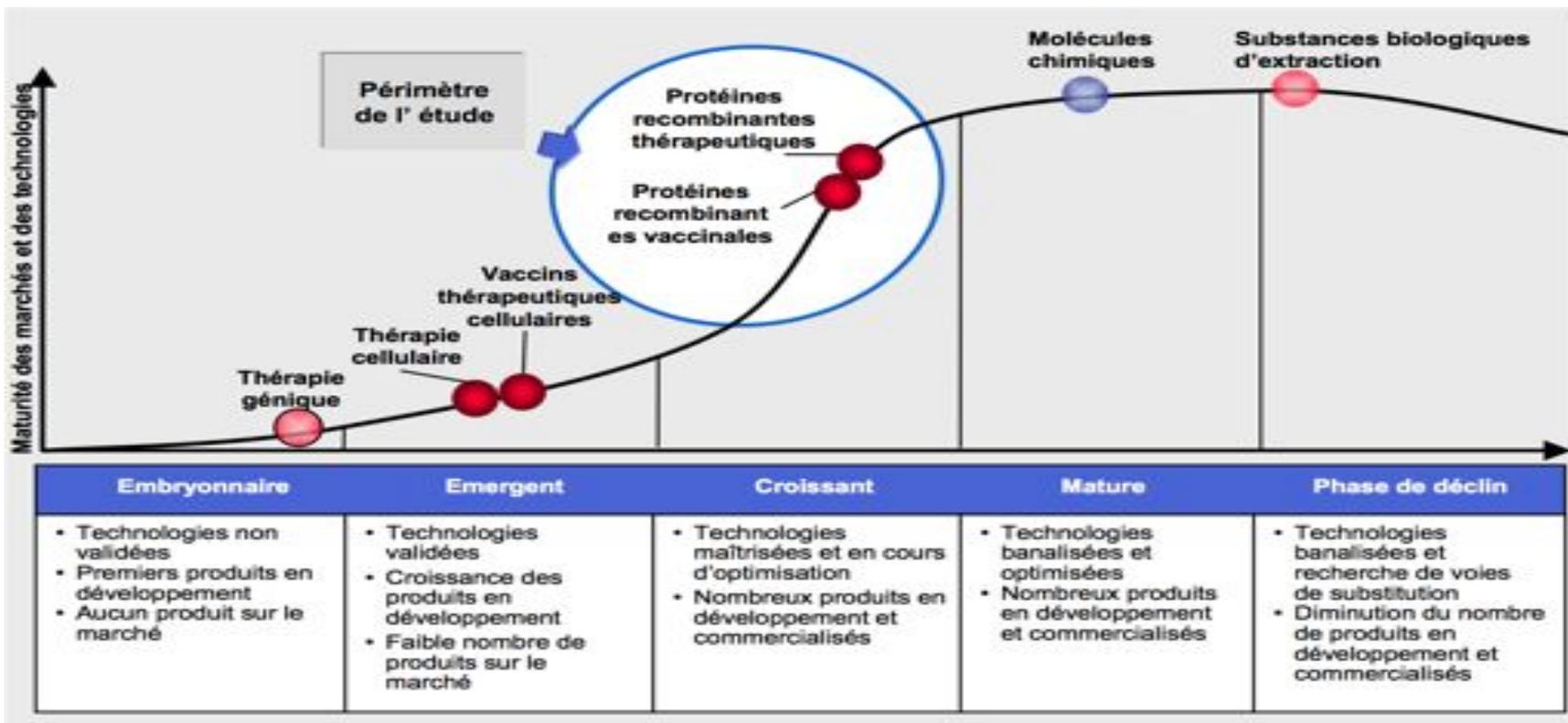
Au cours des sept prochaines années, la croissance annuelle du marché biopharmaceutique devrait atteindre plus de 15 % ...

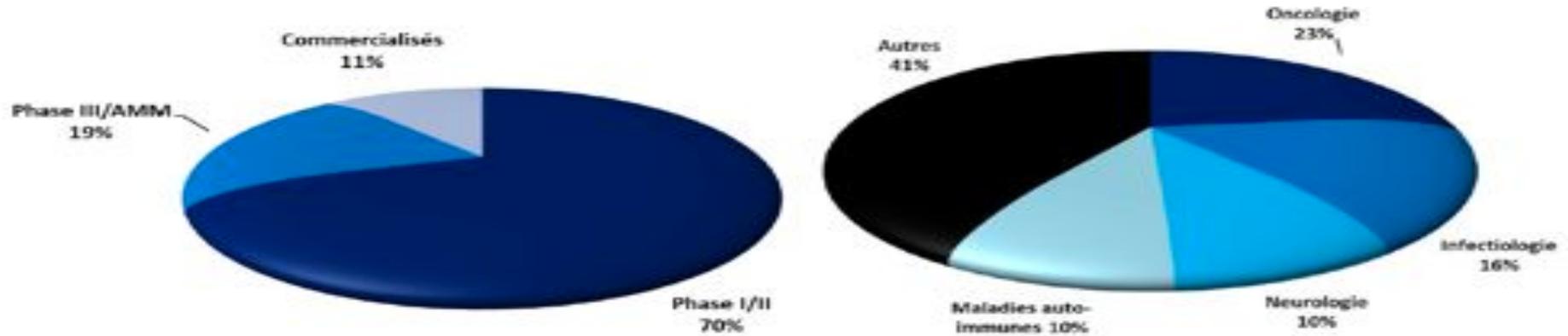


- ☛ Le marché des biotechnologies c'est 10 % du chiffre d'affaire de l'industrie pharmaceutique mondiale, et 40% des nouvelles molécules /an.
- ☛ Plus de 30% des nouveaux médicaments sont issus du génie génétique !
- ☛ Il existe plus de 200 protéines-médicaments commercialisées et/ou utilisées en milieu hospitalier et plusieurs centaines sont en cours d'essais cliniques...

Les protéines et peptides médicaments

- produites à partir d'organismes vivants ou de leurs composants cellulaires.
- Mise en jeu d'approches cellulaires et/ou d'approches technologiques issues du génie génétique : ADN recombinant !





Répartition des produits thérapeutiques par phase et par axe thérapeutique en 2010

- Les interférons, les interleukines, l'hormone de croissance, l'insuline,
 - le CSF (colony stimulating factor), facteur stimulant les cellules hématopoïétiques : greffes de moelle
 - les facteurs anti-hémophiliques (facteurs de la coagulation),
 - L'activateur tissulaire du plasminogène (thrombolytique)
 - récepteurs solubles
 - anticorps monoclonaux
 - vaccins protéiques
- Les facteurs de croissance des éléments du sang :
 - des globules rouges : les érythropoïétines (25 % des ventes)

Les protéines médicaments : l'exemple des anticorps en biologie clinique.

36 mAbs approuvés/15 dans le traitement des cancers/ plusieurs centaines en essais cliniques...

International non-proprietary name	Trade name	Type	Indication first approved	First EU (US) approval year
Mutomonab-CD3	Orthodone Ok3	Anti-CD3; Murine IgG2a	Reversal of kidney transplant rejection	1985* (1985#)
Abciximab	Reopro	Anti-GPIIb/IIIa; Chimeric IgG1 Fab	Prevention of blood clots in angioplasty	1995* (1994)
Rituximab	MabThera, Rituxan	Anti-CD20; Chimeric IgG1	Non-Hodgkin's lymphoma	1998 (1997)
Basiliximab	Simulect	Anti-IL2R; Chimeric IgG1	Prevention of kidney transplant rejection	1998 (1998)
Daclizumab	Zenapax	Anti-IL2R; Humanized IgG1	Prevention of kidney transplant rejection	1999 (1997); #
Palivizumab	Synagis	Anti-RSV; Humanized IgG1	Prevention of respiratory syncytial virus infection	1999 (1998)
Infliximab	Remicade	Anti-TNF; Chimeric IgG1	Crohn disease	1999 (1998)
Trastuzumab	Herceptin	Anti-HER2; Humanized IgG1	Breast cancer	2000 (1998)
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	Anti-CD33; Humanized IgG4	Acute myeloid leukemia	NA (2000#)
Alemtuzumab	MabCampath, Campath-1H	Anti-CD52; Humanized IgG1	Chronic myeloid leukemia	2001 (2001)
Adalimumab	Humira	Anti-TNF; Human IgG1	Rheumatoid arthritis	2003 (2002)
Tositumomab-H131	Bexxar	Anti-CD20; Murine IgG2a	Non-Hodgkin lymphoma	NA (2003)
Etalizumab	Raptiva	Anti-CD11a; Humanized IgG1	Psoriasis	2004 (2003); #
Cetuximab	Erbilux	Anti-EGFR; Chimeric IgG1	Colorectal cancer	2004 (2004)
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	Anti-CD20; Murine IgG1	Non-Hodgkin's lymphoma	2004 (2002)
Omalizumab	Xolair	Anti-IgE; Humanized IgG1	Asthma	2005 (2003)
Bevacizumab	Avastin	Anti-VEGF; Humanized IgG1	Colorectal cancer	2005 (2004)
Natalizumab	Tysabri	Anti-a4 integrin; Humanized IgG4	Multiple sclerosis	2006 (2004)
Ranibizumab	Lucentis	Anti-VEGF; Humanized IgG1 Fab	Macular degeneration	2007 (2006)
Panitumumab	Vectibix	Anti-EGFR; Human IgG2	Colorectal cancer	2007 (2006)

Eculizumab	Soliris	Anti-C5; Humanized IgG24	Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	2007 (2007)
Certolizumab pegol	Cimzia	Anti-TNF; Humanized Fab, pegylated	Crohn disease	2009 (2008)
Golimumab	Simponi	Anti-TNF; Human IgG1	Rheumatoid and psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis	2009 (2009)
Canakinumab	Ilaris	Anti-IL1b; Human IgG1	Muckle-Wells syndrome	2009 (2009)
Catumaxomab	Removab	Anti-EPCAM/CD3; Rat/mouse bispecific mAb	Malignant ascites	2009 (NA)
Ustekinumab	Stelara	Anti-IL12/23; Human IgG1	Psoriasis	2009 (2009)
Tocilizumab	RoActemra, Actemra	Anti-IL6R; Humanized IgG1	Rheumatoid arthritis	2009 (2010)
Olatumumab	Azema	Anti-CD20; Human IgG1	Chronic lymphocytic leukemia	2010 (2009)
Dencosumab	Prolia	Anti-RANK-L; Human IgG2	Bone Loss	2010 (2010)
Belimumab	Benlysta	Anti-BLYS; Human IgG1	Systemic lupus erythematosus	2011 (2011)
Ipilimumab	Yervoy	Anti-CTLA-4; Human IgG1	Metastatic melanoma	2011 (2011)
Brentuximab vedotin	Adcetris	Anti-CD30; Chimeric IgG1; immunconjugate	Hodgkin lymphoma	2012 (2011)
Perlezumab	Perjeta	Anti-HER2; humanized IgG1	Breast Cancer	2013 (2012)
Raxibacumab	(Pending)	Anti-B. anthracis PA; Human IgG1	Anthrax infection	NA (2012)
Trastuzumab emtansine	Kadcyla	Anti-HER2; humanized IgG1; immunconjugate	Breast cancer	in review (2013)
Vedolizumab	(Pending)	Anti-alpha4beta7 integrin; humanized IgG1	Ulcerative colitis, Crohn disease	in review (NA)

Anticorps monoclonaux : un bénéfice sur les ventes en 2011 de 45 billions de dollars!

Plus de 40% de ce chiffre vient de mAbs d'intérêt en **cancérologie** : Rituxan, Erbitux, Herceptine et Avastin (*).
Par ailleurs, 30% des ventes (14 billions de dollars) sont dues au Remicade et l'Humira, en **inflammation** (*).

Avantages

Structure native

Modifications *ad hoc*

Fonctionnels

Absence d'immunogénicité

Inconvénients

Source/quantités
disponibles !

Difficiles à purifier !

Difficiles à modifier !

Biodisponibilité !

Risques de contamination !

Avantages

- Modifications aisées grâce au génie génétique.
- « Facilité » d'extraction, de purification.
- « Facilité » de changement de l'échelle de production : maîtrise totale de la chaîne de production (industrie !)
- Absence de contaminants redoutés : virus, prion...

Inconvénients

- Développer un système de production pertinent ...
- Le rendement et le coût du produit recombinant obtenu !

→ Adapter les peptides et protéines aux « besoins » de l'Homme : pourquoi ?

☞ Comprendre les propriétés des peptides et des protéines !

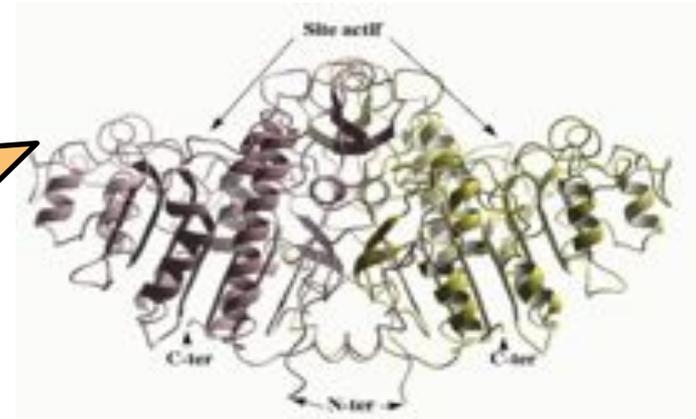
☞ Produire artificiellement les peptides et les protéines !



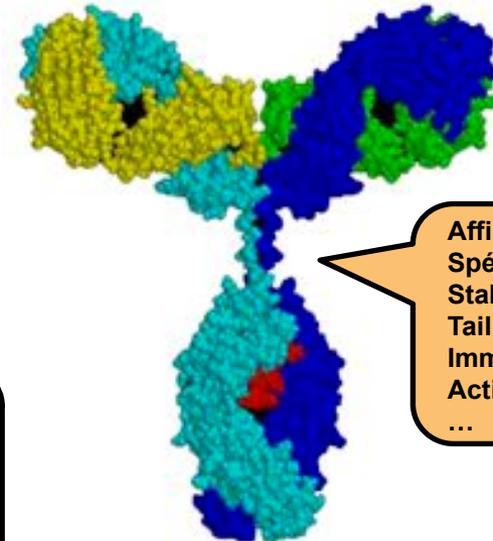
☞ Améliorer certaines propriétés des protéines !

☞ Créer des molécules dotées de nouvelles propriétés...

Stabilité :
- Thermique
- dénaturation
Activité catalytique
Affinité pour le substrat
Protéine de fusion
...



Toxoïde
Nouvelles cibles
Activité pharmacologique :
- agonistes
- antagonistes
...



Affinité
Spécificité
Stabilité
Taille, fusion
Immunogénicité
Activité biologique
...

L'ÉVOLUTION MOLÉCULAIRE DIRIGÉE DES PEPTIDES ET DES PROTÉINES

➔ Ensemble des techniques expérimentales qui visent à mimer de façon accélérée et *in vitro*, à l'échelle du laboratoire, certains des processus de l'évolution naturelle :

- création de mutations et stratégies de sélection.

➔ L'évolution moléculaire dirigée diffère de l'évolution naturelle, dans le sens où elle tente de répondre à un objectif particulier prédéfini par le chercheur : on façonne un objet biologique dans un but précis...

➔ L'ingénierie et l'évolution moléculaire des peptides et des protéines fait partie intégrantes des Biotechnologies et vise à répondre aux besoins et attentes de la société civile en matière de confort de vie, en particulier dans le domaine de la santé :

➔ générer des objets moléculaires mieux adaptés aux besoins, à leur usage...

OUTILS ET STRATÉGIES D'INGÉNIERIE DES PEPTIDES ET DES PROTÉINES

Analyses structurales :

- Cristallographie et diffraction des rayons X
- Résonance Magnétique Nucléaire
- Modélisation moléculaire



Outils d'évolution moléculaire



- Création de banques de mutants :
mutagénèse dirigée, à saturation, aléatoire
 - Expression recombinante :
bactéries, phages, levures...
 - Criblage, sélection *in vivo*
 - Purification
 - Caractérisation :
biochimique, fonctionnelle et structurale...

*Exemples d'évolution
moléculaire dirigée
de peptides
issus
de venins animaux*

Exploitation d'une plateforme : évolution dirigée d'une toxine vers une nouvelle activité biologique...

METHODOLOGY

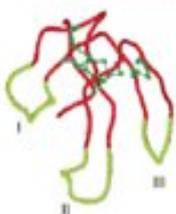
Open Access

Directed evolution of a three-finger neurotoxin by using cDNA display yields antagonists as well as agonists of interleukin-6 receptor signaling

Mohammed Naimuddin^{1,2,5*}, Suzuko Kobayashi³, Chihiro Tsutsui⁴, Masayuki Machida¹, Naoto Nemoto^{2,5}, Takafumi Sakai⁴, Tai Kubo^{3,6,7*}

Plateforme

MicTx3 de *Micrurus corallinus*
Alpha neurotoxine



Cible

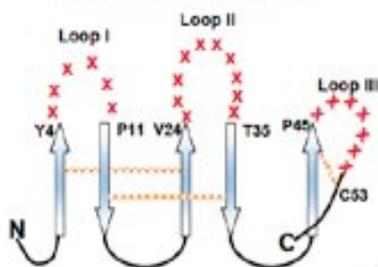
Domaine extracellulaire du récepteur à l'interleukine 6 (fixé sur des billes)



Création de diversité

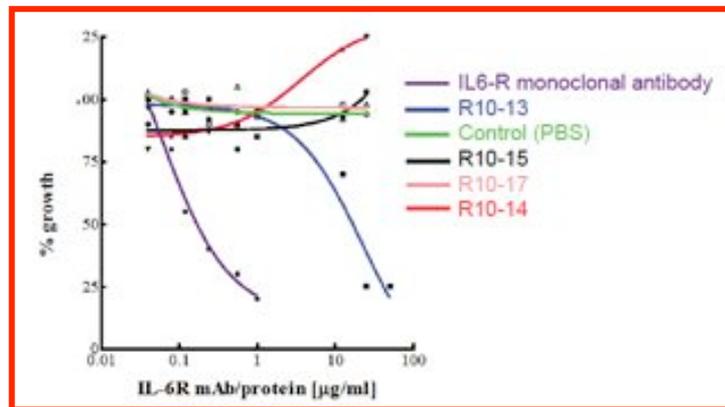
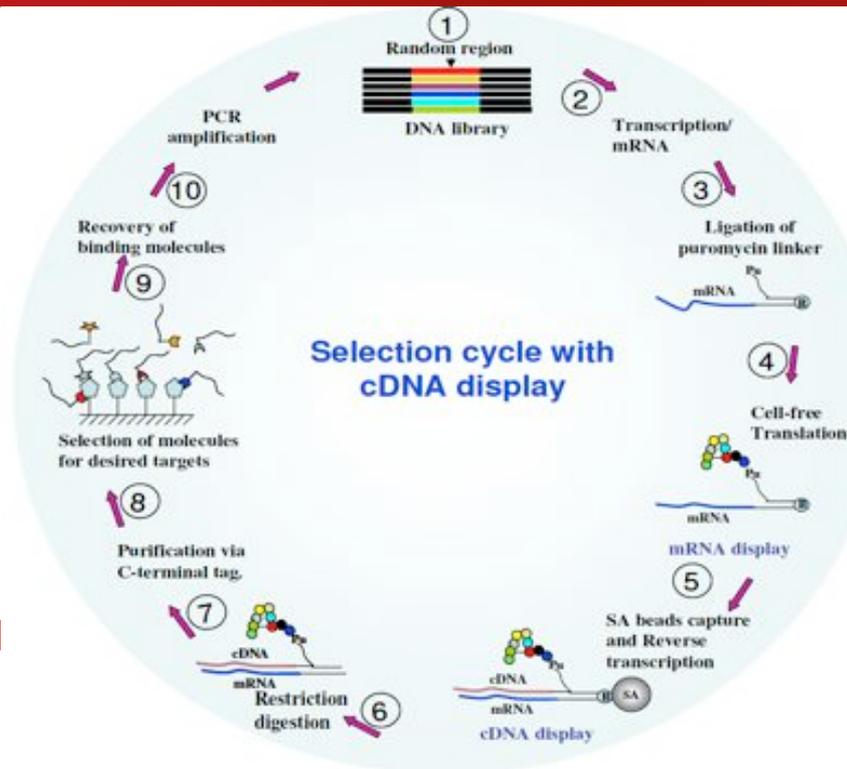
Dégénérescence totale sur bas des 3 boucles

23 résidus sur 61



1,2 10e11 molécules

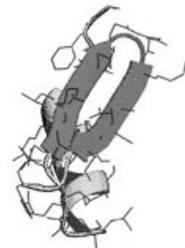
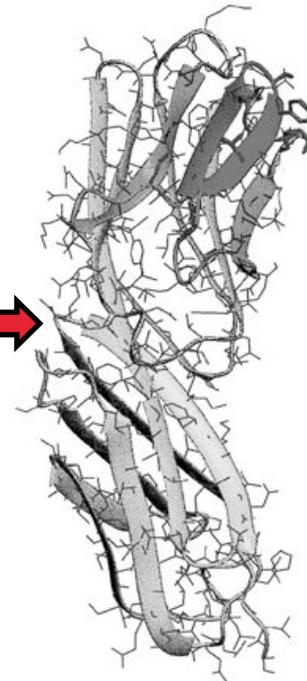
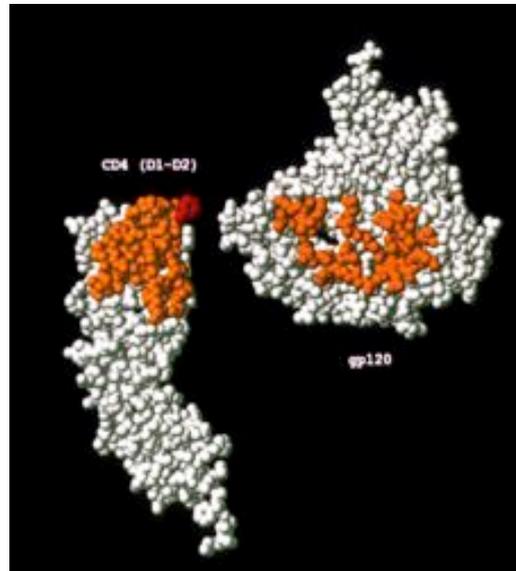
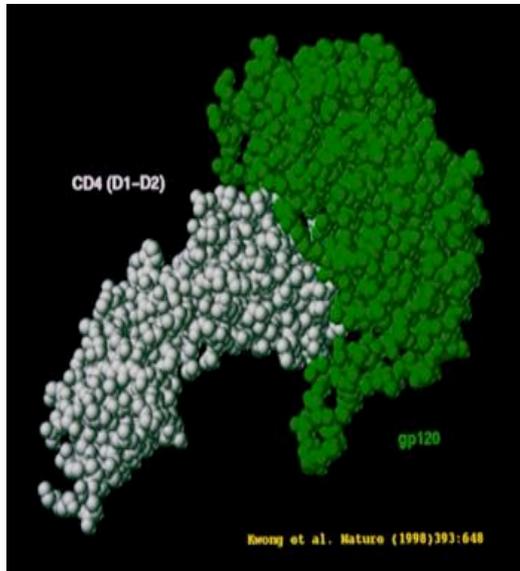
Naimuddin, 2011



Exemple d'ingénierie chimique d'un peptide issu d'un venin de scorpion : les toxines comme source d'inspiration !

➔ ingénierie d'une miniprotéine (la scyllatoxine du scorpion *Leirus quinquestriatus*) sur laquelle on a transféré la capacité de liaison du récepteur CD4 à la gp120 du HIV-1 !!

➤ développement d'outils pour la biologie et la recherche de nouveaux médicaments (inhibiteurs d'interactions protéine-protéine)...



31 aa

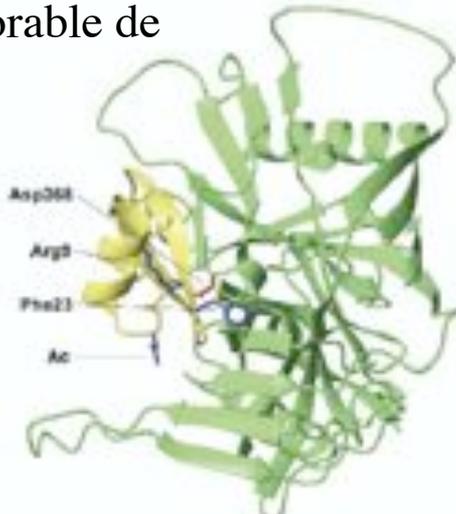
Identification d'un mime potentiel : un antagoniste des canaux K⁺ !

identification du site de liaison

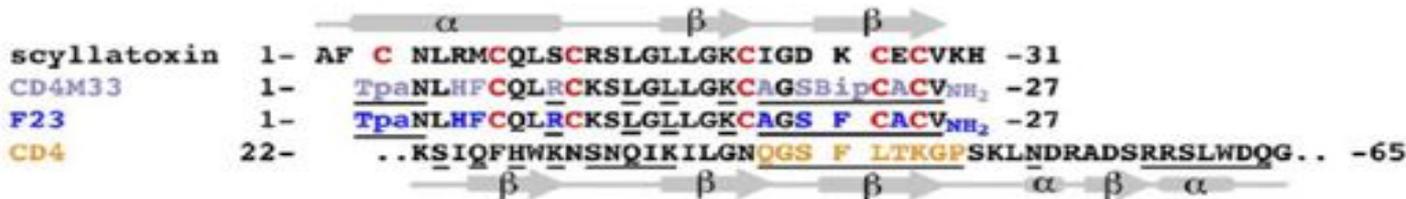
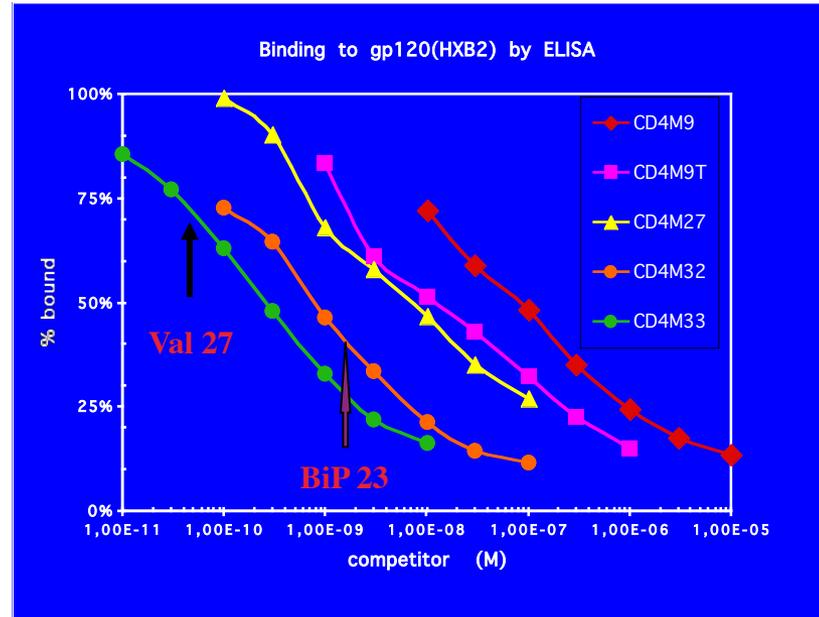
458 aa

Des modifications bénéfiques par une approche rationnelle

I) La modélisation du complexe Gp120-CD4M9 a révélé plusieurs problèmes dont en particulier un mouvement défavorable de l'extrémité N-ter !



II) Introduction de modifications individuelles



Tpa: thiopropionic acid
Bip: biphenylalanine

➔ 9 aa sur 27 ont été modifiés !

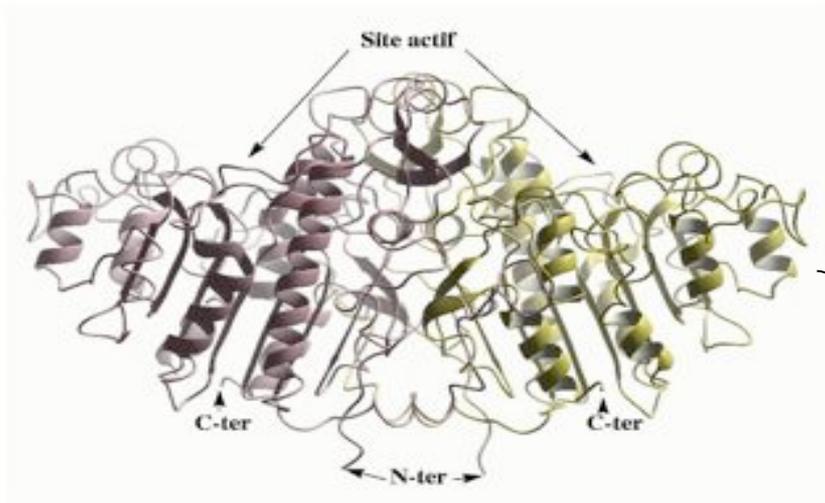
➔ Le mime moléculaire CD4M33 est plus efficace que le CD4 soluble pour inhiber l'infection virale de cellules cibles !!

➔ Microbicide en phase de développement clinique !

Exemples d'évolution moléculaire dirigée d'enzymes

Ingénierie d'une enzyme colorimétrique : la phosphatase alcaline

PhoA
bactérienne

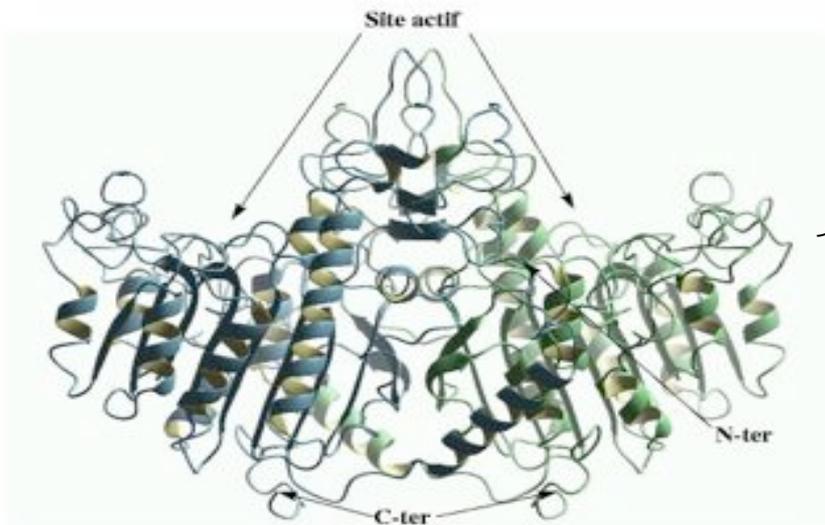


$$k_{\text{cat}} = 65 \text{ s}^{-1}$$
$$T_m = 95 \text{ }^\circ\text{C}$$

30 % d'acide
aminés
en
commun

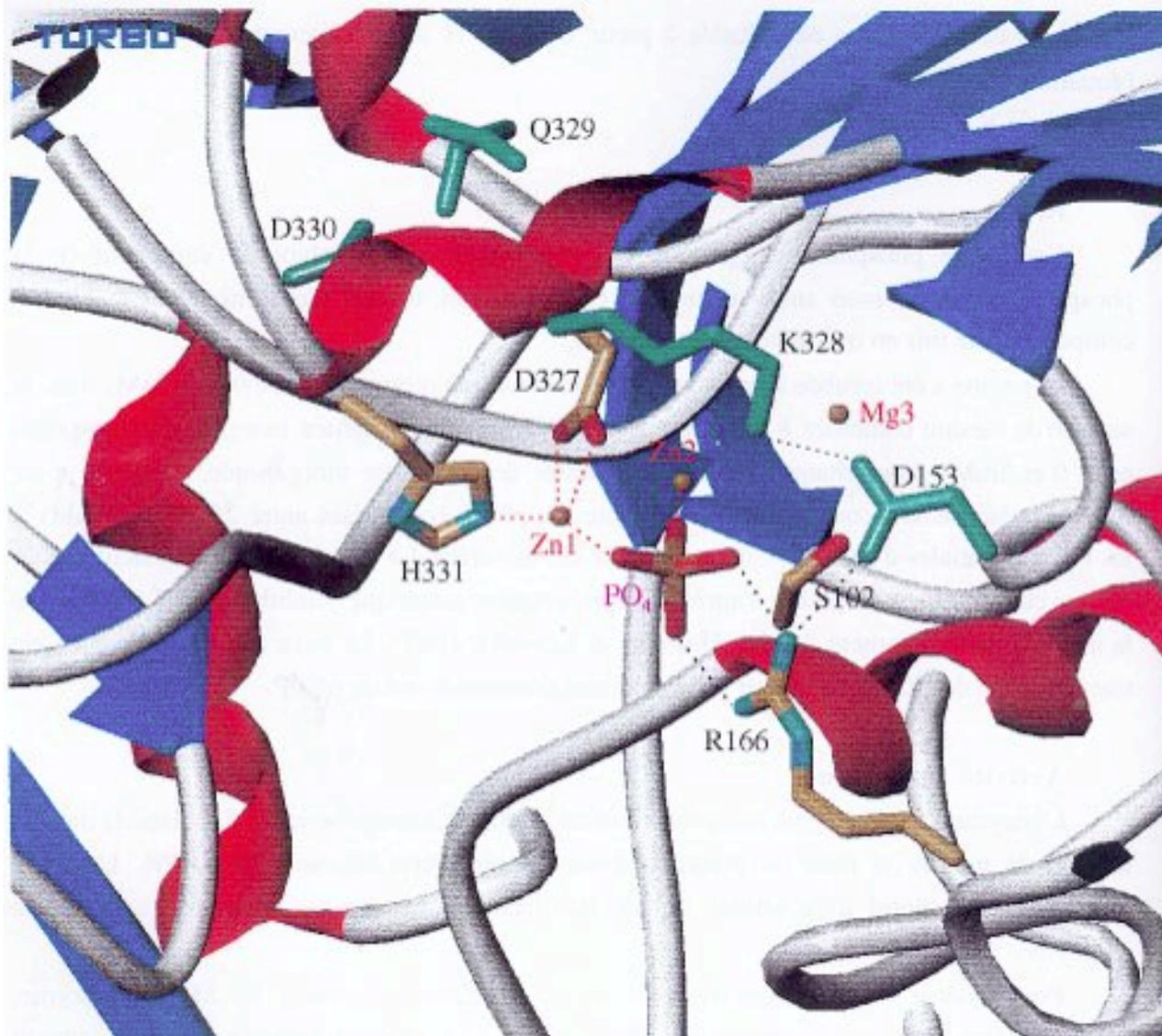
Transfert du site actif
de la PhoA de
mammifère
au sein de la PhoA
bactérienne !

PhoA de
mammifère



$$k_{\text{cat}} = 3435 \text{ s}^{-1}$$
$$T_m = 65 \text{ }^\circ\text{C}$$

ENZYME CHIMÈRE : POSITIONS MUTÉES



D153H
+
K328H
Q329G
D330H

} hélice



Chimère inactive !!

NOUVELLE STRATÉGIE : MUTATIONS SUPPRESSIVES !

153H/328H/329G/330H

153H/328H/329G/330N

Chimère
inactive

mutagenèse
aléatoire

Révertant
actif

D153H/D330N

Doubles
mutants

D153G/D330N

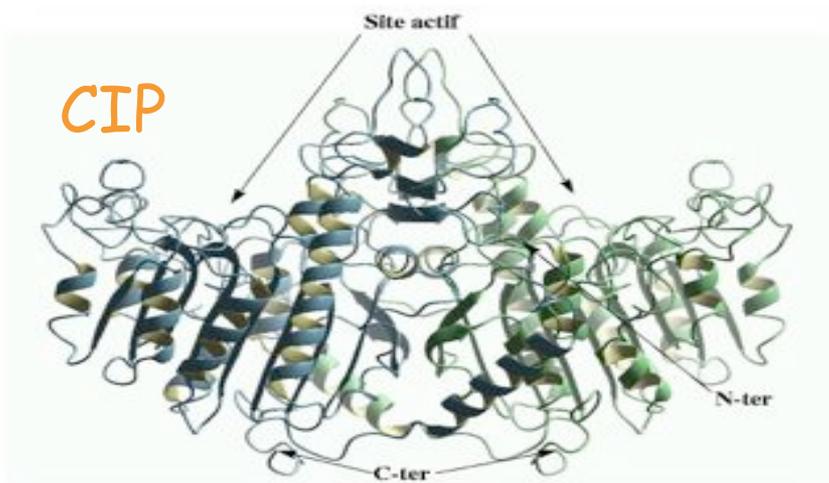
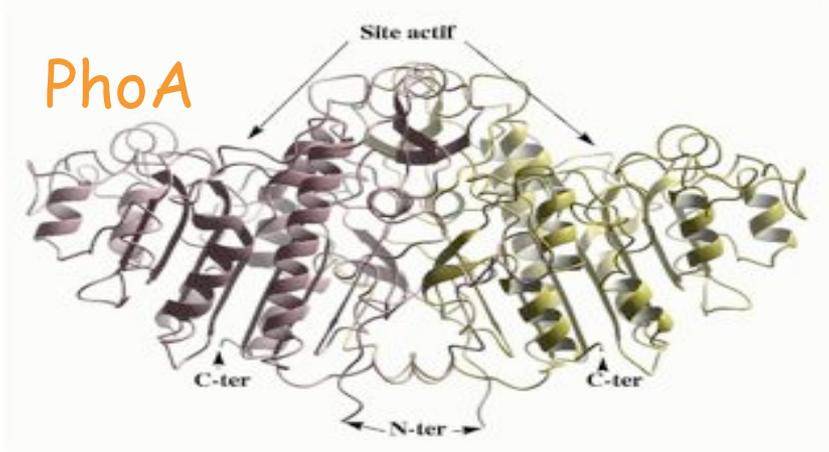


introduction
dans l'enzyme
sauvage

mutagenèse
dirigée

Simple
mutant

D330N



$$k_{\text{cat}} = 65 \text{ s}^{-1}$$

$$T_m = 95 \text{ }^\circ\text{C}$$

D153G/D330N

$$k_{\text{cat}} = 3202 \text{ s}^{-1}$$

$$T_m = 87 \text{ }^\circ\text{C}$$

30 % d'acide
aminés
en
commun

$$k_{\text{cat}} = 3435 \text{ s}^{-1}$$

$$T_m = 65 \text{ }^\circ\text{C}$$

👉 **2 substitutions en acides aminés ont suffit !!!**

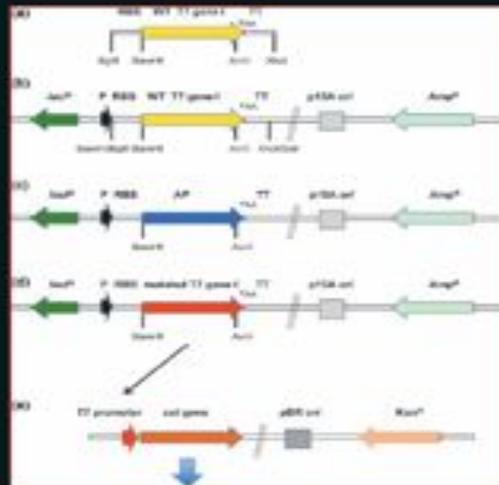
👉 **Le problème étant de trouver lesquelles...**

peds

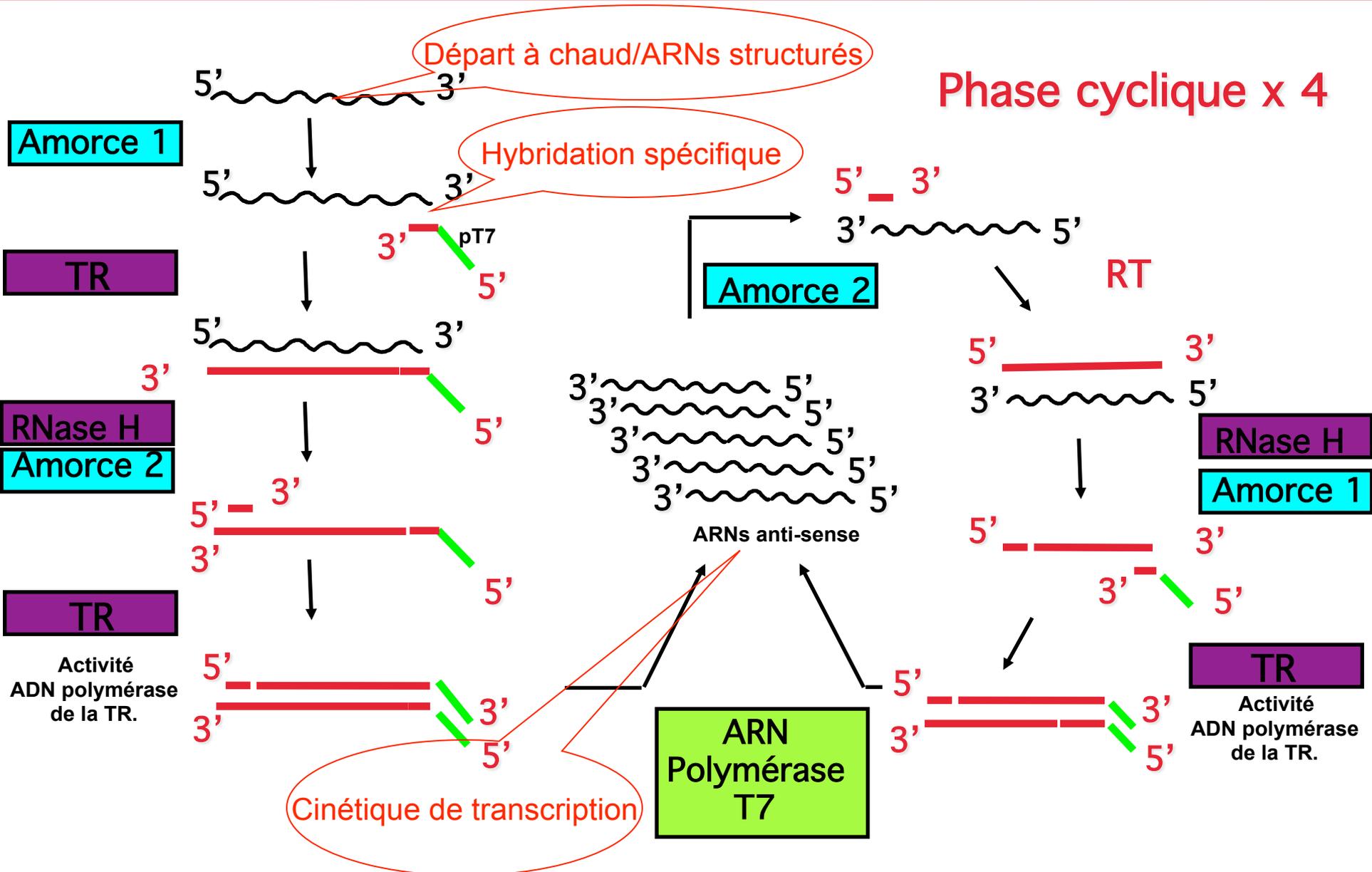
protein engineering design & selection

VOLUME 26 | NUMBER 11 | NOVEMBER 2013

www.peds.oxfordjournals.org

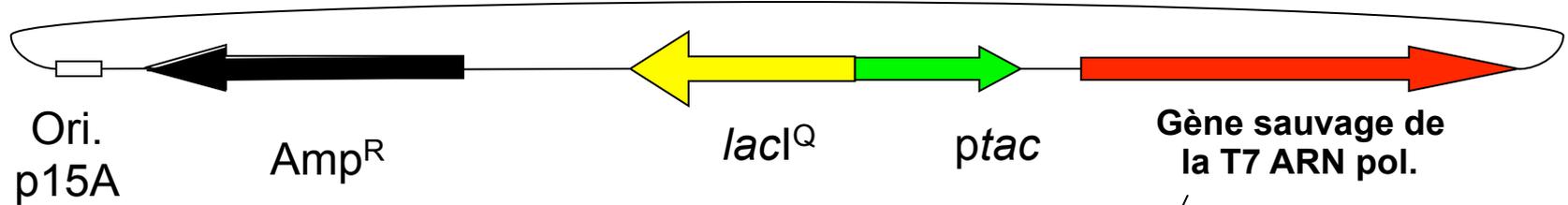


NASBA (méthode isotherme : 41°C, d'amplification des ARNs)

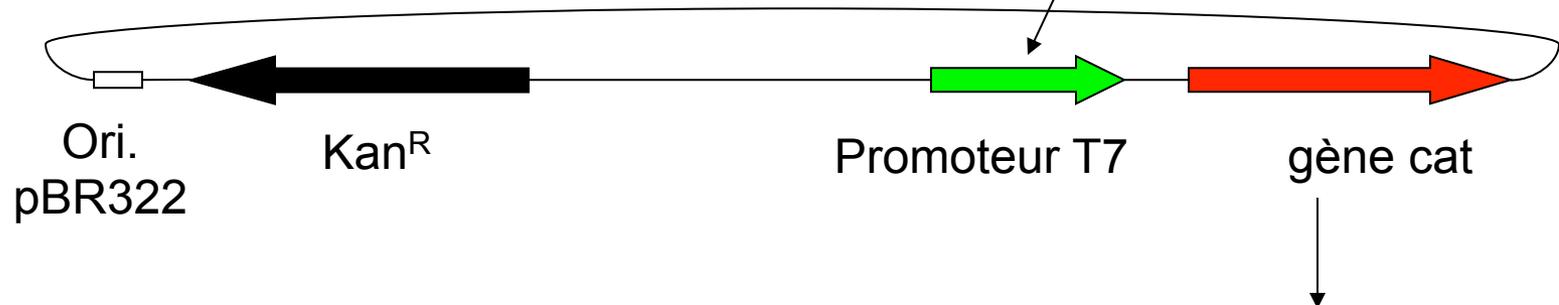


Stratégie de sélection !

Vecteur d'expression de la T7 ARN pol.

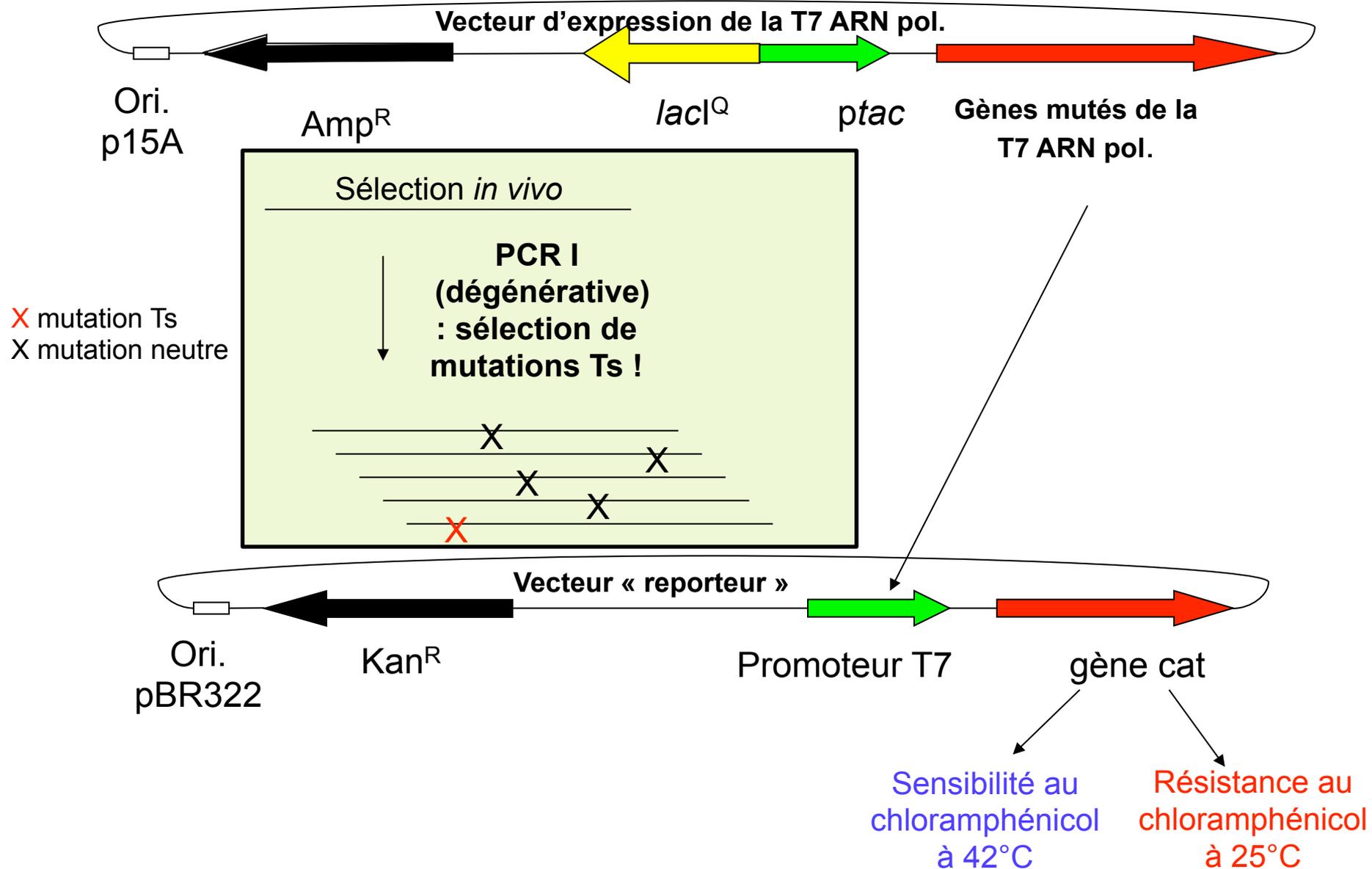


Vecteur « reporteur »

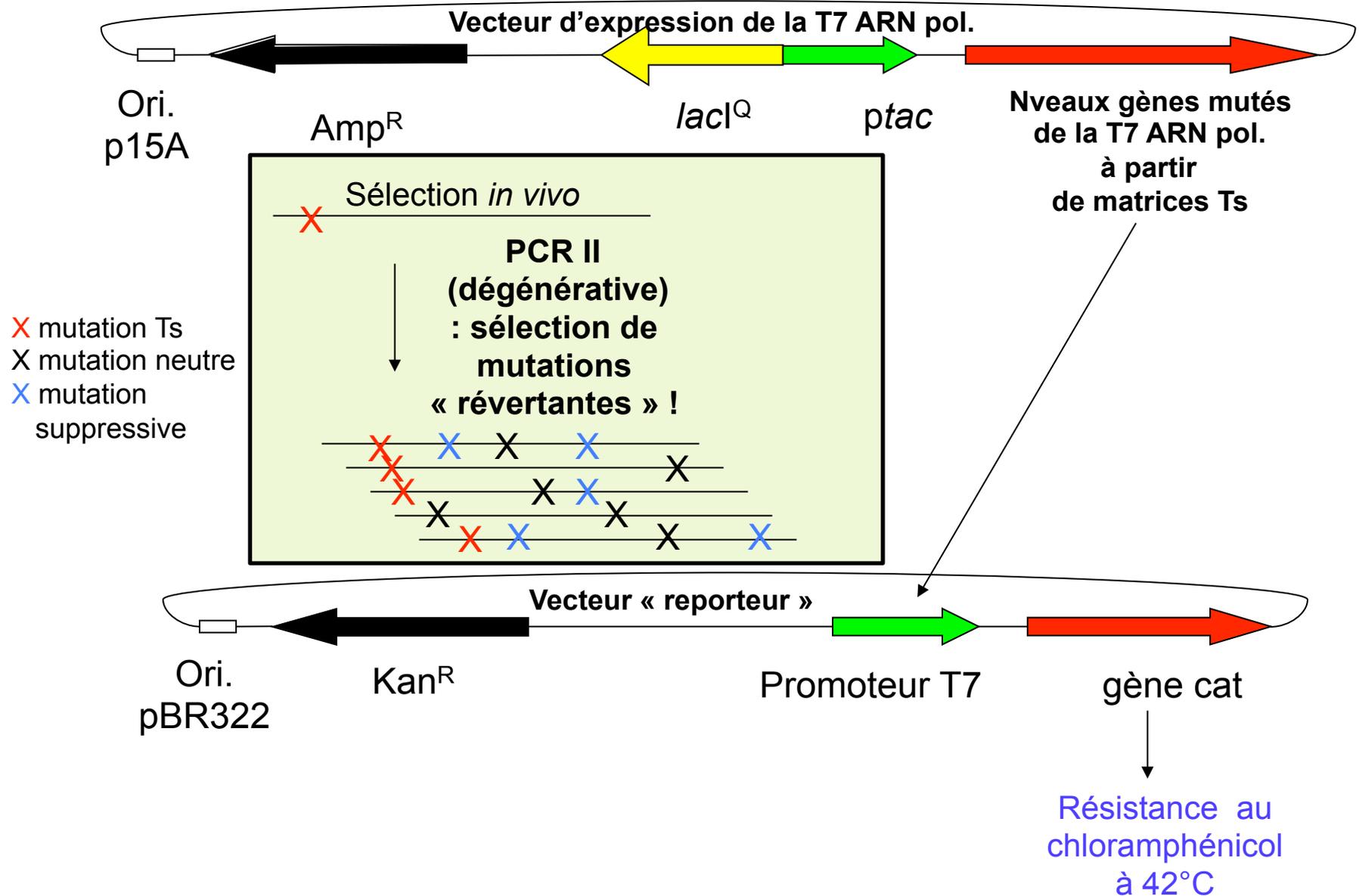


Résistance au chloramphénicol

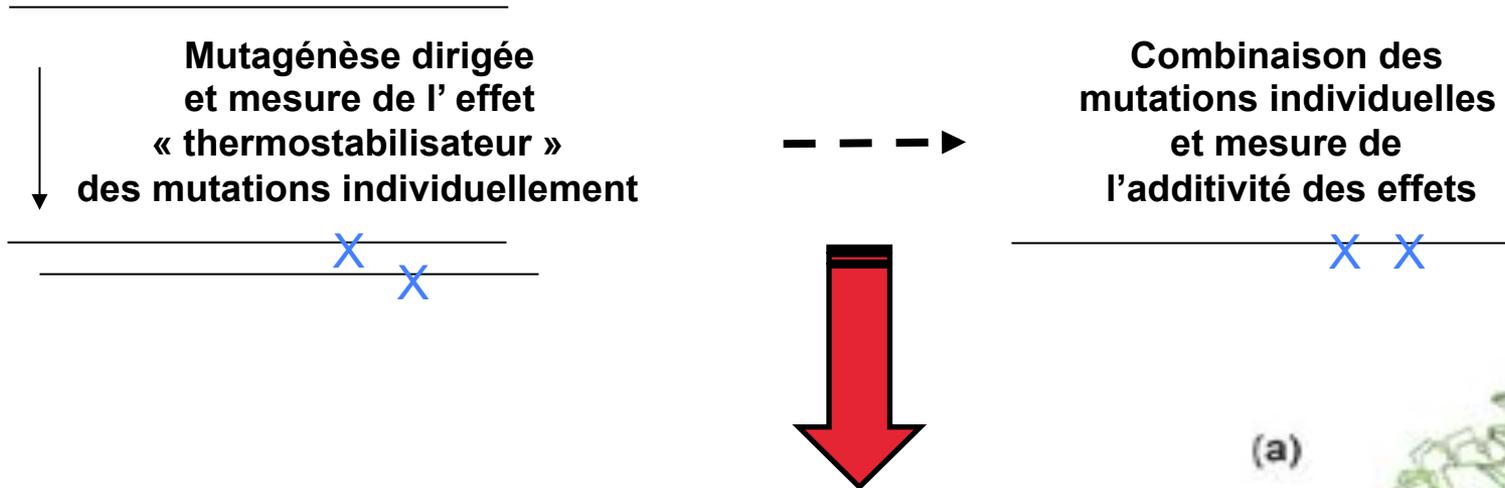
Stratégie de sélection !



Stratégie de sélection !



Combinaison et caractérisation *in vitro* !



→ 11 mutations “révertantes” sélectionnées !

→ 9 augmentent la thermo-stabilité : 0.5, 1.0, 1.5 ou 3.0 (Q786L) °C!

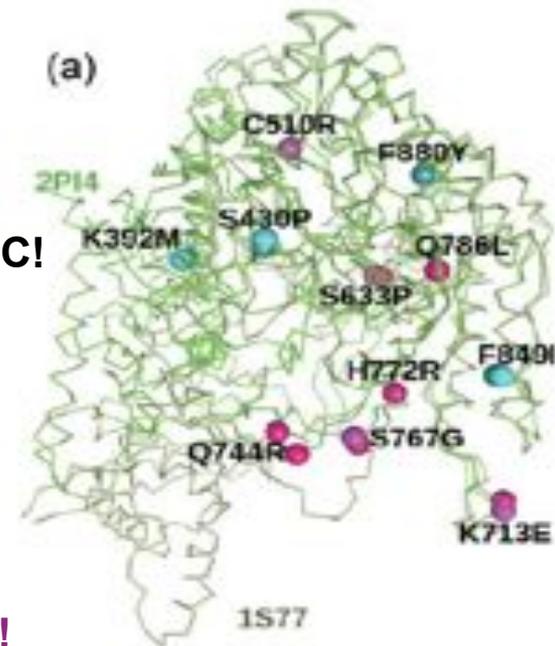
→ 1 augmente l'activité catalytique : Q744R !

→ La combinaison de 7 mutations :

S430P+C150R+Q744R+S767G+Q786L+F849I+F880Y

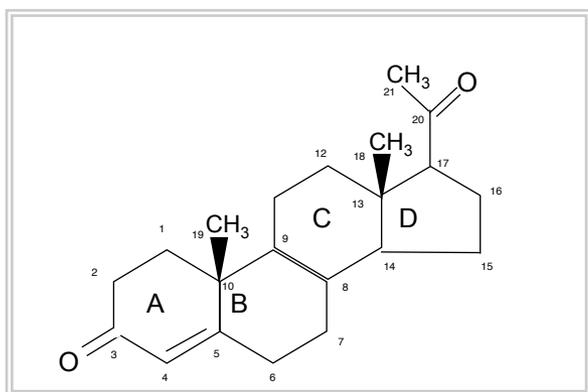
→ 10°C de thermostabilisation et une 2 fois plus

d'activité que la T7 ARN polymérase sauvage !



Exemples d'évolution moléculaire dirigée d'anticorps

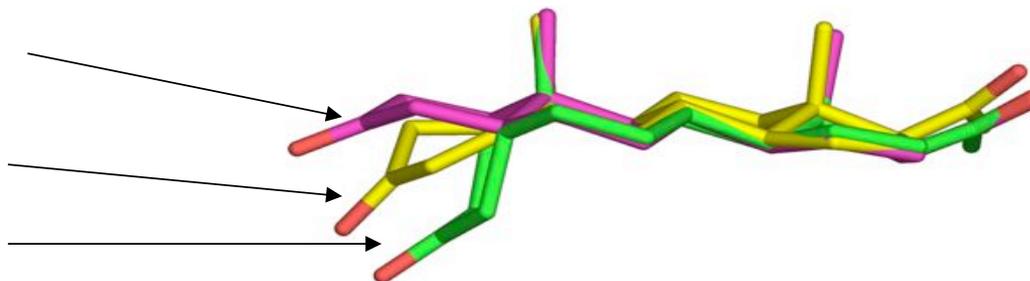
➤ **INGÉNIERIE DE LA SPÉCIFICITÉ DE RECONNAISSANCE D'UN ANTICORPS ANTI-PROGESTÉRONE**



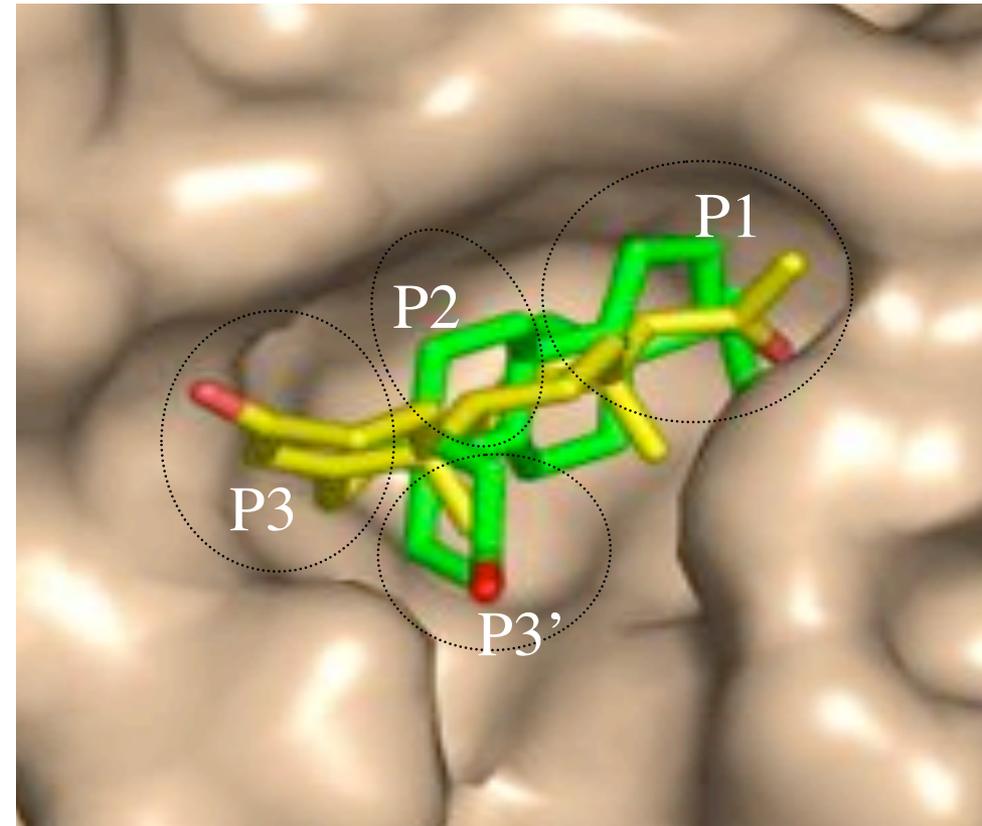
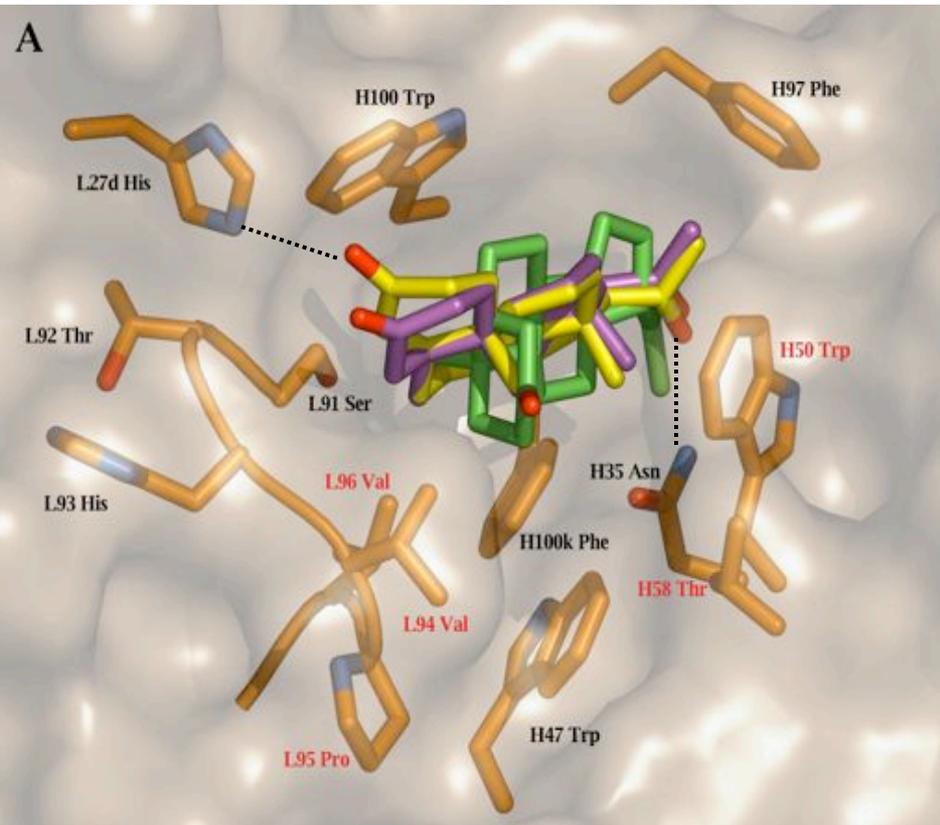
➤ Affinité sub-nanomolaire pour la progestérone :
 $K_D \approx 20\text{pM}$

Mais ...

5 α -DHP (20%)
Progestérone
5 β -DHP (30-60%)



Modèles moléculaires du site de liaison de l'anticorps anti-progestérone



☞ Ingénierie du site de liaison du C12G11 afin de modifier les caractéristiques structurales et physico-chimiques de la poche alternative P3' !

➔ QUELLE(S) STRATÉGIE(S) ?

1^{ÈRE} STRATÉGIE D'INGÉNIERIE DE L'ANTICORPS ANTI-PROGESTÉRONE

Connaissances structurales du site de
liaison (modélisation)



Approche
rationnelle



Analyse mutationnelle des acides aminés du paratope :

Réduire les réactions croisées en modifiant les acides aminés identifiés comme responsables

de la formation de la poche de liaison alternative P3'.

➡ De nombreux mutants à construire, produire et tester...

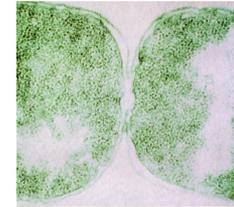
Quels outils pour l'ingénierie des anticorps ?

Des outils recombinants :

➔ Systèmes d'expression de fragments d'anticorps fonctionnels, dont les propriétés de liaison puissent être facilement analysées ...

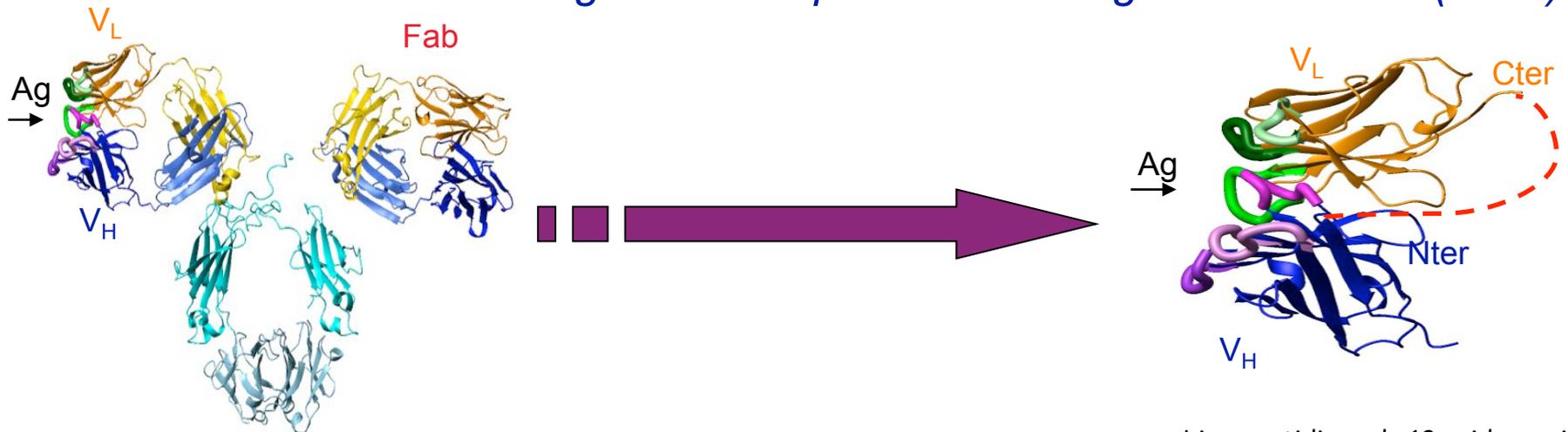
➤ Quel système cellulaire hôte ?

➔ *La bactérie E. coli*



➤ Quel type de fragments d'anticorps ?

➔ *des fragments simple chaîne Fragment variable (scFv)*



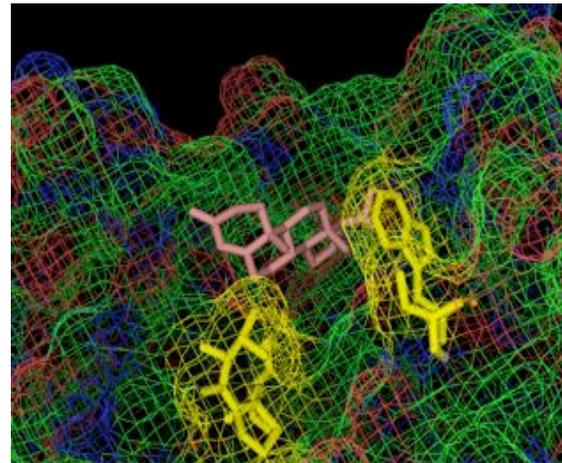
➔ Lien peptidique de 18 acides aminés :
-GSTSGSGKPGSGEGSTKG-

2^{NDE} STRATÉGIE D'INGÉNIERIE DE L'ANTICORPS ANTI-PROGESTÉRONE

Connaissance structurale du site de
liaison (modélisation)

Approche
rationnelle

Analyse
mutationnelle des
résidus du paratope.



Modifications ponctuelles
insuffisantes !

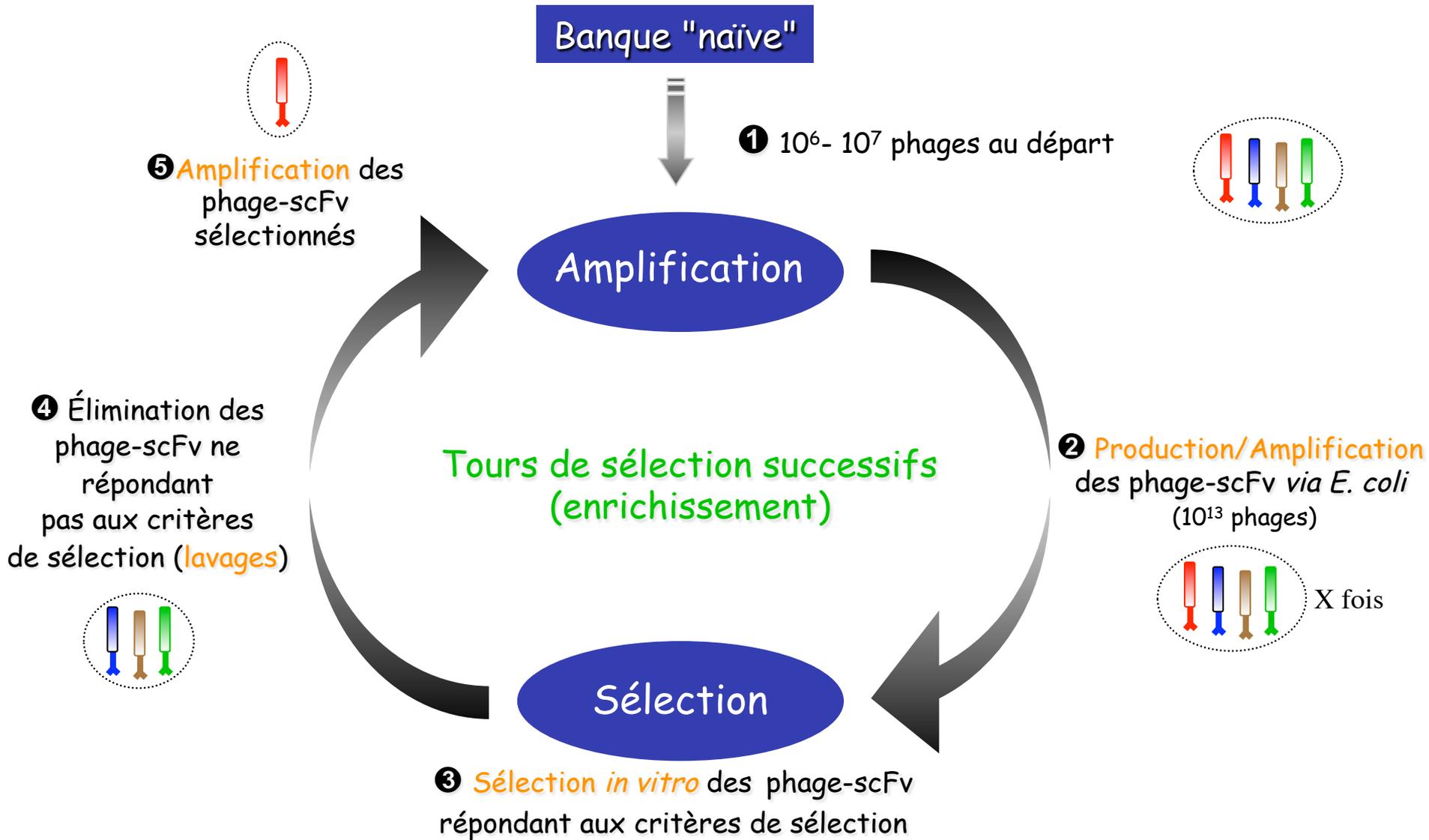
Approche
semi-aléatoire

Banque L3/H2

- ↳ 5 positions ciblées :
 - 94, 96 (VL) et 50, 58 (VH)
dégénérescence complète,
 - 95 (VL) dégénérescence
partielle (70 %).
- ↳ Diversité théorique : **3.2 10⁶ !**

↳ **Problème de la construction, de l'expression
et du criblage d'une telle diversité !**

Principe du criblage (phage-display)

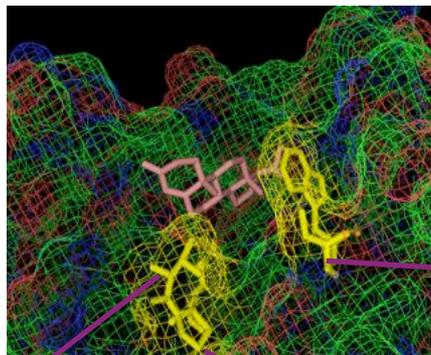


3^{ÈME} STRATÉGIE D'INGÉNIERIE DE L'ANTICORPS ANTI-PROGESTÉRONE

Connaissances structurales du site de liaison (modélisation)

Approche rationnelle

Analyse mutationnelle des acides aminés du paratope.



Approches Semi-rationnelle

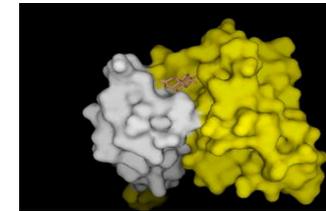
Banque L3/H2

Variants aux propriétés améliorées :

- 7% 5 β -DHP (wt 30%)
- 3% 5 α -DHP (wt 20 %)

Thr⁵⁸ → Arg

Approche aléatoire



Nouveaux mutants

?

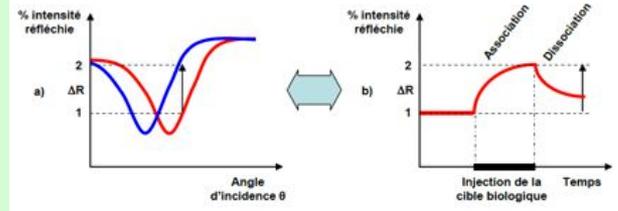
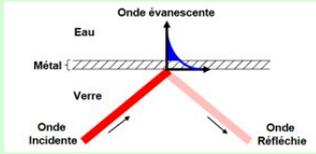
Recherche d'effets synergiques

Val¹⁹⁴ → Pro

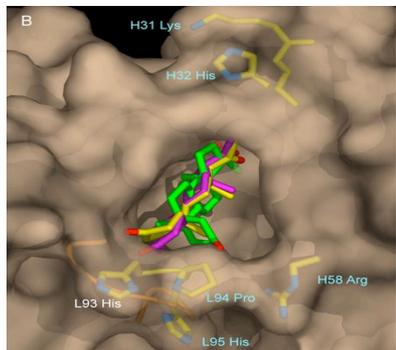
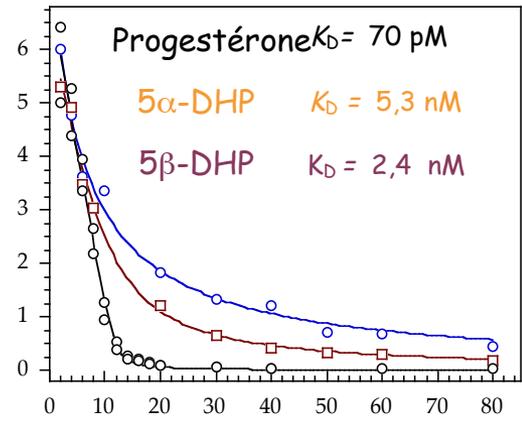
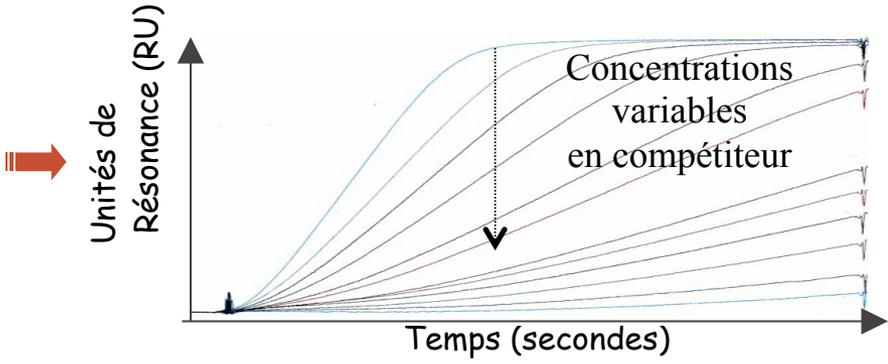
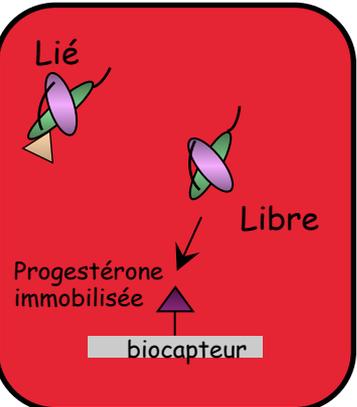
Pro⁹⁵ → His

CARACTÉRISATION DU PENTAMUTANT LE PLUS ABOUTI DE L'ANTICORPS ANTI-PROGESTÉRONE

➔ Analyse par la résonance de plasmons de surface (SPR) du penta-variant : $Pro^{94}-His^{95}-Arg^{58} + Lys^{31}-His^{32}$



a) Evolution des courbes plasmon avant (1) et après (2) une interaction biologique. b) Suivi cinétique en temps réel de la réflectivité décrivant successivement une phase d'association et une phase de dissociation

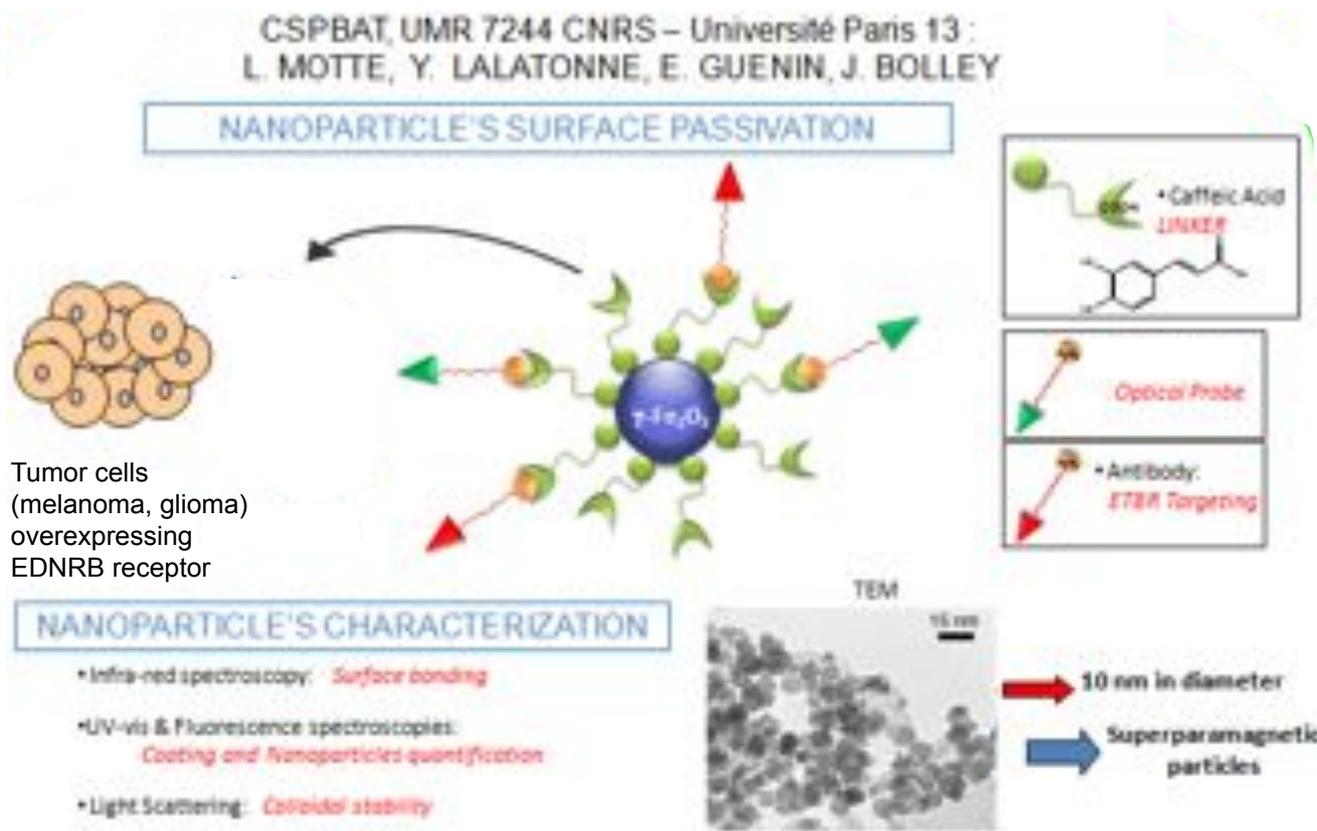


Variant PHV/WR + K31H32

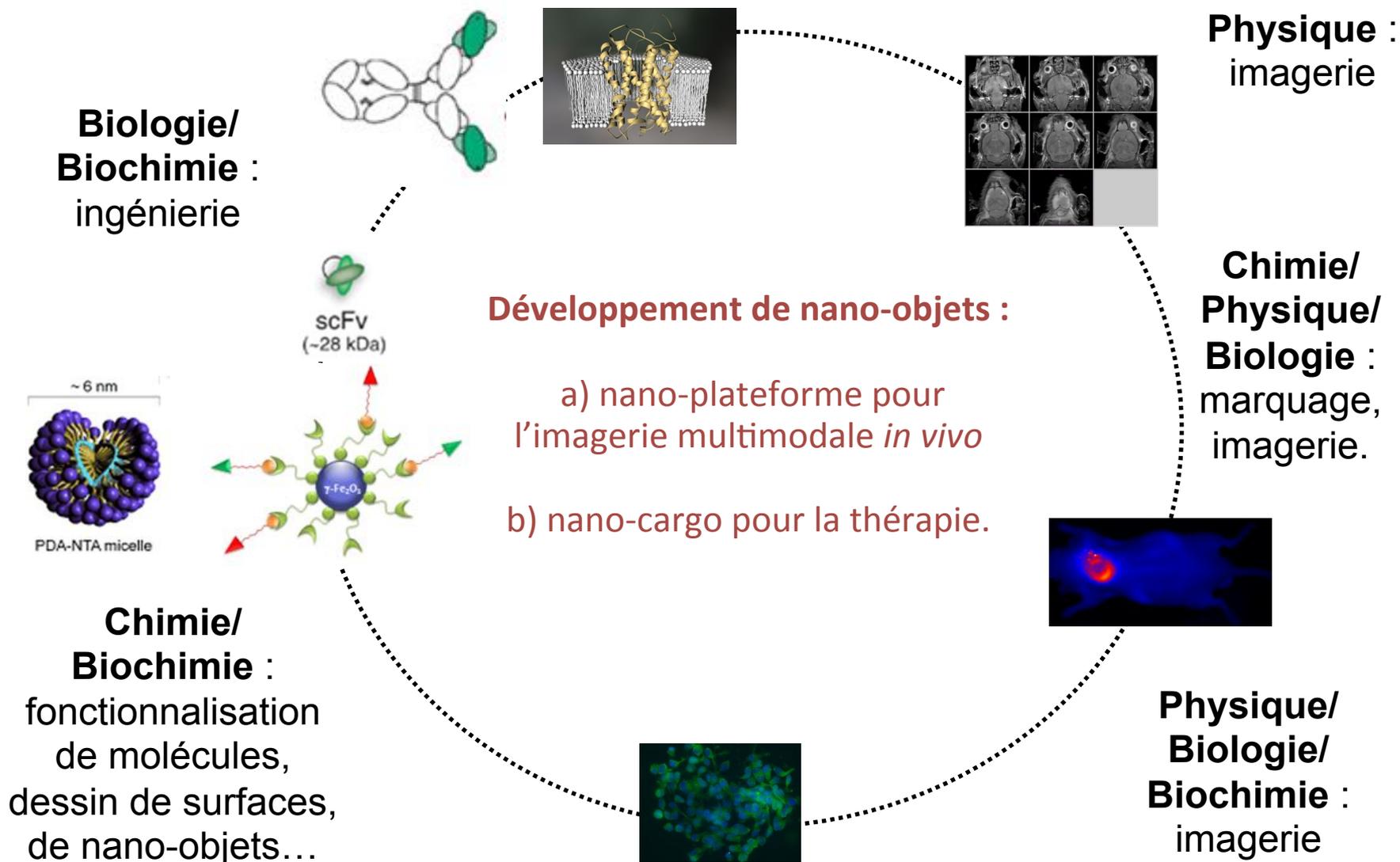
Fragments : scFv-His ₆	Constante de dissociation K_D		
	Progesterone	5 α -DHP	5 β -DHP
Sauvage	19 pM	97 pM	28 pM
$P_{L94}-H_{L95}-R_{H58}$	$\times 3,5$ → 68 pM	$\times 15$ → 1,5 nM	$\times 25$ → 0,7 nM
$P_{L94}-H_{L95}-R_{H58} + K_{H31}-H_{H32}$	70 pM	$\times 3,5$ → 5,3 nM	$\times 3,5$ → 2,4 nM

➔ Gains de spécificité : 1,3 % (5 α -DHP) \Rightarrow 53 fois + spécifique
2,9 % (5 β -DHP) \Rightarrow 85 fois + spécifique

Nanoplatforme multimodale IRM-Fluorescence ou IRM-Isotopique



L'IMAGERIE : UN DOMAINE TRANSVERSALE CHIMIE/ BIOLOGIE/PHYSIQUE!



→ Exemple des tumeurs du système nerveux central

Conclusion Générale

→ *La recherche fondamentale et les applications potentielles sont intimement liées aux évolutions technologiques !*

→ *Toujours besoin de savoirs “fondamentaux”!*

→ *De plus en plus d'interfaces : biologie, biochimie, chimie, physique, bio-informatique...!*

Merci pour votre patience !

Place aux questions...

Diapos supplémentaires

Transcriptomes (454/GS FLX) de glandes à venin

Quelques exemples d'études de transcriptomique par NGS en matière de toxines animales :

→ Appareils venimeux : 454

- Garter snake: *Thamnophis elegans*, Schwartz TS et al., **BMC Genomics** (2010)
- Snake: *Crotalus adamanteus*, Rokyta DR et al., **Toxicon** (2011)
- Snake: Costa Rica snakes, Durban J et al., **BMC Genomics** (2011)
- Cones: *Conus pulicarius*, Lluisma AO et al., **Marine Genomics** (2012)
- Cones: *Conus geographus*, Hu H et al., **BMC Genomics** (2012)
- Cones: *Conus consors*, Terrat Y et al., **Toxicon** (2012)

→ Appareils venimeux : 454 + Illumina

- Snake: *Crotalus adamanteus*, Rokyta DR et al., **BMC Genomics** (2012)

→ 22 études publiées à ce jour...

→ Phylogénie moléculaire

→ Classification des animaux venimeux

→ Spécificité des cellules des glandes à venin...

STRATÉGIES D'ÉVOLUTION MOLÉCULAIRE EN MATIÈRE D'INGÉNIERIE DES PROTÉINES

Approche
rationnelle

Approches
semi-rationnelles

Approches
aléatoires



- ➔ On peut réaliser de l'ingénierie de protéines en absence de connaissance structurale.
- ➔ *Trouver les molécules recherchées dépend de la capacité à analyser un grand espace structural, ce dernier pouvant être exploré par sous-ensembles.*
- ➔ Les solutions recherchées émergent de la combinaison de ces différentes approches :
 - reflet entre autre de l'**indépendance** et de l'**additivité** de certaines mutations, et de notre incapacité actuelle à prédire les mutations pertinentes...
- ➔ Chaque approche livre son lot d'informations, qui peuvent être complémentaires.
- ➔ *Il est indispensable de disposer de cribles et/ou de sélection et d'outils de caractérisation efficaces et pertinents !*

« You get what you screen for !! »

Collecter puis identifier les cônes...



Conus catus (p)



Conus episcopatus (m)



Conus canonicus (m)



Conus textile (m)



Conus striatus (p)



Conus imperialis (v)



Conus retifer
(m) :
siphon sorti



Conus tulipa (p)

Disséquer les cônes...



Collecte d'une journée aux Tuamotu



Une journée de récolte à la presqu'île (Tahiti)



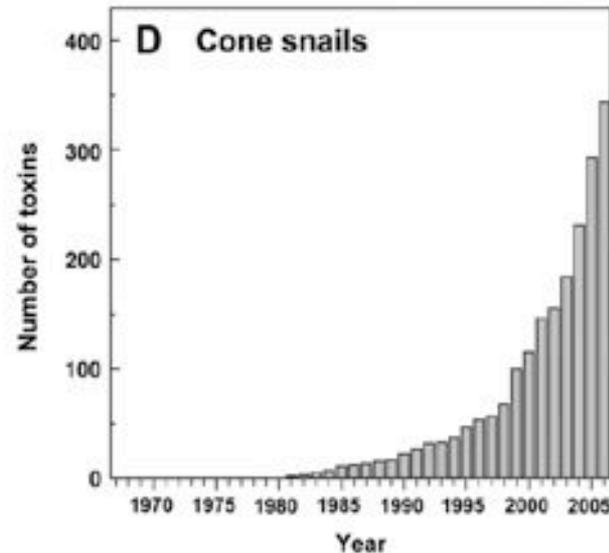
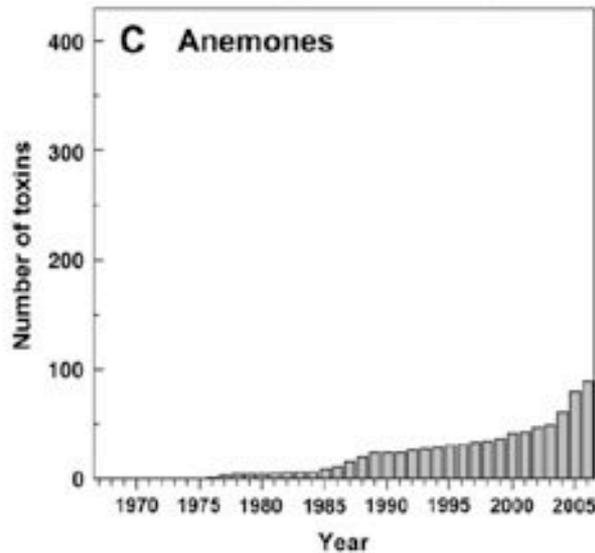
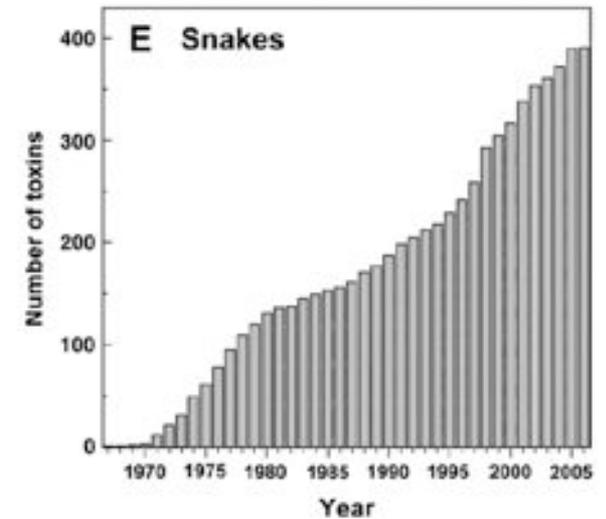
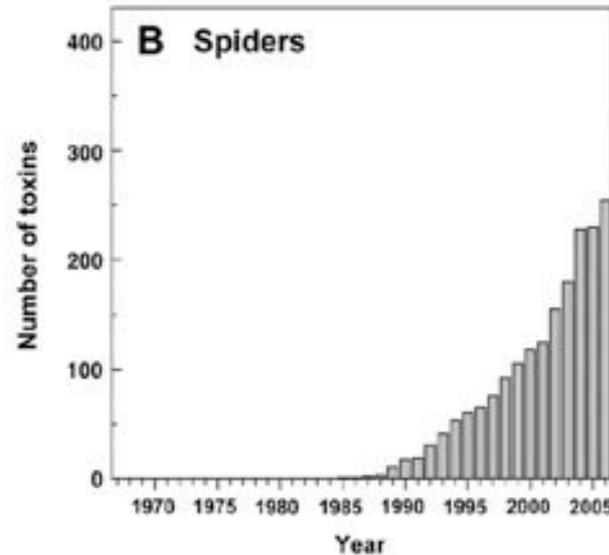
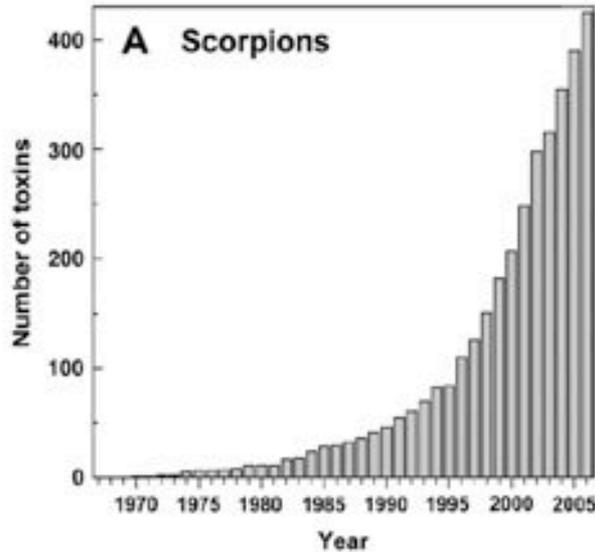
Un peu de communication : Polynésie Première !



Le labo de campagne sur l'atoll de Makémo

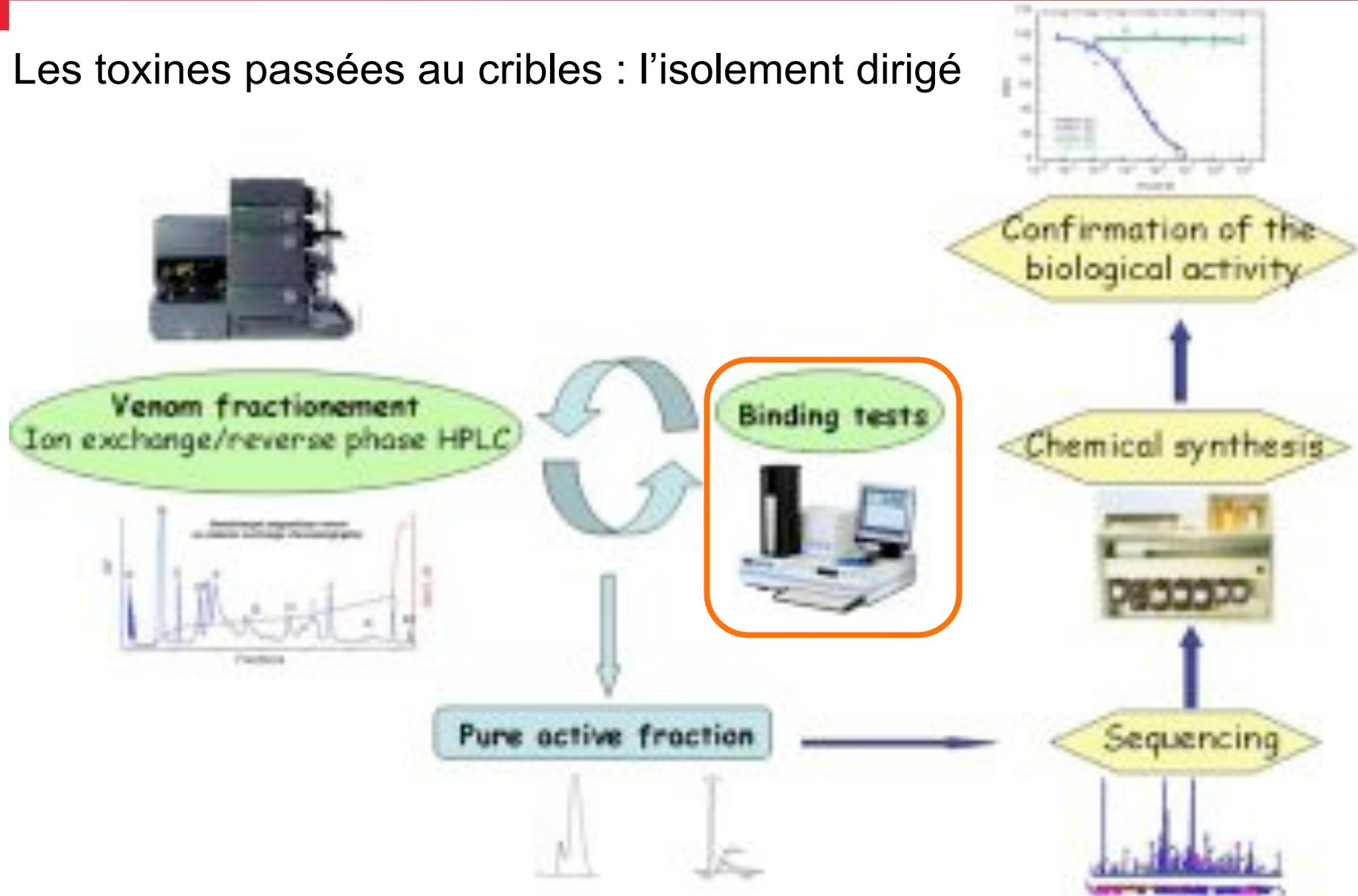


2000's l'ère « Venomic »



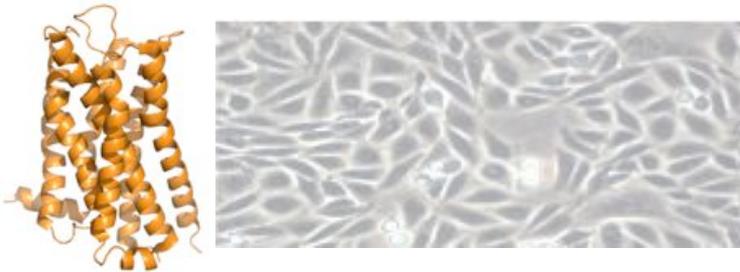
Nombre de toxines
dans les banques,
croissance
exponentielle depuis
les années 2000...

Les toxines passées au cribles : l'isolement dirigé

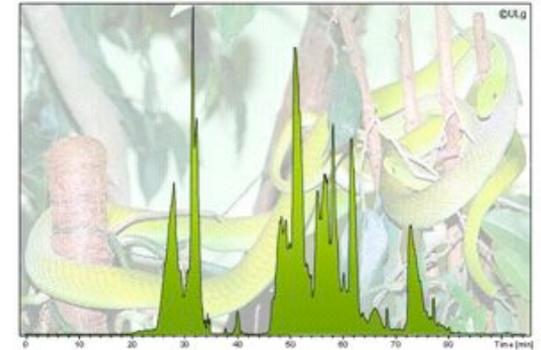


Les toxines passées au cribles : l'isolement dirigé

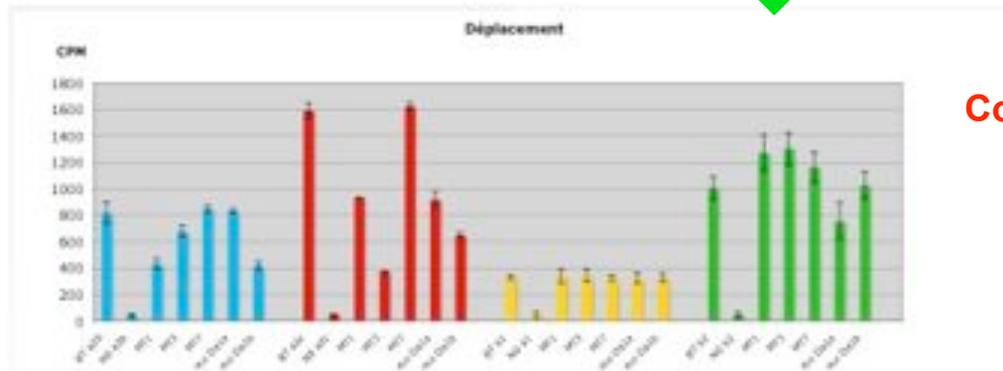
Surexpression d'un récepteur
(canaux, RCPG...) dans une lignée
cellulaire (transfection de plasmide)



Venin fractionné



Mis en présence des sous fraction du venin avec le récepteur d'intérêt et un radiotraceur sélectif du récepteur



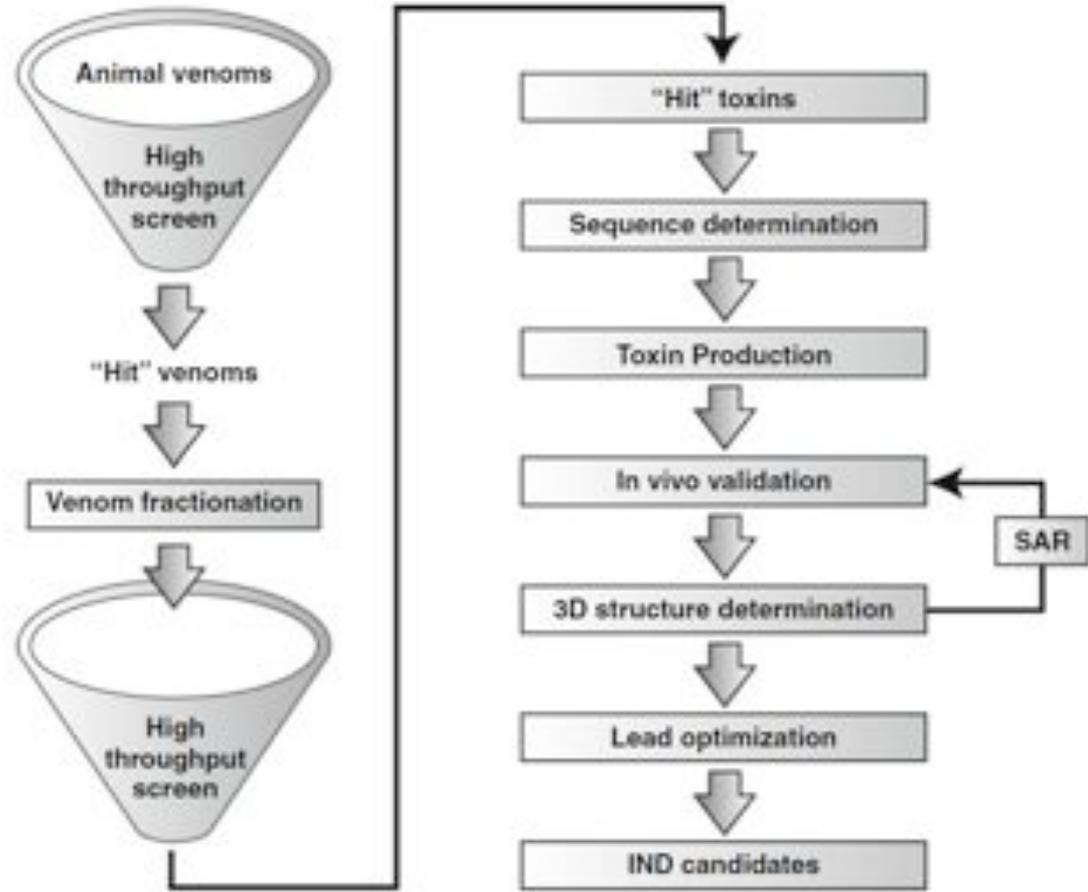
Compétition toxine/radiotraceur

Les toxines et le « drug development »

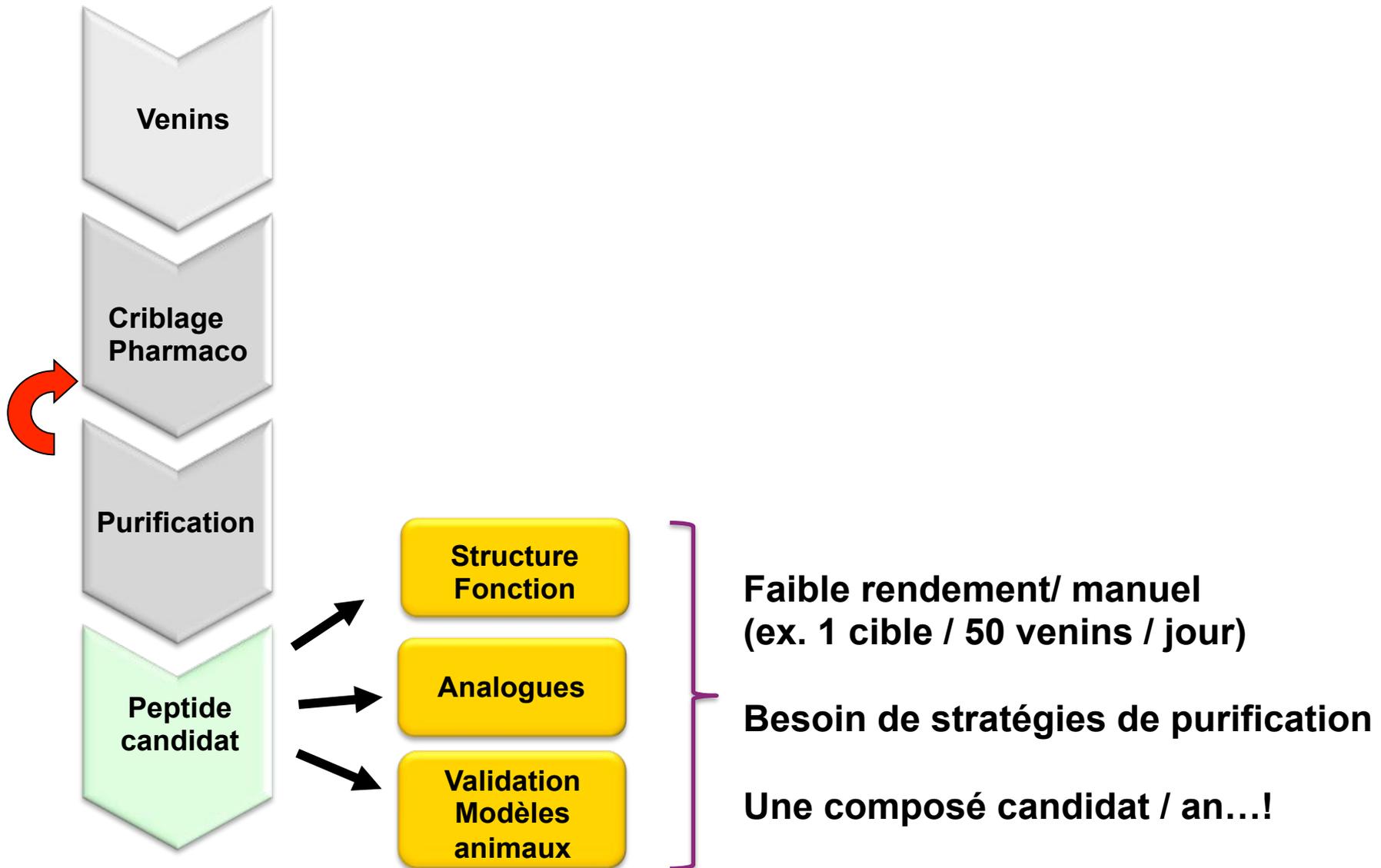
Venoms-based drug discovery

17

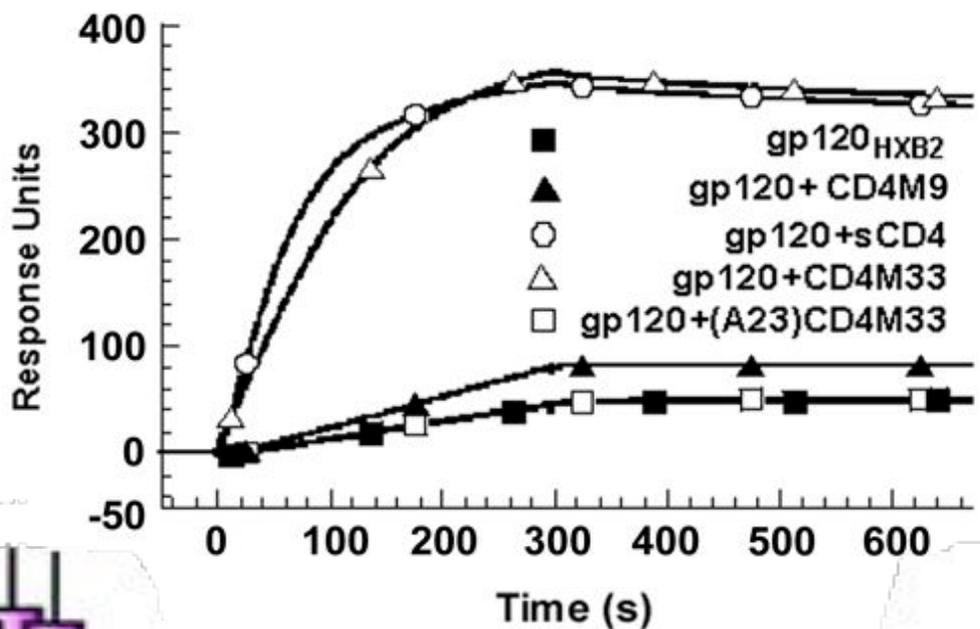
Fig. 1 The key elements of a venoms-based drug discovery program. A robust high-throughput screen is essential to rapidly identify venoms with desired activity and to allow subsequent isolation of bioactive molecules. An efficient toxin production system is essential not only to produce sufficient toxin for functional and structural characterization, but also to facilitate structure-activity relationship (SAR) studies. Structural characterization is no longer a major bottleneck in the discovery pipeline due to recently developed high-throughput NMR methods



L'approche « classique »



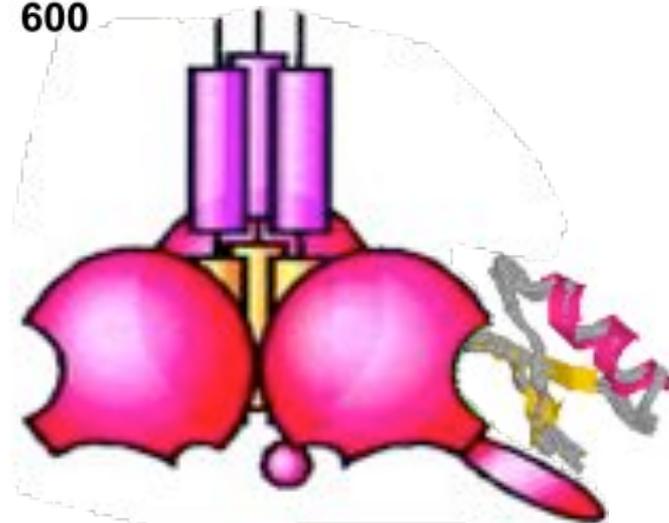
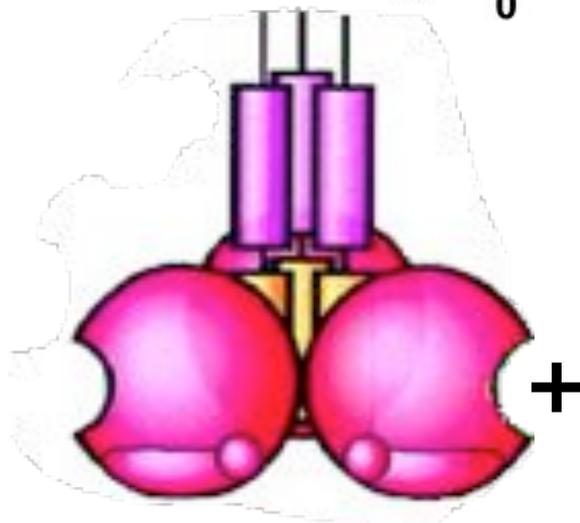
Changements conformationnels de la gp120 induits par la liaison du mime moléculaire CD4M33



Sensorgrammes
Biacore sur un mAb
immobilisé
spécifique d'un



épitope masqué .



Vers un vaccin?

Comprendre l'origine de la toxicité des venins : isoler les toxines, déterminer leurs séquences chimiquement...

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 247, No. 12, Issue of June 25, pp. 4029-4042, 1972
Printed in U.S.A.

Snake Venom Toxins

THE AMINO ACID SEQUENCES OF TWO TOXINS FROM *DENDROASPIS POLYLEPIS POLYLEPIS*
(BLACK MAMBA) VENOM

(Received for publication, November 12, 1971)

DANIEL J. STRYDOM

*From the National Chemical Research Laboratory, Council for Scientific and Industrial Research,
Pretoria, Republic of South Africa*

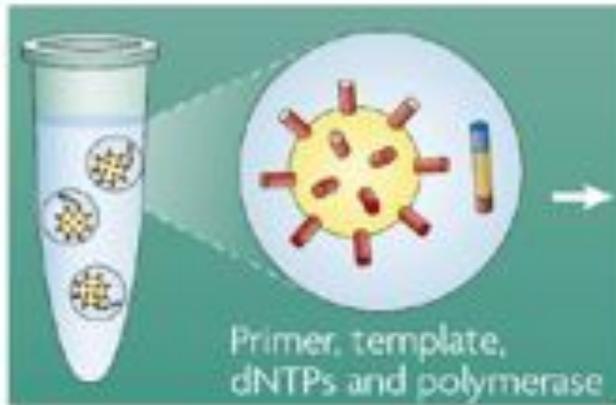


Pyroséquençage : principe général

- Technique totalement automatisée de séquençage de l'ADN
 - Décrite dans sa version initiale en 1988, elle permet d'analyser la synthèse d'ADN cible en temps réel (séquençage par synthèse d'ADN)
 - Technique en train de supplanter la méthode de Sanger car :
 - plus rapide,
 - moins onéreuse,
 - utilisant la PCR (amplification),
 - ne nécessitant pas :
 - de clonage, ni de passage par les bactéries ou les phages,
 - de nucléotides radiomarqués,
 - d'étape de séparation des produits néo-synthétisés
- et,
- permettant une lecture de la séquence d'ADN en temps réel, par révélation de l'activité d'une ADN polymérase qui ajoute un seul nucléotide non fluorescent à la fois.

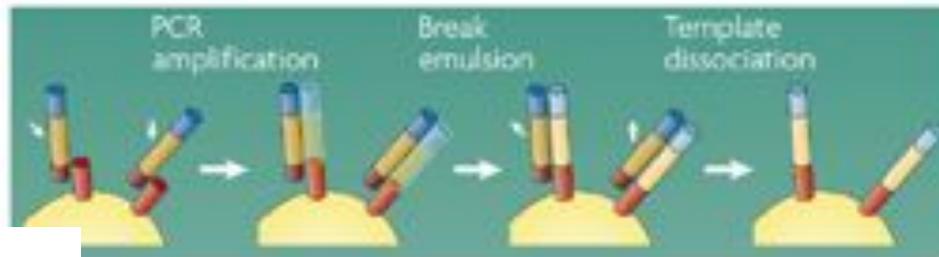
Pyroséquençage :

amplification clonale des ADN par PCR à émulsion (emPCR)

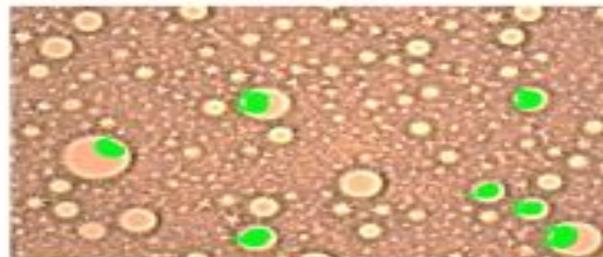
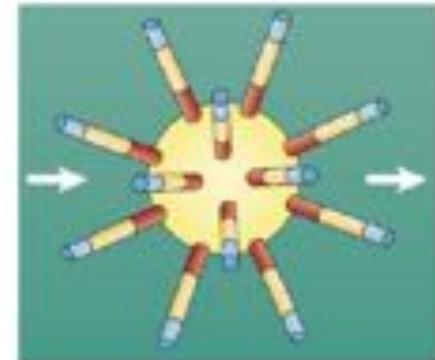


- l'ADN est fragmenté, chaque fragment d'ADN (simple-brin) est associé à ses extrémités à un oligonucléotide (adapter)

- PCR à émulsion : chaque fragment est emprisonné dans une microgoutte d'eau contenant une bille couverte d'une séquence d'ADN complémentaire à un des deux adapters; la microgoutte contient tous les réactifs d'une réaction de PCR → amplification du fragment à la surface de la bille ($\sim 10^7$ copies / bille)

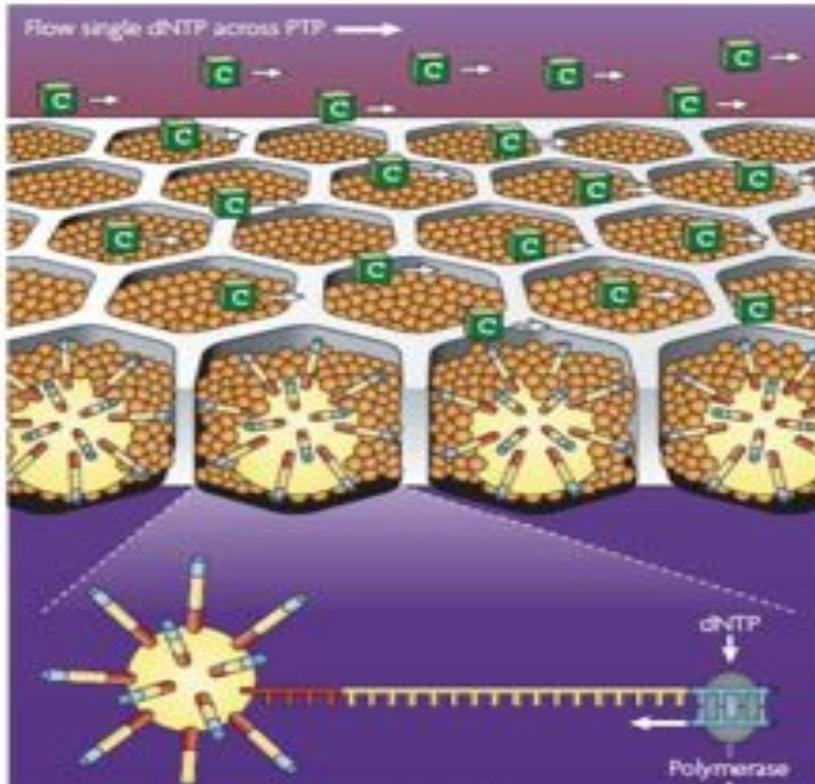


The Water-in-Oil-Emulsion

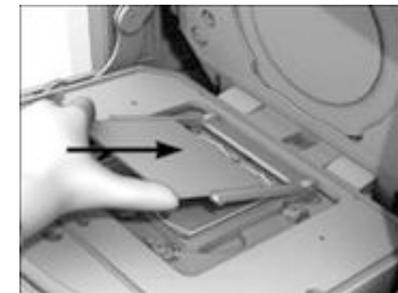
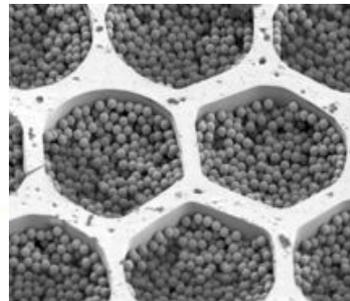


Pyroséquençage :

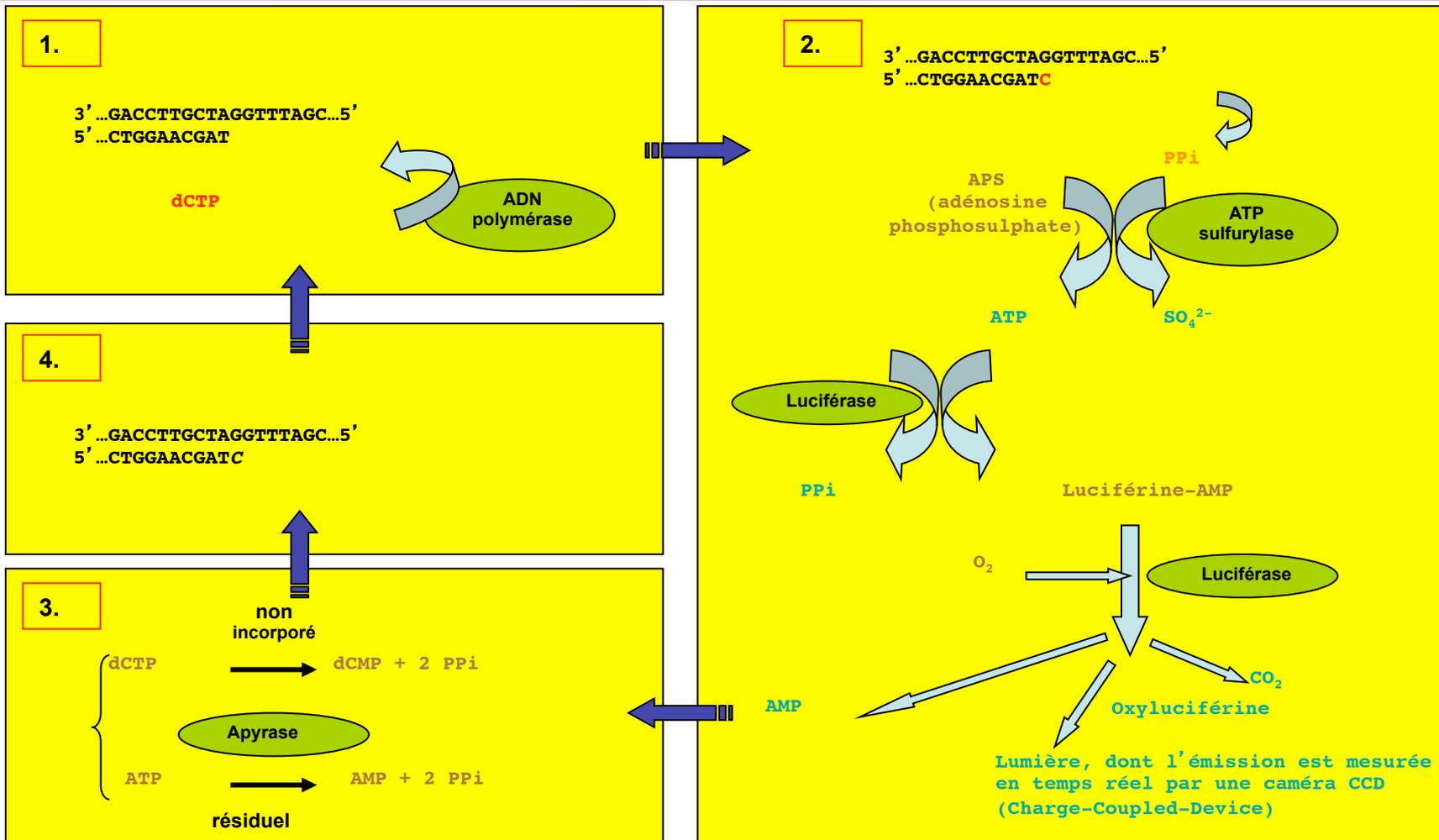
dépôt en *PicoTiter Plate*™ (20⁵ puits de 44μM)



- Chaque bille (1-2.10⁶ au total) est déposée dans les trous d'une "picotiter plate"
- Dans chaque trou, hybridation de l'amorce à l'extrémité 3' du fragment amplifié.
- Passage de flux successifs de solutions contenant un seul dNTP (G > T > A > C > G > T > A > C ...)
- Chaque incorporation d'un nucléotide (polymérisation) libère une molécule de pyrophosphate (PPi); une réaction enzymatique utilise ce PPi comme substrat et génère un flash lumineux qui est enregistré ("pyrosequencing").
- Les enzymes qui catalysent cette réaction chimiluminescente sont à la surface de microbilles (en orange) entourant chaque bille



Pyroséquençage : principe d'une réaction de synthèse



- La production de lumière est proportionnelle à la concentration en ATP généré par l'ATP sulfurylase.
- De l'alphathio-dATP est utilisé au lieu de dATP, afin d'éviter toute production de lumière supplémentaire.
- Après un cycle, on passe à un autre déoxynucléotide et ainsi de suite...

Pyroséquençage : distribution des signaux

- Les signaux évoluent linéairement lors de l'incorporation de chaque nouvelle base

