

ESSAIS PRÉLIMINAIRES *IN VITRO* ET *IN VIVO* D'UN INTERFÉRON-ALPHA PORCIN RECOMBINANT

C. La BONNARDIERE (1), F. LEFEVRE (1), R. L'HARIDON (1),
S. BERNARD (2), B. CHARLEY (1)

(1) INRA, Station de Virologie et Immunologie moléculaires, 78350 JOUY EN JOSAS.

(2) INRA, Station de Pathologie porcine, 37380 MONNAIE.

avec la collaboration technique de Christiane de VAUREIX et Chantal FEYNEROL

Un gène de l'interféron alpha (IFN- α 1) du porc a été cloné dans *Escherichia coli* et exprimé à haut niveau (> 400 000 UI/ml). La protéine recombinante, purifiée par immunoaffinité, montre en culture de cellules les mêmes propriétés que l'IFN leucocytaire (naturel), sauf sur un point : elle est beaucoup plus antivirale que ce dernier sur cellules homologues de rein de porc. L'administration *in vivo* à raison de 10^6 U.I./kg de poids vif, produit des effets différents selon l'âge des porcs : chez l'adulte, une hyperthermie peu élevée mais significative (+ 2°C) suit l'injection et s'accompagne dans les 24 heures d'une leucopénie transitoire. Chez le jeune (moins de 8 jours), aucun effet toxique significatif n'a été décelé, d'après les critères : température et prise de poids, et ce même avec 5 répétitions successives de la même dose. A l'issue de ces tests, nous considérons la protéine recombinante comme un substitut valide de l'IFN- α 1 naturel pour des expérimentations ultérieures *in vivo*.

Preliminary *in vitro* and *in vivo* trials of a recombinant porcine interferon-alpha

One of the genes encoding swine interferon alpha (IFN- α 1) was cloned into *Escherichia coli* and expressed at a high level (> 400,000 IU/ml). The recombinant protein, after purification by immunoaffinity, exhibited the same properties in cell cultures as its natural counterpart (leucocyte IFN) except for one criterion : the recombinant IFN- α was more antiviral (six-fold) on homologous pig cell lines. After *in vivo* injections of 10^6 IU/kg of IFN- α 1, pharmacological effects differed with age : in adults, a limited but significant hyperthermia (+ 2°C), and a transient leucopenia, followed injection. In newborns, no significant toxic effect was apparent, neither in terms of body temperature nor in weight gain, even after five successive injections. In view of these results, we consider the recombinant *E. coli*-derived IFN- α as a suitable substitute of natural IFN- α for further *in vivo* experimentations.

INTRODUCTION

Les interférons (IFN) sont des protéines naturelles, inductibles dans de nombreux tissus, dont les leucocytes sanguins, par la plupart des agents infectieux (STEWART, 1979). Le rôle joué par les IFN endogènes, synthétisés très précocément dans le processus de défense contre les virus, a été abordé dans le modèle murin par le groupe de GRESSER (1975). Au moyen d'anticorps puissants dirigés contre l'IFN- α/β , ces auteurs ont montré que l'IFN a pour effet de limiter le niveau mais aussi la sphère de multiplication de la majorité des virus. *A fortiori*, dans de nombreuses infections virales expérimentales, on obtient une protection très significative si de l'IFN exogène est administré préventivement (TYRELL, 1987). Mais les IFN, en particulier les IFN- α , ne sont pas seulement des agents antiviraux : on leur connaît d'autres propriétés parmi lesquelles des effets antitumoraux et immunomodulateurs. Le clonage du premier gène d'IFN- α humain par le groupe de C. WEISSMANN (1980) a constitué un progrès considérable dans la connaissance de cette famille de gènes, et ouvrait la voie à la production, à faible coût, de quantités importantes de protéine active. Différents IFN- α clonés sont actuellement à l'essai en clinique humaine, essentiellement en oncologie.

L'espèce porcine peut non seulement constituer un bon modèle expérimental pour l'étude du système IFN, mais comme d'autres espèces d'élevage, pourrait être l'objet d'indications de traitements à l'IFN, dans des pathologies respiratoires et digestives, survenant à des phases critiques et prévisibles de l'élevage. Dans le cadre d'un travail sur l'IFN- α endogène du porcelet nouveau-né, nous avons été amenés à cloner et à séquencer plusieurs gènes IFN- α du porc (LEFEVRE et La BONNARDIERE, 1986). La famille multigénique a été localisée sur le bras long du chromosome 1 (YERLE et al, 1986). L'un des gènes, IFN- $\alpha 1$ a été récemment exprimé à haut niveau chez *Escherichia coli*. Nous présentons dans cet article quelques unes des propriétés, en culture de cellule, de cet IFN recombinant, ainsi que les premières données pharmacocinétiques obtenues chez le porc non infecté.

1. MATÉRIEL ET METHODES

1.1. Production et purification d'un interféron recombinant

Le gène IFN- $\alpha 1$ a été isolé d'une banque d'ADN de porc, au moyen d'une sonde cDNA d'IFN- $\alpha 2$ humain fournie par C. WEISSMANN (LEFEVRE et La BONNARDIERE, 1986). La partie de la séquence correspondant à la protéine «mature», précédée d'une méthionine initiateur, a depuis été clonée dans un vecteur plasmidique d'expression de *Escherichia coli* sous contrôle du promoteur (P_R) du bactériophage lambda (LEPLATOIS et DANCHIN, 1983). La souche bactérienne hébergeant ce plasmide modifié produit constitutivement 400.000 unités internationales (U.I.) d'IFN- α par ml de culture brute.

L'IFN est extrait du culot bactérien en milieu dénaturant (guanidine 7,5 M) et réducteur (2-mercaptoéthanol 2%) par la méthode de VALENZUELA *et al* (1985). Plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre l'IFN- $\alpha 1$ recombinant ont été isolés (R. L'HARIDON *et al*, en préparation). L'un de ces anticorps, C22, a été couplé par le glutaraldéhyde à un gel d'aminohexyl-sepharose 4B (Pharmacia) (CAMBIASO *et al*, 1975). L'IFN semi purifié extrait de *E. coli* est alors purifié à

plus de 90 % en un seul passage sur cette colonne d'affinité. L'éluion est effectuée à pH 2,5.

Les électrophorèses en gel d'acrylamide-SDS sont réalisées selon la technique de LAEMMLI (1970). La séquence de l'extrémité NH₂ de la protéine purifiée a été réalisée dans un microséquenceur en phase gazeuse Applied Biosystem 470 A au Laboratoire d'analyses des protéines de l'INRA à Versailles.

1.2. Mesure de l'activité antivirale en culture de cellules

Le titrage biologique de l'effet antiviral de l'IFN porcine sur cellules bovines MDBK éprouvées par le virus de la stomatite vésiculaire, a été publié précédemment (La BONNARDIERE *et al*, 1986). Les titres antiviraux sont exprimés en unités internationales d'après le calibrage sur l'IFN de référence humain Ga 23-902-530 (NIH, Bethesda). D'autres lignées cellulaires ont été utilisées par comparaison avec les cellules MDBK et le titrage sur ces lignées a été effectué par la même technique (tableau 1).

L'IFN- α leucocytaire de porc (IFN-leuco) est obtenu après infection de leucocytes fraîchement prélevés par le virus de l'Influenza A/Philippines.

Le sérum anti-IFN- α humain (mouton n° 166) a été produit et aimablement fourni par l'Institut Pasteur de Garches. La séro-neutralisation est effectuée par la méthode «à sérum constant» de KAWADE et WATANABE (1984).

1.3. Animaux - Paramètres pharmacocinétiques

L'IFN purifié, ajusté à la concentration 1×10^6 UI/ml, a été injecté par voie intramusculaire dans le membre postérieur. Les porcelets Large White de 5 jours ont reçu 10^6 U.I./kg de poids vif. Les porcs adultes de 80 kg environ (2 mâles et 2 femelles LW x Piétrain) ont reçu respectivement 1×10^6 et 2×10^5 UI/kg de poids vif. Du sang a été prélevé par ponction aortique sur une période de 32 heures après l'injection d'IFN. L'activité antivirale a été titrée dans le sérum comme il est indiqué en 1.2.

2. RÉSULTATS

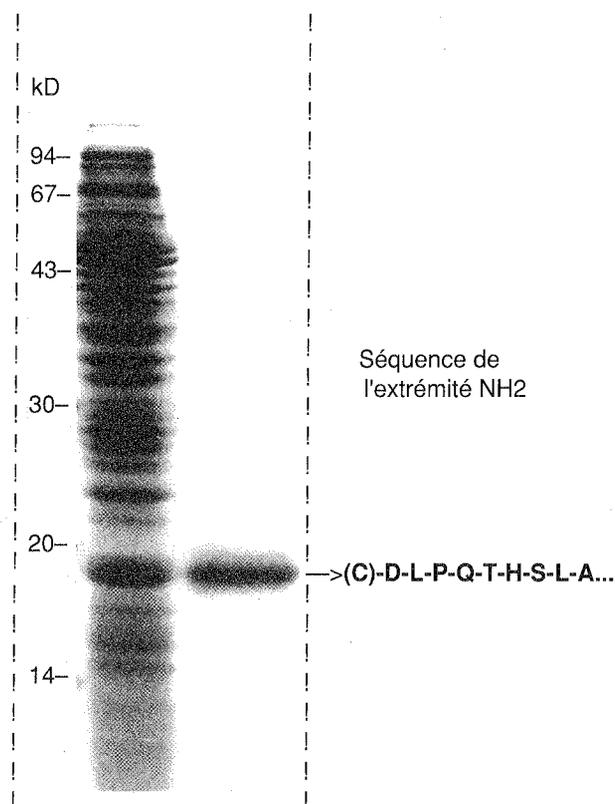
2.1. Purification de l'IFN recombinant - Séquence de l'extrémité NH₂

La protéine recombinante produite dans le cytoplasme bactérien sous forme de corps d'inclusion peut être extraite, après rupture des parois cellulaires, au moyen d'un dénaturant fort (guanidine 7,5 M) en présence de 2-mercaptoéthanol (2-ME) pour la réduction des ponts disulfures. Cet extrait est ensuite purifié à plus de 80-90% par chromatographie d'immunoaffinité.

L'IFN- $\alpha 1$ présente dans ces conditions une masse molaire apparente de 18 kd. Il est environ à 90 % pur (Figure 1). Pour confirmation, la protéine correspondant à cette bande a été soumise à un micro-séquençage par la méthode d'EDMAN. La séquence obtenue confirme : 1) la pureté du produit (pas d'ambiguïté sur les 10 premiers acides aminés) ; 2) le fait que la protéine est pour l'essentiel non méthionylée et non bloquée.

FIGURE 1
ELECTROPHORÈSE SUR GEL D'ACRYLAMIDE
EN CONDITIONS RÉDUCTRICES (2-ME) D'UN EXTRAIT BRUT
BACTÉRIEN PORTANT LE PLASMIDE PRND2N-231 (piste
gauche), ET DE L'IFN- α MATURE, PURIFIÉ
PAR IMMUNOAFFINITÉ SUR COLONNE D'ANTICORPS
MONOCLONAUX (piste droite).

Une fraction aliquote de ce même IFN purifié a été soumise à une dégradation d'EDMAN pour la détermination de la séquence NH₂ terminale. La cystéine en position terminale est entre parenthèses car elle n'a pas de dérivé pTH dans la réaction d'EDMAN.



2.2 - Activité antivirale de la protéine recombinante

Les essais ont été effectués au laboratoire sur cellules issues de 4 espèces différentes et par comparaison avec l'IFN naturel produit sur leucocytes de porc.

Les résultats font apparaître un spectre d'activités large, pour

TABLEAU 1
ACTIVITÉ ANTIVIRALE (U.I./ml)
SUR CELLULES D'ESPÈCES DIFFÉRENTES

ESPECES	LIGNEE	IFN-LEUCO	IFN- α 1
BOVINE	(MDBK)	3 000	3 000
HUMAINE	(WISH)	330	330
MURINE	(L929)	440	250
PORCINE	(PD5) *	330	2 200
	(ST83)**	110	660

* Cellules de rein

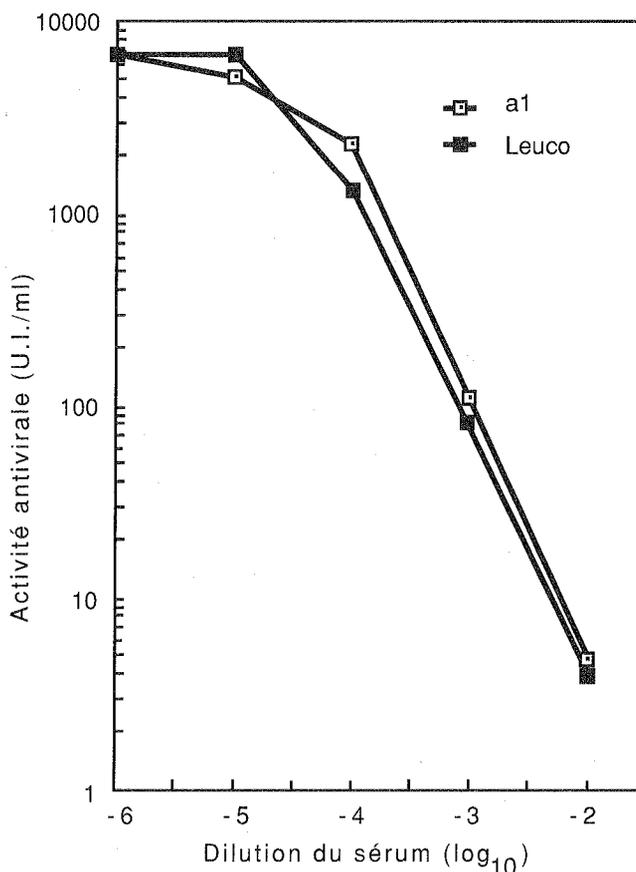
** Cellules de testicules

les deux interférons. Ils sont tous deux les plus actifs sur cellules bovines (MDBK). La différence majeure entre les deux types d'IFN est visible sur cellules porcines : la sensibilité des deux lignées de porc à l'IFN- α 1 est six fois supérieure à celle mesurée pour l'IFN naturel, en prenant comme référence les titres moyens obtenus sur les cellules des autres espèces.

2.3. Antigénicité

Il a été montré précédemment que les IFN- α humain et porcine présentent une forte parenté antigénique (SOLOVIEV et al, 1982 ; La BONNARDIERE et al, 1986 ; PIASECKI, 1988). Nous avons comparé l'IFN porcine leucocytaire et l'IFN- α 1 de ce point de vue : la figure 2 montre que les immunoglobulines de mouton anti IFN- α humains neutralisent les deux types d'activités avec la même relation dose-effet.

FIGURE 2
SÉRONEUTRALISATION DE L'ACTIVITÉ VIRALE DE L'IFN- α 1 ()
ET DE L'IFN LEUCOCYTAIRE (■) PAR UN SÉRUM DE MOUTON
DIRIGÉ CONTRE L'IFN- α HUMAIN.



Des résultats récents obtenus avec des anticorps monoclonaux dirigés contre l'IFN recombinant confirment cette très forte ressemblance antigénique (résultats non présentés).

2.4. Essais préliminaires chez les porcs non infectés

Les premiers essais ont eu pour objectifs :

- de déterminer les demi-vies apparentes de l'IFN recombinant dans le sang d'animaux de différents âges, afin de prévoir sa biodisponibilité et d'ajuster les doses lors de traitements préventifs ultérieurs.
- d'enregistrer, chez l'adulte comme chez le jeune, les effets toxiques éventuels.

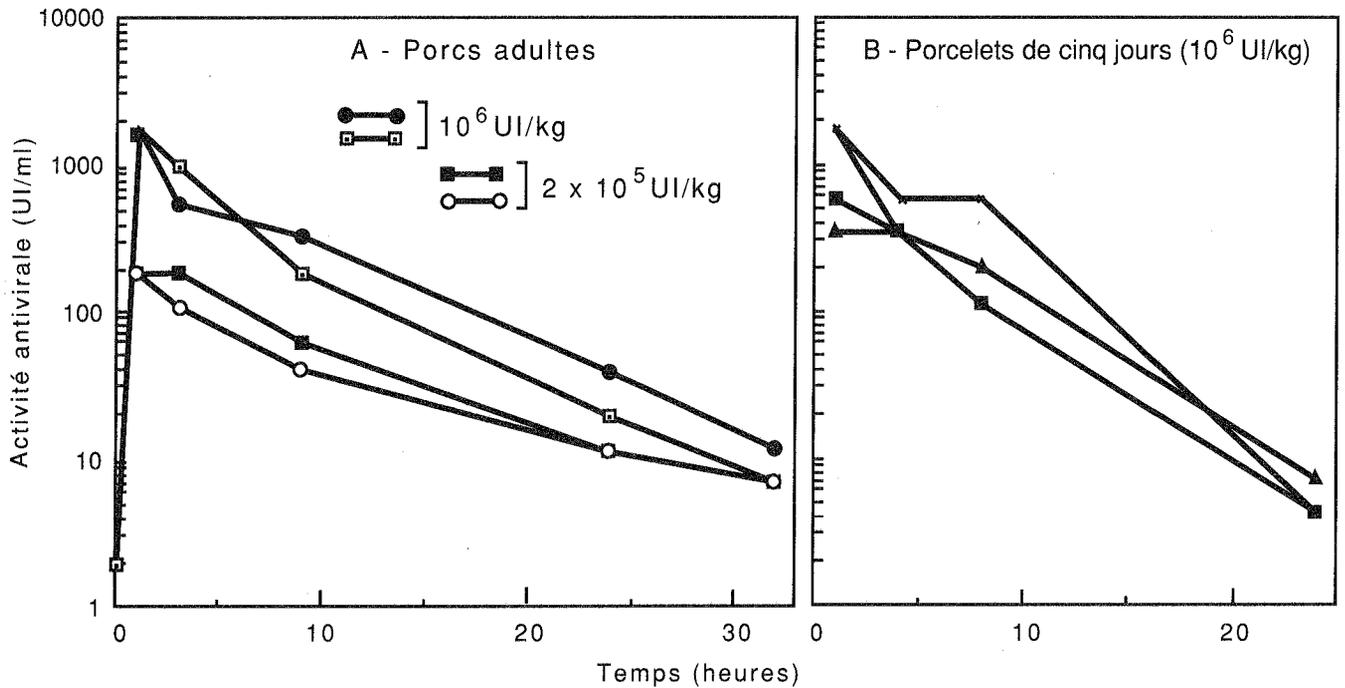
2.4.1. Chez le porcelet nouveau-né :

des doses de 1×10^6 U.I. (soit environ $10 \mu\text{g}$ de protéine pure)

par kg de poids vif ont été administrées par la voie I.M. le T_{max} ou temps (après injection) de concentration maximale dans le sérum est inférieur à 1 h, le C_{max} ou concentration maximale est de 1700 UI/ml , et le T_{1/2} ou temps de demi-vie apparente est dans ces conditions de $210 \pm 40 \text{ min.}$, entre les temps 9h et 24h après injection (figure 3). Aucun effet pyrogène, ni sur la prise de poids n'a été détecté chez le nouveau-né (résultats non présentés).

FIGURE 3

PHARMACOCYNÉTIQUE DE L'IFN α RECOMBINANT SUR PORC LARGE-WHITE APRÈS INJECTION INTRAMUSCULAIRE



2.4..2. Porc adulte

Quatre porcs de 80 kg ont été injectés par voie I.M. avec la même préparation. Deux ont reçu 10^6 UI/kg, deux autres 2×10^5 UI/kg (figure 3). Concernant les paramètres pharmacocinétiques, T_{max} et C_{max} sont équivalents à ceux observés chez les nouveaux-nés. En revanche le T_{1/2} est plus élevé chez l'adulte, et fonction de la dose : T_{1/2} = 280 et $470 \pm 90 \text{ min.}$

pour les doses de 10^6 et de 2×10^5 UI/kg respectivement, entre 8 heures et 24 heures après l'injection. La seconde différence importante concerne l'hyperthermie observée chez les porcs adultes, en particulier à la dose d'IFN la plus élevée (tableau 2).

Dans une deuxième expérience sur porcs adultes, utilisant les

TABLEAU 2
TEMPÉRATURE RECTALE (°C) DE PORCS DE 80 KG
APRÈS INJECTION INTRAMUSCULAIRE D'IFN- α RECOMBINANT

DOSE D'IFN (U.I.)	N° PORC	JOUR / HEURE					
		J-1	J0		J1		J2
			T0	T9H	T24H	T32H (5)	
1×10^6	100	38.8	38.3	40.8	38.7	37.5	38.7
	101	38.2	38.9	40.4	39.0	37.6	38.5
2×10^5	102	38.1	39.2	39.0	38.3	38.3	38.1
	103	38.1	38.6	39.4	38.2	38.6	38.3

mêmes doses d'IFN- α , la numération globulaire 18 heures après injection fait apparaître une leucopénie significative chez les porcs traités. Cette baisse du compte globulaire est fonction de la dose, et concerne à la fois les lymphocytes et les monocytes (chiffres non présentés). La formule sanguine est tout-à-fait normale 6 jours après injection.

DISCUSSION

Si les résultats présentés indiquent que l'IFN- α recombinant n'est pas identique à l'IFN naturel, les données tant quantitatives que qualitatives sont en faveur de la poursuite des expériences avec l'IFN- α 1 cloné en bactéries :

Quantitativement, l'expression en bactéries permet des rendements bruts en IFN- α 1, 50 à 100 fois supérieurs à ceux obtenus sur leucocytes viro-induits. Ainsi pour une dose de traitement d'un porc de 80 kg à raison de 10^6 UI/kg (environ 10 mg/kg), 0,5 litre de culture bactérienne suffit. Il faudrait 12 à 16 litres de suspension de leucocytes de porc pour une dose équivalente d'IFN naturel. Les problèmes de coût et de purification de l'IFN naturel sont en proportion.

Sur le plan qualitatif, deux éléments nous semblent ressortir : tout d'abord la protéine bactérienne possède la séquence NH₂-terminale attendue d'après la construction génétique (LEFÈVRE et La BONNARDIÈRE, 1986). La méthionine initiatrice est pour l'essentiel clivée par la bactérie et ne devrait donc pas induire la production d'anticorps spécifiques indésirables. En second lieu, l'IFN- α recombinant est différent du mélange naturel (tableau 1), en particulier par une activité antivirale relative bien supérieure sur cellules de porc. Ce résultat n'est pas inattendu : on sait en effet que parmi les espèces clonées d'IFN- α humain, l'IFN- α 2 a une activité spécifique 100 fois plus élevée que l'IFN- α 1 sur cellules humaines. Ce rapport est en corrélation avec une affinité différente des récepteurs pour l'IFN (STREULI *et al*, 1981 ; AGUET *et al*, 1984 ; UZE *et al*, 1985). Ce même résultat nous indique enfin que l'IFN- α 1 n'est

pas une sous-espèce très représentée dans le mélange naturel.

La pharmacocinétique et les tests de toxicité n'ont pas pu être menés en parallèle pour les deux types d'IFN, pour les raisons évoquées précédemment. Les courbes de demi-vie apparente font apparaître un catabolisme plus rapide de l'IFN chez le jeune, vraisemblablement en liaison avec une mauvaise réabsorption rénale de l'IFN chez le porcelet (La BONNARDIÈRE *et al*, 1983). La biodisponibilité par la voie intramusculaire choisie est satisfaisante, puisqu'une activité antivirale significative est décelable jusqu'à 24 heures chez le jeune, 32 heures chez l'adulte. Enfin, les signes de toxicité de courte durée observés chez l'adulte (fièvre, leucopénie) correspondent assez exactement aux effets secondaires consécutifs aux traitements de patients humains par l'IFN recombinant (SCOTT, 1983). L'absence d'effet toxique chez le jeune, à dose équivalente par kg de poids vif, est remarquable et non documentée à ce jour.

L'obtention d'un IFN- α porcin recombinant permettra de développer les recherches en pathologie virale dans deux directions : en premier lieu, des sérums et des anticorps monoclonaux puissants sont en cours d'obtention et de caractérisation. Ces anticorps seront des outils précieux pour l'évaluation du rôle de l'IFN dans les pathologies virales, en particulier chez le jeune. En second lieu, des essais d'IFN exogène en prophylaxie dans des pathologies entériques et/ou respiratoires vont pouvoir être menées.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier IBA-VETOQUINOL pour sa contribution, notamment pour la préparation des bactéries recombinantes, ainsi que pour la pharmacocinétique sur porcs adultes. Nous remercions aussi le Dr. Ph. VANNIER (C.N.E.V.A., Ploufragan) pour sa collaboration efficace aux expériences sur animaux. Nos remerciements vont aussi à J.C. HUET (C.N.R.A., Versailles) pour l'analyse de la séquence de l'extrémité NH₂ de la protéine. Enfin, nous remercions E. de CONCHARD pour la saisie, la mise en forme du manuscrit.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AGUET, M., BRÖBKE, M., DREIDING, P. (1984). *Virology*, 132, 211-216.
- CAMBIASO, C.L., GOFFINET, A., VAERMMAN, J.P., HEREMANS, J.F. (1975). *Immunochemistry*, 12, 273-278.
- GRESSER, I., TOVEY, M.G., MAURY, C., BANDU, M.T. (1975). *J. exp. Med.*, 144, 1316-1323.
- GRESSER, I. (1982). Can interferon induce disease ? In *Interferon* 4, 95-127. Edited by I. Gresser. New-York : Academic Press.
- KAWADE, Y. AND WATANABE, Y. (1984). *J. IFN. Res.*, 4, 571-584.
- LA BONNARDIÈRE, C., LAUDE, H., CHARLEY, B. (1984). The pig as possible model species for studies on endogenous and exogenous interferons. In *Adjuvants, interferon and non specific immunity*, 65-74. Commission of the European communities.
- LA BONNARDIÈRE, C., LAUDE, H., BERG, K. (1986). *Annales de l'Institut Pasteur / Virologie* 137E, 171-180.
- LAEMMLI, U.K. (1970). *Nature* 227, 680-685.
- LEFÈVRE, F., La BONNARDIÈRE, C. (1986). *Journal of Interferon Research* 6, 349-360.
- LEPLATOIS, P., DANCHIN, A. (1983). *Biochimie* 65, 317-324.
- NAGATA, S., TAIRA, H., HALL, A., JOHNSRUD, L., STREULI, M., ECSÖDI, J., BOLL, W., CANTELL, K., WEISSMANN, C. (1980). *Nature*, 284, 316-320.
- PIASECKI, E. (1988). *Journal of Interferon Research* 8, 61-73.
- SCOTT, G. M. (1983). The toxic effects of interferon in man. In *Interferon* 5, 85-114. Edited by I. Gresser. New York : Academic Press.
- SOLOVIEV, V.D., POKIDYSHEVA, L.N., VOLODINA, T.N. (1982). *Vopr. virusol.*, 27, 526-527.
- STEWART, W.E. (1979). «The interferon system» Ed. Springer Verlag (Wien - New York).
- STREULI, M., HALL, A., BOLL, W., STEWART, W.E., II, NAGATA, S., WEISSMANN, C. (1981). *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 78, 2848-2852.
- TYRELL, D.A.J. (1987). *Rev. infect. Dis.* 9, 2, 243-249.
- UZÉ, G., MOGENSEN, K.E., AGUET, M. (1985). *EMBO Journal*, 4, 65-70.
- VALENZUELA, D., WEBER, H., WEISSMANN, C. (1985). *Nature* 313, 698-699.
- YERLE, M., GELLIN, J., ECHARD, G., LEFÈVRE, F., GILLOIS, M. (1986). *Cytogenetic and Cell Genetics* 42, 129-132.