

L'OVALBUMIN-RELATED PROTEIN X (OVAX) EST UNE PROTEINE APPARENTÉE A L'OVALBUMINE QUI POSSEDE DES ACTIVITES ANTIBACTERIENNES

Réhault-Godbert Sophie¹, Labas Valérie², Chessé Magali¹, Gautron Joël¹,
Coste Franck³, Guyot Nicolas¹ et Nys Yves¹

¹INRA, UR83 Recherches Avicoles, Fonction et Régulation des Protéines de l'Œuf,
F-37380 Nouzilly, France,

²INRA - Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomolécules et de Phénomique des Animaux
d'Intérêt Bio-agronomique – 37380 – Nouzilly – France,

³CNRS, UPR4301 Centre de biophysique moléculaire, Réparation de l'ADN :
approches structurales et fonctionnelles, F-45071 Orléans, France

srehault@tours.inra.fr

RÉSUMÉ

Avec une concentration de 50 mg/mL, l'ovalbumine constitue la protéine majeure du blanc d'œuf, de fonction encore méconnue. Deux homologues de cette protéine ont été identifiés dans l'œuf : l'ovalbumin-related protein X (OVAX) et l'ovalbumin-related protein Y (OVAY). Les trois protéines ont des séquences protéiques très proches mais ont également des spécificités leur conférant possiblement des activités biologiques différentes. L'OVAX a été purifiée à partir du blanc d'œuf grâce à une combinaison de chromatographies d'exclusion et d'affinité. Nous avons montré que l'OVAX est une glycoprotéine qui possède une affinité pour l'héparine, un glycosaminoglycane chargé négativement, grâce à un domaine spécifique exposé qui n'existe pas chez l'ovalbumine. Au contraire de son homologue, l'OVAX possède des activités antibactériennes vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* et *Salmonella Enteritidis*, deux pathogènes responsables d'intoxications alimentaires. Cette propriété impliquerait le domaine de liaison à l'héparine. Cette activité anti-*Listeria* a été valorisée par un brevet (Patent WO 2011/151407) et pourrait avoir des applications dans le domaine de l'agroalimentaire pour limiter la croissance de *Listeria* sur des denrées telles que les fromages ou les charcuteries voire en santé humaine pour le traitement d'infections d'origine bactérienne.

ABSTRACT

Ovalbumin-related protein X (OVAX) is an antibacterial protein which is homologous to ovalbumin

Ovalbumin is the major egg white protein with undefined function. Two homologous proteins have been identified in egg white: ovalbumin-related protein Y (OVAY) and ovalbumin-related protein X (OVAX), the function of which is still unknown. All three proteins have closely related protein sequences but they display specific features that might impact their biological functions. OVAX was purified from egg white using a combination of affinity and gel filtration chromatographies. We showed that OVAX is the main heparin-binding glycoprotein of egg white. We identified the presence of a specific domain, which is absent from ovalbumin protein, and that might explain the affinity of OVAX for heparin. Unlike ovalbumin, OVAX displays antibacterial activities against both *Salmonella enterica* Enteritidis and *Listeria monocytogenes*, two pathogens which are responsible for foodborne diseases. This activity possibly involves the heparin-binding domain. These properties can be of major interest for food and health industries (Patent WO 2011/151407) to reduce the growth of *Listeria* on food products such as cheeses or cooked meats and for the treatment of bacterial infections.

1. INTRODUCTION

L'ovalbumine est la protéine majeure du blanc d'œuf mais sa fonction dans l'œuf reste méconnue. Deux homologues de cette protéine (ovalbumine X et ovalbumine Y) ont été décrits et leurs fonctions n'ont encore jamais été explorées faute d'avoir des outils de purification permettant de les isoler de l'ovalbumine. La famille des gènes de l'ovalbumine se compose de trois gènes (ovalbumine, ovalbumine X et ovalbumine Y), localisés sur le chromosome 2 chez le poulet. Le fort degré d'identité de séquence des gènes de ces trois protéines suggère qu'ils sont issus de la duplication d'un gène ancestral commun (Heilig et al., 1980, Heilig et al., 1982). L'expression de ces gènes est sous dépendance hormonale mais leur expression dans l'oviducte est différente, l'ovalbumine étant 10 et 100 fois plus exprimée que l'OVAX et l'OVAY, respectivement (Colbert et al., 1980). L'ovalbumine de par sa structure tridimensionnelle et la présence d'un domaine consensus spécifique appartient à la famille des serpins (serine protease inhibitors) mais aucune activité inhibitrice de protéases n'a été rapportée à ce jour. Quant à l'OVAX et l'OVAY, des analyses de séquence suggèrent qu'elles pourraient être inhibitrices de protéases (Benarafa et Remold-O'Donnell, 2005).

Nous avons développé une stratégie de purification de l'OVAX à partir du blanc d'œuf en utilisant une succession de chromatographies : une chromatographie d'affinité à l'héparine, une chromatographie d'exclusion suivie d'une chromatographie d'affinité à la biotine. La structure tridimensionnelle de l'OVAX a été comparée à celle de l'ovalbumine et leurs activités antibactériennes ont été explorées. Ces travaux ont fait l'objet d'un brevet et d'un article (Rehault-Godbert et al., 2011, Rehault-Godbert et al., 2013).

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Purification de l'OVAX

L'OVAX a été purifiée à partir du blanc d'œufs de poule. Les œufs de poules (ISA Brown, Hendrix Genetics, Saint-Brieuc, France) fraîchement pondus ont été collectés, cassés, les blancs et les jaunes ont été indépendamment échantillonnés. Les blancs d'œufs ont été poolés et le pool a été dilué au 1/2 dans du Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,4 et homogénéisé. Le pool a ensuite été centrifugé à 14 000 rpm, à 4°C pendant 10 minutes afin d'éliminer les protéines visqueuses. Le surnageant a été conservé à -20°C. La purification de l'OVAX à partir du blanc d'œuf a été réalisée en trois étapes. La première étape de purification de l'OVAX est une chromatographie d'affinité de type Héparine-Sépharose : 30 mL de blancs d'œufs ainsi préparés ont été dilués au 1/2 dans du Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,4 et incubés sur la nuit à 4 °C avec des billes de sépharose couplées

à l'héparine (GE Healthcare, Uppsala, Suède). Les billes de sépharose ont été centrifugées (surnageant =non-fixé) puis lavées extensivement avec du Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 et les protéines affines ont été éluées avec du Tris-HCl 50 mM, NaCl 1 M, pH 7,4 (Fixé). Les fractions éluées ont été concentrées sur membrane de concentration (Millipore, Ireland, UFC800324) puis l'échantillon a été injecté sur une colonne Sephacryl S-100 High Resolution, Hi-prep 16/60 (GE Healthcare, Uppsala, Suède) pré-équilibrée dans du tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. Le pic majeur contenant l'OVAX a ensuite été passé sur une colonne d'affinité type biotine-sépharose pré-équilibrée dans du tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, afin d'éliminer toute trace d'avidine dans l'échantillon, l'OVAX étant recouvrée dans la fraction non fixée aux billes de biotine. Après purification, l'OVAX possède une masse apparente de 45-50 kDa en SDS-PAGE (résultats non présentés).

2.2 Détermination des sites de glycosylation de l'OVAX

L'OVAX (10 µg) a été déglycosylée par la PNGase F (*Elizabethkingia meningosepticum*) selon les instructions du fournisseur (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). L'OVAX native et l'OVAX déglycosylée ont été séparées par SDS-PAGE en conditions réduites, colorées au bleu de Coomassie, et digérées in-gel par la trypsine. Les peptides issus de la digestion des bandes ont été analysés par un système nanoUHPLC Ultimate 3000 RSLC (Dionex) couplé à un spectromètre de masse à haute résolution LTQ Velos Orbitrap ETD (Thermo Electron, US). L'acquisition des données se fait de façon automatique et les données obtenues ont été transformées à l'aide du logiciel Proteome discoverer 1.4 puis confrontées aux banques de données via le logiciel MASCOT Daemon (server local version 2.2.2).

2.3 Modélisation de la structure tridimensionnelle de l'OVAX

La modélisation de la structure tridimensionnelle de l'OVAX a été réalisée à l'aide de SWISS-MODEL (Bordoli et al., 2009) en utilisant la structure tridimensionnelle connue de l'ovalbumine (PDB ID code 1ova).

2.4 Tests antibactériens

Les activités antibactériennes de l'OVAX ont été évaluées vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* EGD (*L. monocytogenes*), *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076 (*S. Enteritidis*), *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*), et *Staphylococcus aureus* ATCC 29740 (*S. aureus*) tel que décrit précédemment (Herve-Grepinet et al., 2010). L'activité

antibactérienne de l'ovalbumine (0,5-2,2 mg/mL) et de l'OVAX (0,5-2,2 mg/mL) a été mesurée par le test de diffusion radiale selon la méthode décrite par Lehrer (Lehrer et al., 1991). L'effet de l'héparine (10-50-100-1000 µg/mL) sur l'activité de l'OVAX vis-à-vis de *S. Enteritidis* et *L. monocytogenes* a également été testé en utilisant 1,2 mg/mL et 0,2 mg/mL d'OVAX pour les deux souches, respectivement.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Caractérisation biochimique de l'OVAX

Le rendement de purification de l'OVAX par cette stratégie de purification a été estimé à environ 0,3 mg d'OVAX par mL de blanc d'œuf. L'OVAX purifiée se présente en SDS-PAGE sous la forme d'une bande hétérogène de 45 à 50 kDa, pure à 98% (d'après les estimations par densitométrie). La masse moyenne de l'OVAX purifiée est de 50968 Da d'après les analyses par spectrométrie de masse. Cette analyse a également permis de montrer que l'OVAX était fortement glycosylée (deux sites de glycosylation confirmés Asn-102 et Asn-220 sur les 5 prédits) comparativement à l'ovalbumine qui ne possède qu'un seul site de glycosylation (Ito et al., 2007). Cette glycosylation peut expliquer l'hétérogénéité de la bande observée en SDS-PAGE, à l'instar de l'ovomucoïde ou de l'ovoinhibiteur, deux protéines glycosylées du blanc d'œuf. Une autre caractéristique de l'OVAX est son affinité pour l'héparine, un glycosaminoglycane chargé négativement, sécrété par les mastocytes et retrouvé dans les tissus conjonctifs. Ainsi, l'OVAX et l'ovalbumine présentent des spécificités qui pourraient avoir un impact sur leurs activités biologiques, malgré la forte identité de leurs séquences protéiques (61%).

3.2. Caractéristiques structurales de l'OVAX

La structure tridimensionnelle de l'OVAX n'étant pas connue, nous avons conçu un modèle tridimensionnel de cette protéine en s'appuyant sur la structure 3D résolue de l'ovalbumine (Stein et al., 1991). La comparaison de la distribution des charges négatives (en rouge) et des charges positives (en bleu) de ce modèle de l'OVAX avec la structure tridimensionnelle de l'ovalbumine a révélé la présence d'un domaine regroupant de nombreuses charges positives à la surface de la molécule, à l'inverse de l'ovalbumine (Figure 1). Ce domaine très chargé en résidus lysine et arginine pourrait être impliqué dans l'interaction de l'OVAX avec des surfaces/composés chargés négativement tels que l'héparine, les cellules, le lipopolysaccharide bactérien ou l'ADN. Ce modèle devra être validé par la résolution de la structure tridimensionnelle de l'OVAX. Jusqu'alors, les tentatives de cristallisation réalisées dans le cadre du projet OVO-mining (ANR-

09-BLAN-0136-01) se sont avérées infructueuses en raison du fort degré de glycosylation de cette protéine. Les essais de déglycosylation de l'OVAX dans des conditions non dénaturantes, compatibles avec la cristallisation, ont également échoué. La résolution de la structure tridimensionnelle de l'OVAX est prévue à partir de la forme recombinante, exprimée chez *E. coli*, pour s'affranchir des glycosylations (projet MUSE financé par la Région Centre Val de Loire, 2014-2016).

3.3 Activité antibactérienne de l'OVAX

De nombreuses données de la littérature rapportent que certains peptides et protéines liant l'héparine possèdent des activités antimicrobiennes (Andersson et al., 2004, Malmsten et al., 2007, Malmstrom et al., 2009, Pasupuleti et al., 2009, Svensson et al., 2010, Kumar et al., 2014). En effet, le pouvoir antimicrobien de certaines protéines et peptides ferait intervenir différentes caractéristiques (cationicité, régions consensus), que l'on peut retrouver chez les molécules ayant une affinité pour l'héparine. Pour explorer l'hypothèse d'une activité antibactérienne de l'OVAX, nous l'avons testée contre 4 souches bactériennes pathogènes *Listeria monocytogenes* EGD (*L. monocytogenes*), *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076 (*S. Enteritidis*), *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*), et *Staphylococcus aureus* ATCC 29740 (*S. aureus*). Nous avons montré que l'OVAX possédait des propriétés antimicrobiennes contre *Listeria monocytogenes* et *Salmonella enterica* Enteritidis, deux pathogènes responsables de toxoinfections alimentaires, alors que l'ovalbumine ne présente aucune activité antibactérienne vis-à-vis des souches étudiées aux concentrations utilisées (Tableau 1). L'ajout d'héparine dans l'échantillon inhibe l'activité antibactérienne de l'OVAX vis-à-vis de *S. Enteritidis*, une souche Gram-négative. Ces résultats suggèrent que le domaine de liaison à l'héparine est important dans l'activité de l'OVAX vis-à-vis de ce pathogène. En effet, l'héparine en bloquant le site de liaison, interférerait avec l'activité anti-*Salmonella* de l'OVAX. L'absence d'effet de l'héparine sur l'activité de l'OVAX vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* sous-entend en revanche que le domaine de liaison à l'héparine ne serait pas nécessaire à l'activité de l'OVAX contre cette souche Gram-positif. Les mécanismes impliqués dans l'activité antibactérienne de l'OVAX (domaine de liaison à l'héparine, autres) ainsi que les effets de l'OVAX sur les souches bactériennes (effets bactéricides, effets bactériostatiques, cibles bactériennes) restent à explorer.

4. CONCLUSION

Nos résultats montrent pour la première fois que l'OVAX possède des activités antibactériennes et qu'elle pourrait contribuer à la défense de l'œuf

contre les pathogènes en protégeant l'embryon en développement et la qualité sanitaire des œufs de consommation. Dans le projet MUSE (Medicinal Use of Eggs, projet région Centre-Val de Loire 2014-00094512 ; 2014-2016), nous poursuivrons la caractérisation du potentiel anti-microbien de l'OVAX et/ou de ses dérivés peptidiques en criblant des souches bactériennes résistantes voire multirésistantes aux antibiotiques conventionnels. Nous explorerons également ses activités antivirales et antiparasitaires afin d'avoir une idée plus précise de son potentiel antimicrobien et de ses applications. Nous évaluerons également les nouvelles utilisations possibles de l'OVAX pour le traitement de maladies animales/humaines. En effet, au regard des nombreuses fonctions portées par les molécules liant l'héparine dans d'autres systèmes biologiques, elle pourrait présenter des activités très variées autres qu'antimicrobiennes telles que des propriétés immunomodulatrices ou anti-cancéreuses (Yeung et al., 2011). Le projet MUSE associe recherche fondamentale (caractérisation biochimique, structurale et fonctionnelle), recherche en innovations thérapeutiques (potentiel de molécules issues de l'œuf) et valorisation de molécules issues du vivant,

au service de la Santé Publique. Ce projet s'inscrit dans les objectifs du programme « Ambition Recherche & Développement 2020 » Biomédicaments, labellisé en 2014 par la région Centre-Val de Loire.

5. REMERCIEMENTS

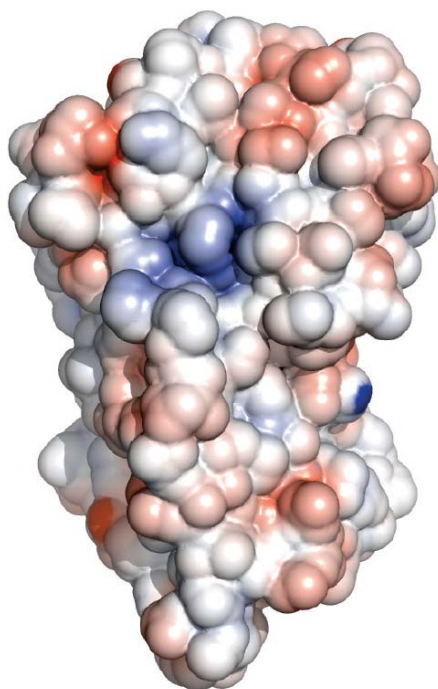
Les auteurs remercient Maryse Mills pour son assistance technique, le personnel de l'unité expérimentale de l'INRA de Nouzilly (UE-PEAT 609) pour la fourniture des œufs, Anne-Christine Lalmanach (INRA, Infectiologie et Santé Publique) pour son assistance concernant les tests antimicrobiens et Grégoire Harichaux pour sa participation à la caractérisation de l'OVAX (INRA - Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomolécules et de Phénomique des Animaux d'Intérêt Bio-agronomique). Ce travail a été financé par l'agence Nationale de la Recherche (OVO-Mining, ANR-09-BLAN-0136-01) et la commission européenne (RESCAPE, FOOD-CT-2006-036018).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Andersson, E. et al., 2004. Eur J Biochem (271), 1219-1226.
2. Benarafa, C. et E. Remold-O'Donnell, 2005. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (102), 11367-11372.
3. Bordoli, L. et al., 2009. Nat. Protoc. (4), 1-13.
4. Colbert, D. A. et al., 1980. Biochemistry (19), 5586-5592.
5. Heilig, R. et al., 1982. Nucleic Acids Res. (10), 4363-4382.
6. Heilig, R. et al., 1980. Cell (20), 625-637.
7. Herve-Grepinet, V. et al., 2010. Antimicrob. Agents Chemother. (54), 4401-4408.
8. Ito, K. et al., 2007. J. Biochem. (141), 193-199.
9. Kumar, S. et al., 2014. Int J Biol Macromol (64), 319-327.
10. Lehrer, R. I. et al., 1991. J. Immunol. Methods (137), 167-173.
11. Malmsten, M. et al., 2007. Growth Factors (25), 60-70.
12. Malmstrom, E. et al., 2009. PLoS Pathog (5), e1000698.
13. Pasupuleti, M. et al., 2009. BMC Res Notes (2), 136.
14. Rehault-Godbert, S. et al., 2013. J Biol Chem (288), 17285-17295.
15. Rehault-Godbert, S. et al., 2011. WO 2011/151407 A1.
16. Stein, P. E. et al., 1991. J. Mol. Biol. (221), 941-959.
17. Svensson, S. L. et al., 2010. J Biol Chem (285), 16105-16115.
18. Yeung, A. T. et al., 2011. Cell Mol Life Sci (68), 2161-2176.

Figure 1. Distribution des charges à la surface de l'ovalbumine (A., PDB 1OVA) et de l'OVAX (B., modèle tridimensionnel). Les charges négatives apparaissent en rouge et les charges positives en bleu.

A.



B.

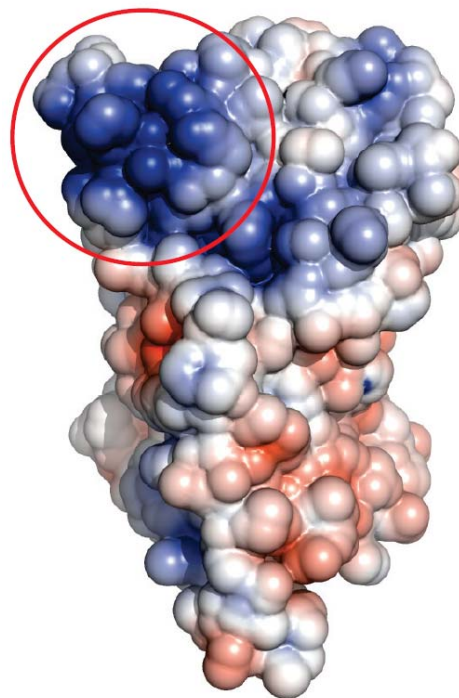


Tableau 1. Concentrations minimales actives (CMA) de l'OVAX et de l'ovalbumine purifiées.

Souches bactériennes	CMA (μM) $\pm$ std	
	Ovalbumine	OVAX
<i>L. monocytogenes</i> (Gram +)	> 28	1,90 $\pm$ 0,49
<i>S. aureus</i> ATCC 29740 (Gram +)	> 37	> 37
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076 (Gram -)	> 51	10,02 $\pm$ 1,36
<i>E.Coli</i> ATCC 25922 (Gram -)	> 37	> 37

CMA, Concentration minimale active (correspondant à 0,5 mm de diamètre d'inhibition)