HAL
open science

Caractérisation des antiprotéases du blanc d'oeuf de poule (Gallus gallus)

Maylis Frotier de La Messeliere

To cite this version:

Maylis Frotier de La Messeliere. Caractérisation des antiprotéases du blanc d'oeuf de poule (Gallus gallus). Sciences du Vivant [q-bio]. 2006. hal-02822663

HAL Id: hal-02822663

https://hal.inrae.fr/hal-02822663

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Institut National de Recherche Agronomique
Centre de Tours
37 380 NOUZILLY

Unité de Recherches Avicoles
Equipe Fonction et Régulation des Protéines de l'œuf
Responsable de stage : Dr. Sophie REHAULT

Caractérisation des antiprotéases du blanc d'œuf de poule (*Gallus gallus*)

Stage de première période
Juin 2006 – novembre 2006

Tutrice de césure : Sandra HELINCK

Maÿlis FROTIER DE LA MESSELIERE

Elève-ingénieur en césure 2006-2007
Institut National Agronomique de Paris-Grignon

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Yves NYS, animateur de l'équipe Fonction et Régulation des Protéines de l'Oeuf et directeur de l'Unité de Recherches Avicoles, pour m'avoir accueillie dans son équipe, ainsi que pour l'attention qu'il a portée à l'ensemble de ce stage.

Ma reconnaissance et mes remerciements vont tout particulièrement à Sophie REHAULT qui m'a formée durant ces six mois aux multiples aspects de la recherche, tant en réflexion scientifique qu'en manipulation et rédaction. Sa patience, sa disponibilité permanente et son investissement dans chaque étape de ce stage ont été essentiels pour le bon déroulement de cette expérience.

Je remercie également Joël GAUTRON pour les conseils, apports d'informations et encouragements qu'il m'a prodigués au long de ce stage.

Un grand merci à Maryse MILLS et Aurélien BRIONNE pour toutes les techniques auxquelles ils m'ont initiée avec beaucoup de patience, d'indulgence et de gentillesse. Leur sympathie et leur attention aux autres ont grandement contribué à mon intégration dans cette équipe.

Merci à Valérie LABAS et Maya BELGHAZI, du service de Spectrométrie de Masse et de Protéomique de l'INRA de Tours-Nouzilly, pour avoir assuré les analyses spectrométriques de notre étude malgré leur emploi du temps chargé ; ainsi qu'à Isabelle VIRLOGEUX-PAYANT et Philippe VELGE qui m'ont consacré si gentiment leur temps pour me former à la manipulation en microbiologie et lancer les expériences sur *Salmonella*.

Mes remerciements vont encore à Virginie HERVE-GREPINET, Natacha JOUSSET, Vincent JONCHERE et Patricia LOLIVIER pour leur soutien, ainsi qu'à l'ensemble de la S.R.A., et tout particulièrement le personnel du deuxième étage.

Une dernière pensée reconnaissante pour les membres de la chorale du centre qui m'ont accueillie si gentiment en cours d'année ; les répétitions du mardi midi étaient de vrais moments de plaisir !

Sommaire

Lexique - abbréviations .....
I. Introduction 2
I.1 Structure d'accueil 2
I.2 Thématique de Recherche de l'équipe « Fonction et Régulation des Protéines de l'Oeuf » 2
I.3 Projet de recherche : Caractérisation des antiprotéases du blanc d'oeuf 6
I.3.1. Les inhibiteurs de protéases (Moreau, 1999) 6
I.3.2. Les antiprotéases du blanc d'oeuf 7
a) Techniques de purification 7
b) Caractérisation biochimique 8
c) Caractérisation du potentiel antimicrobien des antiprotéases du blanc d'œuf 8
I.3.3 Projet de Recherche 9
II- Matériel et méthodes 11
II.1 Préparation des chromatographies d'affinité de type protéase-sépharose 11
II.1.1 Préparation du couplage 11
II.1.2 Couplage sépharose-protéases 12
II-2 Purification des inhibiteurs de protéase par chromatographie d'affinité 12
II.3 SDS-PAGE 14
II.4 Spectrométrie de masse 17
II.5 Tests des activités enzymatiques des fractions purifiées 18
II.6 RT-PCR 20
II.6.1 Extraction d'ARN totaux sur tissus de poule 22
a) Extraction d'ARN des tissus reproducteurs 24
b) Extraction d'ARN de foie 24
c) Concentration des ARN extraits 26
d) Contrôle qualité des ARN extraits 26
II.6.2 Transcription inverse 27
II.6.3 Amplification des fragments d'intérêt par réactions de polymérisation en chaîne 28
II.7 Tests d'inhibition de croissance bactérienne 30
II.7.1 Choix du témoin positif par antibiogramme 32
II.7.2 Tests de diffusion radiale 32
III. Résultats / Discussion 33
III.1. Purification et caractérisation des antiprotéases du blanc d'œuf 33
III.1.1 Isolation des antiprotéases du blanc d'œuf par chromatographie d'affinité de type protéase-sépharose 33
a) Stratégie 33
b) Résultats 33
III.1.2 Identification des protéases par spectrométrie de masse 35
III.1.3 Caractérisation de l'activité inhibitrice des fractions purifiées 40
III.2. Etude de l'expression transcriptionnelle des gènes de trois antiprotéases du blanc d'œuf dans l'oviducte de poule 44
III.2.1 Préparation des échantillons d'ADN complémentaires 44
III.2.2 Etude de l'expression de la cystatine 47
III.2.3 Etude de l'expression de l'ovomucoïde 47
III.2.4 Etude de l'expression de l'ovoinhibiteur 49
III.3. Caractérisation du potentiel antisalmonellique des antiprotéases du blanc d'œuf 49
III.3.2 Tests de diffusion radiale pour l'étude des activités antimicrobiennes des antiprotéases commerciales 51
Conclusion 53
Références bibliographiques 57
Annexes

Lexique - abbréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
Agent chaotropique : agent déstabilisant (détergents, urée, etc.)
APS : persulfate d'ammonium
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messager
BET : bromure d'éthidium
***bp* :** paires de bases
BSA : albumine sérique bovine
Coating : recouvrement des surfaces d'une plaque ELISA, par la BSA par exemple, pour limiter l'adsorption non spécifique des protéines d'un milieu réactionnel sur ces surfaces
DEAE : diéthylamino éthanol
DNase : enzyme désoxyribonucléase
dNTP : désoxynucléotide triphosphate
DTT : dithiothréitol
Eau RNase free : eau ultrapure
EDTA : éthylène-diamine-tétra-acétate
ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
Hepes : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazine-éthane-sulfonique
HPLC : chromatographie liquide haute performance
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
LB (*Lysogeny Broth*) : milieu nutritif mis au point par Salvador LURIA et Giuseppe BERTANI
MALDI : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*
***OD* :** unités de densité optique
pb : paires de bases
PCR (*Polymerase Chain Reaction*) : réaction de polymérisation en chaîne
pNA : groupement para-nitroanilide
***Random hexamers* :** amorces hexamériques désoxyribonucléotidiques aléatoires
RNase : enzyme ribonucléase
Rpm : rotation par minute
RT (*Reverse Transcription*) : transcription inverse
Q : quadripôle, analyseur de spectromètre de masse
SDS : sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
TA : température ambiante
TAE 1X : tampon Tris-acétate de sodium 40 mM, EDTA 1 mM
TBS 1X : *Tris-buffered Saline* Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,4
TEMED : N, N, N', N'-tétra-méthyl-éthylène-diamine
TIAC : toxi-infection alimentaire collective
TOF (*Time Of Flight*) : temps de vol des particules ionisées dans le spectromètre de masse
UA : unités d'absorbance
U.I. : unités internationales

Tableau I.1 : Composition moyenne de l'œuf de poule

Nutriments (/100g d'œuf sans coquille)	Blanc	Jaune	Œuf sans coquille
Proportions part comestible (/œuf entier)	60	30,7	90,7
Eau (g)	88,6	49	74,4
Calories (kcal)	47	364	154
Protéines (g)	**10,6**	**16,1**	**12,3**
Glucides (g)	**0,8**	**0,5**	**0,7**
Cendres (g)	0,5	1,6	0,9
Lipides (g)	**0,1**	**34,5**	**11,9**
Triglycérides (g)		22,9	7,7
Phospholipides (g)		10	3,4
Acides gras saturés (g)		13	4,4
Acides gras insaturés (g)		20,7	7
Cholestérol (g)	0	1,2	0,42
Lécithine (phosphatidylcholine) (g)		7,2	2,3
Céphaline (phosphatidyléthanolamine) (g)		1,4	0,46
Acides aminés indispensables (mg)			
Histidine			
Isoleucine	240	410	290
Leucine	560	870	660
Lysine	880	1390	1040
Méthionine + cystéine	660	1170	820
Phénylalanine + thyrosine	670	660	640
Thréonine	1020	1420	1150
Tryptophane	470	850	590
Valine	170	240	190
Minéraux (mg/100g de produit frais)	**500**	**1600**	**700**
Vitamines (µg/100g de produit frais)*			
D	0	4,5	1,5
Biotine B8	7	60	25
Vitamine B12	0,1	2,8	1
Acide pantothénique B5	250	4500	1700

(*Source* : Nys and Sauveur, 2004)

** : ne sont indiquées que les vitamines dont l'œuf couvre plus de 30% des apports nutritionnels conseillés pour un homme adulte de 70 kg*

I. Introduction

I.1 Structure d'accueil

Mon stage s'est déroulé au centre de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tours-Nouzilly (37). Créé en 1966, ce centre oriente ses recherches selon deux pôles thématiques : Santé animale et santé publique, Biologie animale et élevage. Cinq unités expérimentales conduisent les protocoles avec quatre unités de recherche (Infectiologie Animale et Santé Publique, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Recherches Avicoles, Immunologie parasitaire).
L'Unité de Recherches Avicoles (URA) est rattachée aux départements PHASE (Physiologie animale et systèmes d'élevage) et GA (Génétique Animale). Travaillant étroitement avec le Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français (SYSAAF) et l'Institut Technique de l'Aviculture (ITAVI), l'unité rassemble une centaine de personnes réparties dans les différentes équipes de recherche : Dynamiques nutritionnelles, Génétique Avicole, Croissance et Métabolisme, Fécondation et Sex-ratio, Fonction et régulation des protéines de l'œuf (FRPO).

J'ai été accueillie au sein de l'équipe FRPO, constituée de deux chercheurs, d'un ingénieur de recherche, de deux techniciens de recherche, d'un post-doctorant et d'un doctorant. Elle accueille en outre tous les ans un(e) apprenti(e) en IUT et des stagiaires de courte durée. Cette équipe est animée par Yves NYS qui est également le directeur de l'Unité de Recherches Avicoles.

I.2 Thématique de Recherche de l'équipe « Fonction et Régulation des Protéines de l'Oeuf »

L'œuf de poule, consommé tel quel ou sous forme d'ovoproduits, est considéré aujourd'hui comme une source protéique et lipidique à faible coût et de haute qualité nutritionnelle pour l'homme, de par sa composition adaptée en acides aminés essentiels (teneur élevée en lysine et résidus soufrés), en minéraux et vitamines (Tableau I.1). Ceci explique sa forte consommation dans nos pays développés, la moyenne européenne étant de 210 oeufs consommés annuellement par personne (Données source : Institut Technique de l'AVIculture).

Mais l'œuf de poule, utilisé à l'état cru dans certaines préparations culinaires, est également et malheureusement la première cause de toxi-infection alimentaire par les agents pathogènes *Salmonella enterica* sérotype Enteritidis (gastro-entérite) et, dans une moindre mesure, *Salmonella enterica* sérotype Typhimurium (thyphoïde) (Fig. I.1 et I.2).

Les bactéries se développent très rapidement dans le jaune d'œuf, milieu nutritif extrêmement favorable, après contamination intra-ovarienne *via* les tissus de la poule mère infectée (contamination verticale) ou pénétration depuis l'extérieur d'une coquille fragilisée (contamination horizontale). Les mesures sanitaires d'élevage tendent à minimiser la proportion de contaminations verticales mais le risque de contamination de l'œuf pondu reste très présent, notamment chez le particulier.

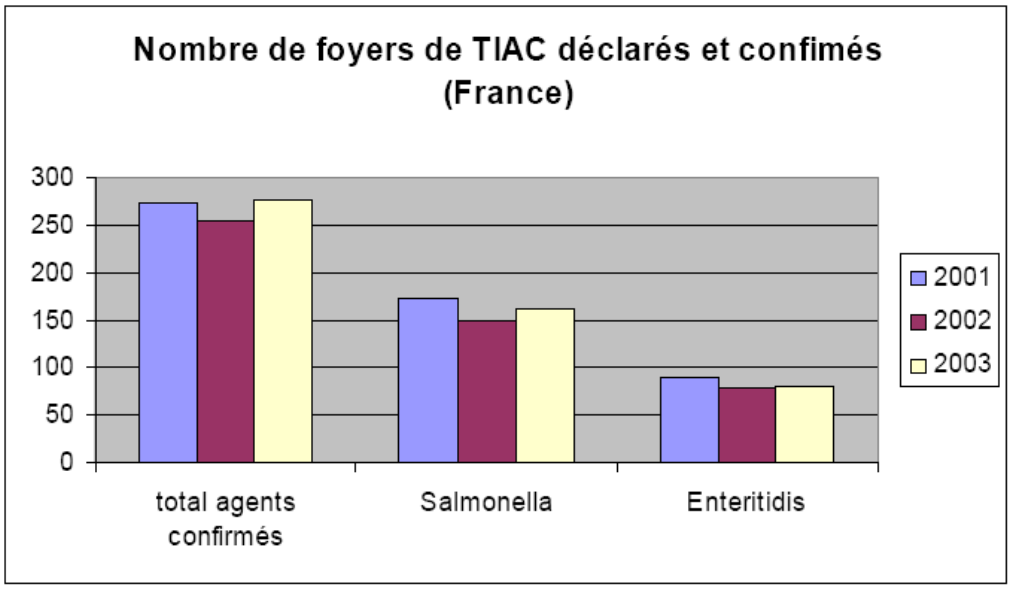


Figure I.1 : Implication de *Salmonella enterica* Enteritidis dans les foyers de toxi-infections alimentaires collectives déclarés en France de 2001 à 2003.

(*Source :* données InVS (Delmas et al., *2004*))

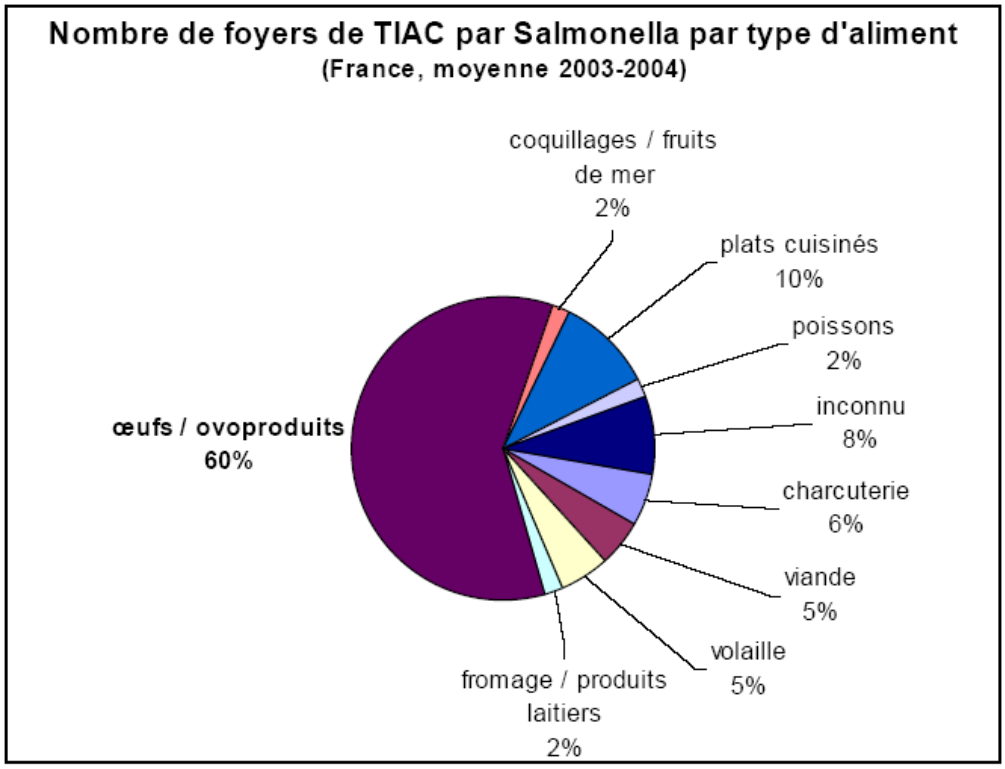


Figure I.2 : Part des œufs et ovoproduits dans le nombre de foyers de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) confirmés à *Salmonella*, en France, en 2003-2004

(*Source :* données InVS - http://www.invs.sante.fr/surveillance/tiac/donnees.htm)

Ce risque est d'autant plus préoccupant aujourd'hui que la directive 1999/74/CE relative à la protection des poules pondeuses, interdira, à partir de 2012, l'usage de cages d'élevage conventionnelles au profit de cages aménagées, volières, parcours libres et autres systèmes alternatifs, dans une optique de bien-être animal. De tels aménagements comporteront, entre autres éléments (bacs à poussière, perchoirs, etc.), une litière où s'accumuleront les déjections animales. Les contacts entre les animaux, leurs déjections et les œufs étant ainsi plus nombreux, on peut craindre une augmentation de la charge bactérienne des œufs de consommation, notamment par *Salmonella enterica* Enteritidis, d'où une recrudescence des toxi-infections alimentaires engendrées par cet agent pathogène.

L'essentiel des activités de recherche de l'équipe porte sur la caractérisation des acteurs des défenses de l'oeuf contre les pathogènes afin, à terme, d'**améliorer la qualité hygiénique intrinsèque de l'oeuf**. Ces défenses s'articulent en deux volets : premièrement, la coquille d'œuf qui, lorsqu'elle est intègre (dépourvue de micro-fêlures), constitue une barrière physique à la pénétration des pathogènes dans l'œuf ; la connaissance de son processus de formation, de ses facteurs de variation, l'identification des protéines spécifiques et la caractérisation de leur rôle dans les propriétés mécaniques de la coquille, sont donc essentielles pour envisager la sélection de poules pondeuses d'œufs à coquille solide limitant ainsi le risque de contamination horizontale. Par ailleurs, des protéines antibactériennes assurent une défense chimique de l'œuf contre les pathogènes ; principalement concentrées dans le blanc d'œuf, elles sont de plus en plus étudiées (Tableau I.2) et leurs propriétés ont déjà pu être exploitées dans l'industrie pharmaceutique (lysozyme, …).

Tableau I.2 : Protéines majeures du blanc d'œuf de poule (Thapon and Bourgeois, 1994)

	Part relative dans le blanc d'œuf (%)	**Fonction**
Ovalbumine	54	méconnue
Ovotransferrine	12	fixe le fer, antimicrobienne
Ovomucoïde	11	inhibiteur de protéases
Ovoglobulines	8	propriétés moussantes
Ovomucine	3,5	méconnue
Lysozyme	3,4	bactériolytique
Ovoinhibiteur	1,5	inhibiteur de protéases
Ovoglycoprotéine	1	inconnue
Flavoprotéine	0,8	fixe la riboflavine
Ovostatine	0,5	inhibiteur de protéases
Avidine	0,5	fixe la biotine, antibactérienne
Cystatine	0,05	inhibiteur de protéases

Bien que les protéines antimicrobiennes soient nombreuses, seule l'ovotransferrine est reconnue pour avoir une action antibactérienne vis-à-vis des Salmonelles, une bactérie à gram négatif, de par sa capacité à fixer le fer, un métal essentiel à la survie de ces pathogènes. Le lysozyme, quant à lui, aurait une action vis-à-vis des bactéries à gram positif (Baron *et al.*, 1997). Cependant, lorsque l'on analyse le blanc d'œuf dans son ensemble, l'activité antimicrobienne de ce dernier vis-à-vis des salmonelles ne peut pas s'expliquer par la seule présence de l'ovotransferrine. Ces résultats suggèrent qu'il existe dans le blanc d'œuf d'autres protéines connues ou inconnues qui ont une action anti-salmonellique (Baron *et al.*, 1997).

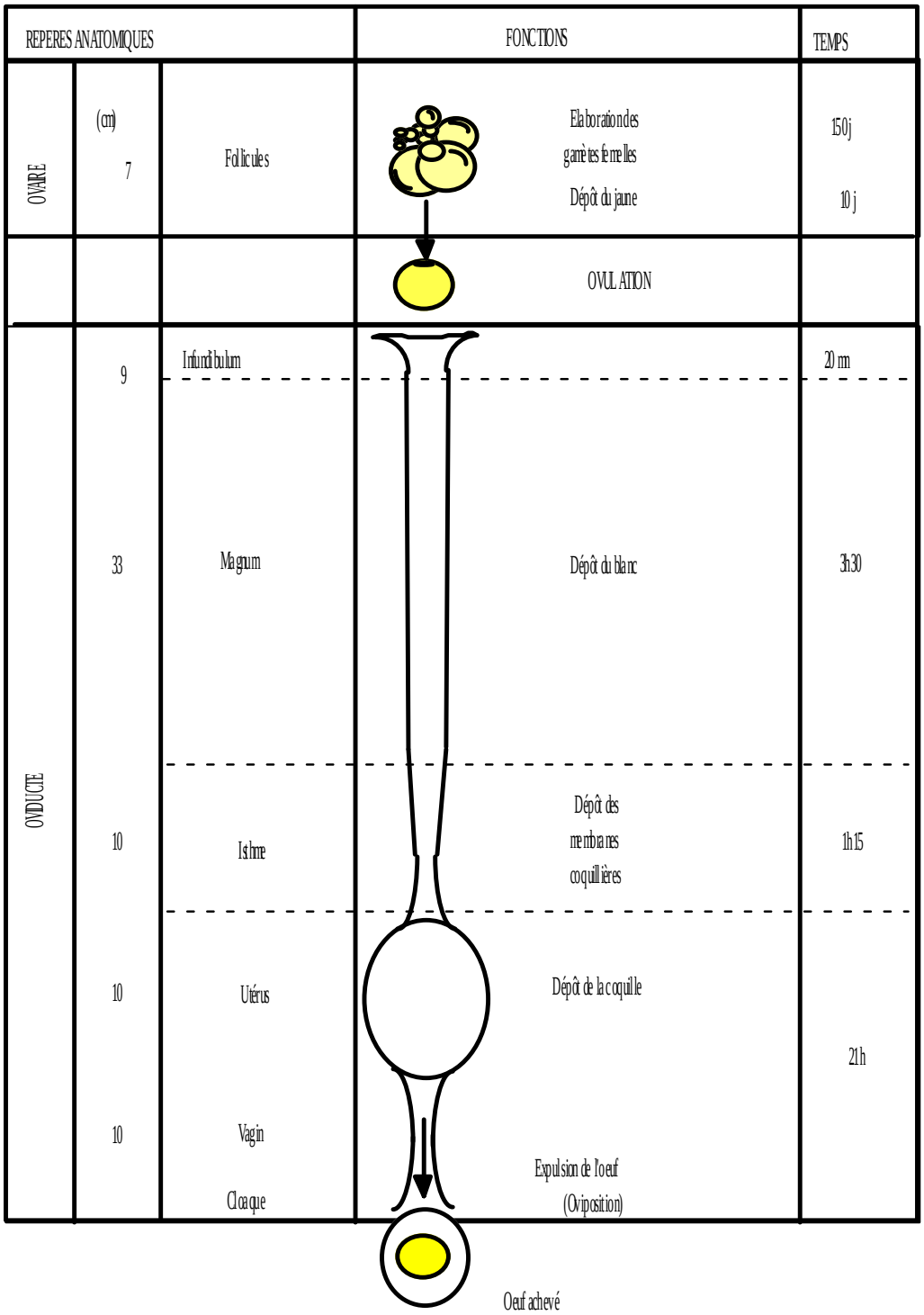


Figure I.3 : Cinétique et lieu de formation de l'œuf de poule (Sauveur, 1988; Gautron, 1994)

Deux approches complémentaires sont utilisées actuellement dans le laboratoire pour identifier de nouvelles protéines susceptibles de participer à la défense antimicrobienne. La première stratégie est l'approche protéomique, qui consiste à identifier des protéines à partir d'extraits protéiques issus des différents compartiments de l'œuf en utilisant la spectrométrie de masse et le séquençage amino-terminal. La deuxième est l'approche transcriptomique. Cette dernière s'appuie sur la spécificité d'expression de chaque segment de l'appareil reproducteur de la poule. Celui-ci est mis en place dès les premiers stades de l'embryogénèse et comporte deux parties : les ovaires (ou grappes ovariennes) et l'oviducte. Les ovaires sont initialement au nombre de deux mais seul se développe l'ovaire gauche ; il est le lieu de formation du jaune d'œuf et sécrète les hormones stéroïdiennes et les protéines contrôlant la maturation des follicules, l'ovulation et la formation de l'œuf ; cette dernière se déroule de manière séquentielle tout le long de l'oviducte de poule, chaque segment de l'oviducte sécrétant des protéines spécifiques de chaque compartiment de l'œuf (Fig. I.3). Sur les milliers d'oocytes présents dans l'ovaire de la mère à son éclosion, seuls 20 à 40 se développent en follicules primordiaux, pour aboutir à moins de dix follicules matures. Lors de l'ovulation, le jaune (portant le disque germinatif) est expulsé du follicule granuleux le plus gros de l'ovaire, et réceptionné par l'entonnoir de l'infundibulum. Fécondé ou non (par des spermatozoïdes déposés par le mâle et conservés dans les glandes spermatiques), le jaune poursuit son transit dans le magnum où durant 3h30, les protéines du blanc sont déposées autour du jaune et de ses membranes vitellines, et l'œuf subit une première phase d'hydratation. L'œuf passe alors dans un conduit plus étroit et progressivement vascularisé, l'isthme blanc puis l'isthme rouge, où sont déposées les membranes coquillières. La coquille se forme dans l'utérus par une biominéralisation progressive (phases initiale, de croissance, terminale) de 21 h tandis que l'hydratation du blanc s'achève. L'œuf est enfin expulsé par le vagin et le cloaque au terme d'une formation d'environ 24 h. En utilisant l'approche transcriptomique (puces à ADN), la comparaison du profil expressionnel d'un segment de l'oviducte avec un autre permet l'identification de protéines spécifiques de l'un ou l'autre des compartiments de l'œuf et sont autant de candidats antimicrobiens possibles. L'étude de la variabilité génétique et de la variabilité environnementale (en fonction de la durée et de la température de stockage, etc.) permettra à terme de proposer des schémas de sélection de poules dont les œufs présenteront des systèmes de défense renforcés.

I.3 Projet de recherche : Caractérisation des antiprotéases du blanc d'oeuf

Nous avons choisi de nous intéresser aux antiprotéases du blanc car, bien qu'elles aient été identifiées il y a de nombreuses années, leur rôle physiologique est encore inconnu et leur potentiel antimicrobien vis-à-vis des Salmonelles n'a, à notre connaissance, jamais été démontré.

I.3.1. Les inhibiteurs de protéases (Moreau, 1999)

Encore appelées antiprotéases, ces molécules sont de nature protéique, éventuellement sujettes à des modifications post-traductionnelles, et sont capables, de par leur séquence en acides aminés et leur conformation, d'inhiber l'activité d'enzymes protéolytiques (ou protéases) en bloquant leur site actif. Il en résulte la formation de complexes protéase-antiprotéase, réversibles ou non, par reconnaissance du site actif de la protéase et du site inhibiteur de l'antiprotéase, et grâce à d'autres régions spécifiques des deux protéines en interaction. L'équilibre entre les protéases et les antiprotéases est essentiel à la régulation de

la protéolyse, phénomène majeur de structuration, renouvellement, synthèse et régulation des processus biologiques au sein des organismes vivants.
A l'exception des macroglobulines, inhibiteurs universels des quatre classes de protéases, les antiprotéases sont spécifiques d'une classe donnée de protéases et mettent en jeu des mécanismes d'inhibition variés. On distingue par exemple :
- les inhibiteurs de protéases à sérine : les serpines (SERine Proteinase INhibitors), les inhibiteurs canoniques et l'hirudine font intervenir une boucle inhibitrice qui est clivée lors de son interaction avec la triade catalytique des protéases à sérine (généralement sérine, histidine, aspartate).
- les inhibiteurs de protéases à cystéine : les cystatines, les thyropines et les inhibiteurs de l'apoptose (IAPs) ont en commun trois régions peptidiques conservées qui bloquent l'accès des substrats au site actif de la protéase à cystéine, sans pour autant être clivées.
- les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMPs) forment des complexes réversibles, empêchant eux aussi l'accès de substrats au site actif des métalloprotéases.

I.3.2. Les antiprotéases du blanc d'oeuf

a) Techniques de purification

Après une première étape de purification d'antiprotéases (principalement l'ovomucoïde) par des précipitations en présence de trichloroacétate, d'acétone ou d'éthanol, avant dialyses et lyophilisations (Lineweaver and Murray, 1947; Fredericq and Deutsch, 1949), des gel-filtrations (passage sur colonne de Bio-Gel) et chromatographies sur colonnes échangeuses d'ions (matrice carboxyméthyl-cellulose, DEAE cellulose, …) ont été expérimentées (Rhodes *et al.*, 1960; Melamed, 1967; Davis *et al.*, 1969); DAVIS envisage même, en 1971, l'usage alterné de colonnes cationique et anionique, pour s'affranchir des contaminants de l'ovomucoïde récupéré par fractionnement (précipitation par sulfate d'ammonium ; Davis *et al.*, 1971).
En 1971, en s'appuyant sur les travaux d'AXEN (Axén *et al.*, 1967), FEINSTEIN purifie les protéases trypsine et chymotrypsine sur matrice associant la sépharose pré-activée par CNBr et des protéines insolubles inhibitrices de protéases, avant d'inverser le principe pour isoler l'ovoinhibiteur à partir d'une fraction d'ovomucoïde grossièrement purifié, par chromatographie d'affinité sur chymotrypsine-sépharose. Cette stratégie de couplage d'une protéase avec des billes de sépharose (ou d'agarose) est reprise par ANASTASI (Anastasi *et al.*, 1983) pour purifier la cystatine de poulet à partir de blanc d'œuf (élimination de l'ovomucine de blanc d'œuf par précipitation, chromatographie d'affinité sur carboxyméthylpapaïne-sépharose, et chromatofocalisation ou chromatographie liquide selon les perfectionnements de LINDAHL (Lindahl *et al.*, 1988)), ainsi que par KATO (Kato *et al.*, 1987) pour l'ovomucoïde. Enfin TURK (Turk *et al.*, 1983) a proposé une autre méthode de purification de la cystatine impliquant l'ajustement du pH de l'échantillon de blanc d'oeuf à 12 et un préchauffage à 62°C, avant une chromatographie sur une CM-sépharose (échangeuse de cations), suivie d'une phényl-sépharose (interactions hydrophobes) et d'une chromatographie MonoS (échangeuse de cations) pour la purification de la cystatine de caille (Gerhartz *et al.*, 1997).

b) Caractérisation biochimique

On connaît à ce jour quatre antiprotéases du blanc d'œuf, outre l'ovalbumine qui, bien qu'appartenant à la famille des serpines, ne présente aucune activité inhibitrice (Benarafa and Remold-O'Donnell, 2005). Il s'agit de l'ovostatine, l'ovoinhibiteur, l'ovomucoïde et la cystatine de poulet. La première est un inhibiteur de la classe des α_2-macroglobulines ; son haut poids moléculaire d'environ 660 kDa (Saxena and Tayyab, 1997) peut être un obstacle à sa caractérisation sur SDS-PAGE classique ; c'est pourquoi nous avons choisi de nous intéresser davantage aux trois autres antiprotéases du blanc d'œuf.
L'ovoinhibiteur est un inhibiteur spécifique de protéases à sérine, telles que la chymotrypsine, la trypsine, la subtilisine, l'élastase porcine, les protéases K et F. L'antiprotéase native a un poids moléculaire d'environ 49 kDa ; on l'a identifiée dans l'oviducte, le foie, la bourse de Fabricius (organe participant à la défense immunitaire) (Scott *et al.*, 1987; Moore *et al.*, 2004). Stimulées par l'insuline et la dexaméthanone, sa synthèse et sa sécrétion dans l'oviducte seraient sous le contrôle d'oestrogènes (Zhu *et al.*, 2001) et de la progestérone (Palmiter, 1972b) . Cette protéine comporte sept domaines inhibiteurs homologues de type Kazal impliqués dans le processus d'inhibition (Rhodes *et al.*, 1960).
L'ovomucoïde est également un inhibiteur de protéases à sérine ; la variabilité de ses modifications post-traductionnelles (cinq sites de glycosylation) ne permet pas de définir avec précision le poids moléculaire de la protéine native, celui-ci se situant entre 27 et 35 kDa (Lineweaver and Murray, 1947; Davis *et al.*, 1971). Cette antiprotéase peut inhiber la trypsine, la subtilisine, l'élastase et d'autres protéases similaires, grâce à ses trois domaines de type Kazal plus ou moins spécifiques d'une protéase à l'autre. Synthétisée dans l'oviducte, cette glycoprotéine voit son expression régulée par hormones stéroïdes (Palmiter, 1972b, 1972a; Compere *et al.*, 1981).
La cystatine est, quant à elle, un inhibiteur de protéases à cystéine (superfamille des cystatines ou famille 2) isolé pour la première fois du blanc d'œuf de poule par FOSSUM et WHITAKER (Fossum and Whitaker, 1968); de poids moléculaire d'environ 13-14 kDa, on la trouve sous deux formes isoélectriques majeures, en raison d'une phosphorylation différentielle (Laber *et al.*, 1989). Il a été démontré qu'elle inhibe la ficine, la papaïne (Fossum and Whitaker, 1968), la dipeptidyl peptidase, la chymopapaïne, l'actinidine (Bjork and Ylinenjarvi, 1990) et différentes cathepsines (Anastasi *et al.*, 1983). Présente dans le sérum, les poumons, le cerveau, le cœur et l'oviducte de poule, elle serait aussi exprimée dans les cellules musculaires et par l'embryon de poulet en cours de développement (Anastasi *et al.*, 1983; Colella *et al.*, 1989). Son taux de synthèse dans la formation du blanc d'œuf est lié au niveau de stéroïdes ovariens circulants (Colella *et al.*, 1989).

c) Caractérisation du potentiel antimicrobien des antiprotéases du blanc d'œuf

Le rôle physiologique de ces antiprotéases du blanc d'œuf est encore méconnu. On suppose qu'elles participent à la défense antibactérienne de l'œuf par inhibition des protéases bactériennes. Ces dernières sont en effet sécrétées lors de la pénétration des pathogènes, pour dégrader les protéines de l'œuf qui deviennent alors une source d'acides aminés ; en limitant la protéolyse, les antiprotéases contrecarrent la multiplication des microorganismes invasifs.

Le potentiel antimicrobien de l'ovoinhibiteur a déjà été observé vis-à-vis de protéases fongiaires d'*Aspergillus oryzae* (Feinstein and Gertler, 1973), de composés de la pronase de *Streptomyces griseus* (Haynes and Feeney, 1967) et de la protéase F provenant de la fibrinolysine bactérienne (Birk *et al.*, 1983) mais aucune preuve n'a pu être apportée sur l'effet de cette antiprotéase sur la croissance bactérienne en particulier vis-à-vis des

salmonelles. YOLKEN a pu montrer l'inhibition de la réplication du rotavirus de la gastro-entérite par l'ovoinhibiteur mais selon un mécanisme impliquant davantage ses oligosaccharides à acide sialique que ses propriétés antiprotéasiques (Yolken *et al.*, 1987).
En ce qui concerne l'ovomucoïde de poule, la capacité de ses domaines Kazal à inhiber des protéases microbiennes n'a pas été clairement démontrée, contrairement à l'ovomucoïde de dinde, dont le troisième domaine inhiberait la protéase B de *Streptomyces griseus* (Read *et al.*, 1983; Huang *et al.*, 1995), et l'ovomucoïde de pigeon, capable de se lier aux toxines 1 de type shiga de certains sérotypes entérotoxiques d'*Escherichia coli* (Miyake *et al.*, 2000). On sait que l'ovomucoïde de poulet peut se lier au virus de la maladie aviaire de new castle (Tsuge *et al.*, 1996) ainsi qu'à des virus d'oiseaux aquatiques(Matrosovich *et al.*, 1999), mais aucune inhibition de l'antiprotéase ne semble avoir été étudiée à ce jour sur la croissance de *Salmonella enterica* Enteritidis.
En tant qu'inhibiteur de protéases à cystéine, la cystatine de poulet inhiberait potentiellement les protéases impliquées dans les mécanismes de pénétration, de réplication et de parasitisme des bactéries, virus et protozoaires. Ceci a pu être démontré sur la croissance de *Streptococcus* (Bjorck, 1990), vis-à-vis de cellules infectées par le poliovirus (Korant *et al.*, 1985; Korant *et al.*, 1988), de souris porteuses du rotavirus humain (Ebina and Tsukada, 1991), ou encore sur le microorganisme pathogène *Porphyromonas gingivalis* (Blankenvoorde *et al.*, 1996; Blankenvoorde *et al.*, 1998). Agissant également sur la réponse immunitaire par la voie des cytokines, on envisage même d'utiliser cette antiprotéase comme agent thérapeutique pour améliorer la défense de l'hôte contre les agents infectieux ou parasitaires (Colella and Bird, 1993).

I.3.3 Projet de Recherche

Le projet de ce stage de six mois s'est articulé en trois points.
Dans un premier temps, nous avons cherché à identifier de nouvelles antiprotéases du blanc d'œuf. Une stratégie de purification par chromatographies d'affinité a été mise au point, selon le principe mis en œuvre par ANASTASI pour la cystatine (voir I.3.2 a) : des billes de sépharose ont été couplées à une protéase pour purifier des antiprotéases inhibitrices de la trypsine (dont l'ovomucoïde) ou de la chymotrypsine (dont l'ovoinhibiteur). Les constituants des fractions protéiques ainsi purifiées ont été ensuite analysés par spectrométrie de masse pour tenter de les identifier.
Dans un second temps, nous avons effectué une caractérisation fonctionnelle des antiprotéases isolées par chromatographie de type protéase-sépharose (estimation du poids moléculaire, tests cinétiques d'activité inhibitrice) et nous avons initié l'analyse des propriétés antimicrobiennes d'antiprotéases du blanc d'œuf de source commerciale (caractérisation du potentiel antisalmonellique).
Enfin, et parallèlement aux deux études précédentes, nous avons étudié l'expression des antiprotéases du blanc d'œuf dans l'oviducte et le foie de poule pondeuse.
Ce projet de recherche implique l'utilisation de la plupart des techniques classiques de biochimie des protéines utilisées en laboratoire (purification par chromatographie, analyse SDS-PAGE, tests cinétiques, spectrométrie de masse), de quelques techniques de biologie moléculaire (extraction d'ARN, RT-PCR, PCR en point final) ainsi qu'une initiation à des tests microbiologiques pour l'étude de molécules antibactériennes (tests de diffusion radiale).

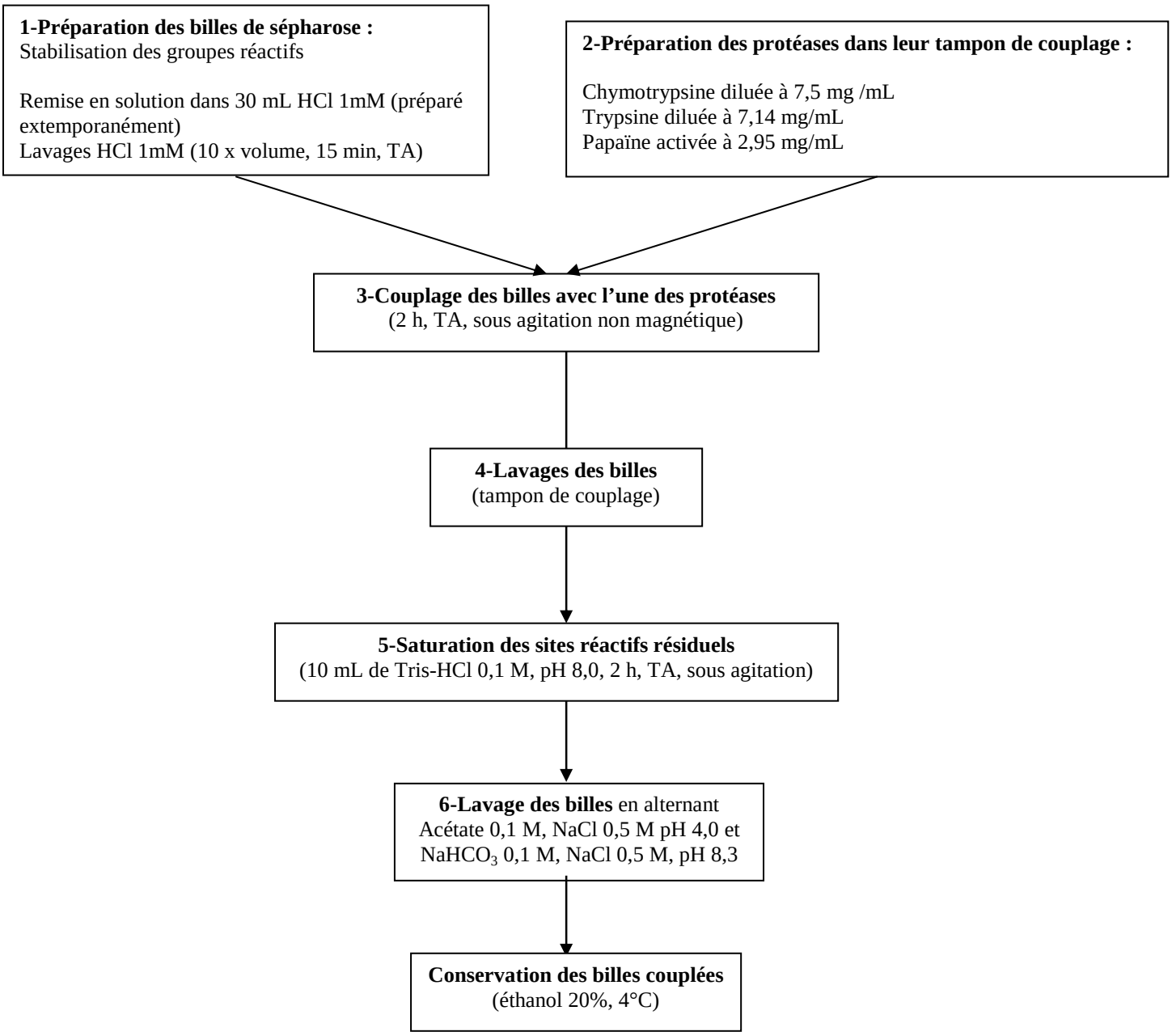


Figure II.1 : Préparation des colonnes de chromatographie d'affinité
TA, température ambiante

II- Matériel et méthodes

II.1 Préparation des chromatographies d'affinité de type protéase-sépharose

Cette opération est réalisée selon le protocole décrit par Amersham Pharmacia et complété par les données d'ANASTASI pour la purification de la cystatine de poulet (Anastasi *et al.*, 1983). Les étapes de couplage des protéases aux billes sont présentées dans la Figure II.1.

Principe :

On incube des billes de sépharose activées par du bromure de cyanogène (CNBr) avec la protéase, pour former une matrice de colonne de chromatographie retenant préférentiellement les protéines capables de se fixer sur l'enzyme. Des lavages permettent d'éliminer les molécules de protéases non fixées et une incubation avec du Tris-HCl de saturer les sites activés n'ayant pas réagi.

Matériel et réactifs :

- Matrice de sépharose lyophilisée pré-activée par du bromure de cyanogène (*Amersham Biosciences*)
-Chymotrypsine bovine (*Sigma Aldrich*)
-Trypsine bovine (*Sigma Aldrich*)
-Papaïne *papaya latex* (*Sigma*)

Mode opératoire :

II.1.1 Préparation du couplage

On prépare la matrice de la colonne à partir de billes de sépharose dont les groupes hydroxyles ont été activés par le bromure de cyanogène (CNBr), pour former des groupes réactifs (immidocarbonates) capables de réagir avec des groupements aminés (RNH_2), selon la réaction globale schématisée ci-dessous.

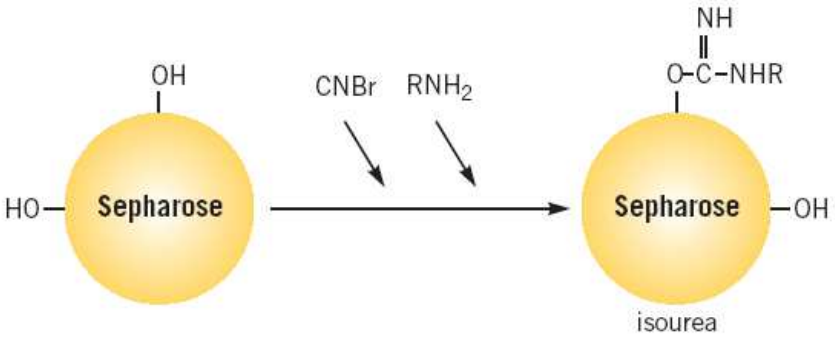


Figure II.2 : Activation par le bromure et cyanogène et couplage à la matrice activée (*Source* : Amersham Biosciences)

Sur les groupements imidocarbonates formés lors de l'activation, peuvent se fixer des ligands contenant des amines libres, comme par exemple des protéines par la chaîne latérale de leurs lysines.

Ces billes lyophilisées sont remises en solution et lavées comme indiqué Fig. II.1, étape 1. La solution d'acide chlorhydrique préserve les groupes réactifs à des hautes valeurs de pH.

Parallèlement, les solutions de protéases sont préparées à la concentration souhaitée.
- Chymotrypsine bovine préparée à 250 mg/mL dans du tampon Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4.
- Trypsine bovine préparée à 238 mg/mL dans du tampon Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4.
- Papaïne non activée. Cette protéase nécessite, préalablement au couplage, une activation dans un tampon contenant de la cystéine libre, suivie d'une stabilisation par carboxyméthylation de la cystéine présente dans le site actif de l'enzyme. L'enzyme est ainsi diluée à 7 mg/mL dans un tampon Phosphate de sodium 0,1 M, L-Cystéine 2 mM, EDTA 1 mM, pH 6, pendant 10 minutes, à température ambiante et sous agitation. La solution est ensuite incubée avec 50 µL d'acide iodoacétique 1 M pendant 1 heure. Cet acide (ICH_2COO^-) alkyle les groupements SH des cystéines en carboxyméthyl-cystéines ($Cys\text{-}CH_2\text{-}S\text{-}CH_2COO^-$) et empêche ainsi la formation de ponts disulfures, ce qui permet de conserver l'intégrité du site actif de l'enzyme qui peut alors interagir avec des antiprotéases.
La papaïne ainsi stabilisée est alors lavée extensivement par des dialyses successives (3,5 kDa, 1 h, 4 h, sur la nuit, à 4°C, sous agitation) dans du tampon $NaHCO_3$ 0,1 M, pH 8,3, NaCl 0,5 M, EDTA 1mM. Les protéines précipitées sont éliminées par centrifugation (14000 rpm, 10 min, 4°C) et le surnageant contenant le papaïne carboxyméthylée est utilisé pour le couplage sépharose-protéase.

II.1.2 Couplage sépharose-protéases

Pour cette étape présentée en Figure II.1, on notera que 10 mL de tampon de couplage supplémentaires sont ajoutés aux billes et à la solution de protéase activée.
Après incubation des billes de sépharose activée et des protéases, l'ensemble est lavé en 3 fois 6 mL de tampon $NaHCO_3$ 0,1 M, pH 8,3, NaCl 0,5 M afin d'éliminer les molécules de protéase qui ne seraient pas fixées sur la matrice de sépharose (Fig. II.1, étape 4). Les sites réactifs n'ayant pas fixé de protéase (ou sites hydroxyles libres de la sépharose) sont ensuite saturés par du Tris-HCl (Fig. II.1, étape 5). Les billes sont alors lavées extensivement en alternant un tampon à pH acide et un tampon à pH basique (Fig. II.1, étape 6) avant d'être conservées à 4°C dans de l'éthanol à 20 % (qui limite la croissance bactérienne).

II-2 Purification des inhibiteurs de protéase par chromatographie d'affinité

Principe :

Les antiprotéases du blanc d'œuf se fixent spécifiquement sur la colonne d'affinité tandis que les autres protéines sont éliminées dans le « non-fixé » et par des lavages successifs. Les protéines fixées sur la colonne sont éluées en tampon acide ou basique. Des mesures régulières de la concentration en protéines (DO 280 nm) permettent de vérifier l'absence de protéines dans la fraction de lavage précédant l'élution et la présence de celles-ci dans les fractions d'élution.

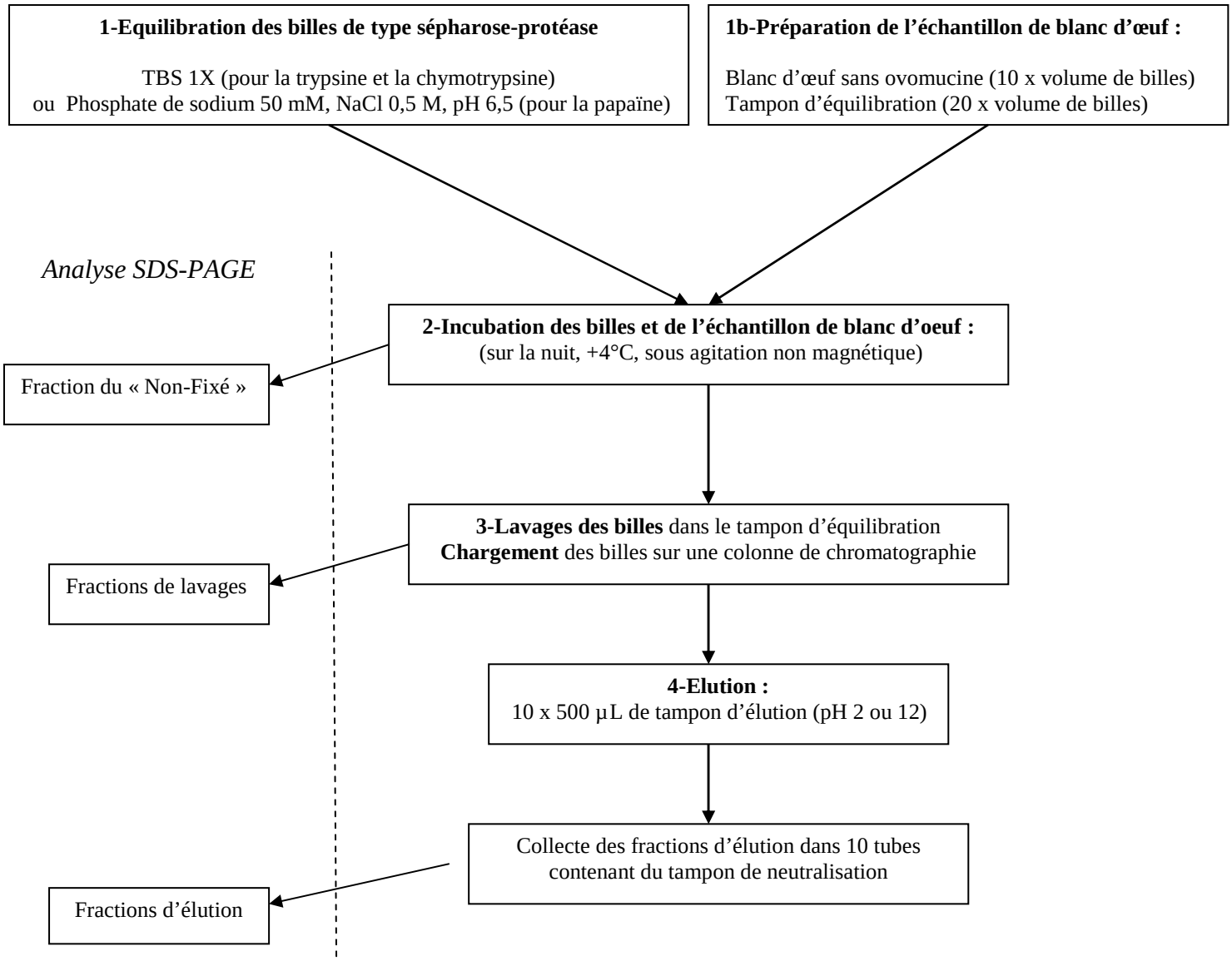


Figure II.3 : Purification des antiprotéases du blanc d'œuf par chromatographie d'affinité

Mode opératoire :

Une fois les billes lavées des excès de Tris, le volume souhaité de matrice couplée est équilibré dans du TBS 1X pour la trypsine- et la chymotrypsine-sépharose, dans du tampon Phosphate de sodium 50 mM, NaCl 50 mM, pH 6,5 pour la papaïne-sépharose(Fig. II.3, étape 1).
Les billes sont incubées dans leur tampon d'équilibration, en présence de blanc d'oeuf de poule de race ISA Brown, âgée de 35 semaines (Fig. II.3, étape 2). Cet échantillon de blanc, conservé à -20°C, avait été préalablement débarrassé des amas d'ovomucine, protéine très visqueuse et gênant les pipetages, par centrifugation (14 000 rpm, 10 min).

Les billes couplées sont ensuite lavées des protéines du blanc non fixées, jusqu'à ce que la fraction de surnageant récupérée à l'issue du dernier lavage ne comprenne plus de protéines résiduelles. Cette matrice couplée est alors chargée sur une colonne de polypropylène de 1 mL (*QIAGEN*) et l'on procède à l'élution des antiprotéases par 10 fois 500 µL d'un tampon de pH extrême : Glycine/HCl 100 mM, 0,5 M NaCl, pH 2,0 pour les inhibiteurs de la trypsine et de la chymotrypsine ; Phosphate de sodium 0,1 M, NaCl 1 M, pH 12 pour les inhibiteurs de la papaïne (Fig. II.3, étape 4). Les 10 fractions d'élution sont collectées dans des microtubes contenant du tampon de neutralisation du pH : 100 µL de tampon Tris 1 M, pH 8,0 pour les fractions trypsine- et chymotrypsine-sépharose ; 50 µL de tampon HCl 3 M pour les fractions papaïne-sépharose.

Tout le long de la purification, la concentration en protéines des fractions (« non-fixé », lavages, fractions d'élution) est évaluée par spectrophotométrie (*Nanodrop, ND-1000 spectrophotometer, Labtech*), en mesurant l'absorbance à 280 nm, caractéristique des noyaux aromatiques des acides aminés tels la Phénylalanine, le Tryptophane et la Tyrosine. Les fractions d'élution les plus significativement concentrées sont regroupées en un seul échantillon et dialysées dans du tampon TBS 0,2 X, à 4°C et sous agitation, dans des bains successifs d'une heure, quatre heures et sur la nuit. Le boudin de dialyse présente une limite d'exclusion de 3,5 kDa.
A l'issue de la dialyse, la fraction est débarrassée des protéines précipitées par centrifugation (14000 rpm, 10 min, 4°C). La concentration en protéines du surnageant est à nouveau évaluée par spectrophotométrie. Après une congélation dans l'azote liquide, la fraction est lyophilisée sur la nuit puis conservée à -20°C.

La régénération des billes se fait par lavages en tampon $NaHCO_3$ 0,1 M, pH 8,3, NaCl 0,5 M en alternance avec du tampon Acétate 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4,0. Après un dernier lavage à l'eau déminéralisée, les billes sont extraites de la colonne et conservées à 4°C dans un tube contenant de l'éthanol 20%, pour une réutilisation ultérieure.

II.3 SDS-PAGE

Principe :

Les constituants de la fraction purifiée sont séparés selon leur poids moléculaire par une migration sous l'influence d'un champ électrique. Cette migration dite électrophorétique se fait au travers d'un gel d'acrylamide, en présence d'un tampon contenant du Sodium Dodécyl Sulfate (SDS).

Le réseau de polyacrylamide est formé par polymérisation de monomères d'acrylamide et d'un agent pontant présent en faible quantité, le bisacrylamide. La polymérisation est réalisée par l'addition de persulfate d'ammonium et de TEMED formant des radicaux libres $SO_4^{-\cdot}$ à partir des ions persulfates, comme indiqué sur le schéma ci-dessous.

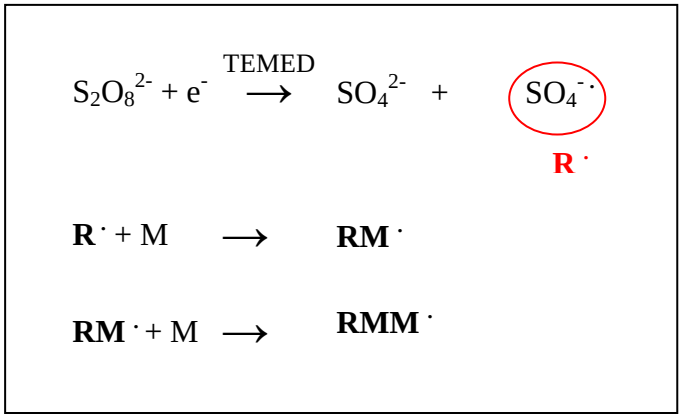


Figure II.4 : Schéma réactionnel de polymérisation d'un gel d'acrylamide-bisacrylamide
$R^\cdot$: radical libre $SO_4^{-\cdot}$
M : monomère d'acrylamide

Le SDS est quant à lui un détergent anionique ; partiellement dénaturant, il répartit une charge négative sur l'ensemble des protéines, suivant la proportion d'1 molécule pour 2 acides aminés ; chaque protéine acquiert une densité de charge identique et l'on s'affranchit ainsi de la charge propre à chaque protéine native qui pourrait perturber la migration des protéines vers l'anode. Par ailleurs, le SDS linéarise les protéines ; leur conformation n'entre donc plus en compte dans la migration, sauf si les protéines à analyser contiennent des ponts disulfures. Le SDS lisse donc les différences de charge et de conformation et permet une séparation des protéines essentiellement selon leur taille (leur poids moléculaire). Etant donné la résistance du réseau d'acrylamide aux protéines de haut poids moléculaire, la migration électrophorétique des protéines sera inversement proportionnelle au logarithme de leur masse moléculaire.

Le gel est séparé en deux parties, le gel dit de concentration et le gel de résolution. Le gel de concentration (isotachophorèse ou *stacking gel*), présente un réseau de polyacrylamide lâche (4 % d'acrylamide-bisacrylamide) et un pH 6,8 pour lequel les complexes protéines-SDS sont encadrés par les ions glycinates (tampon du réservoir) en arrière garde et les ions chlorures (dans le gel), ions pilotes ; ceci contribue à la concentration des protéines à l'interface entre les deux gels, avant leur séparation dans le gel de résolution aux mailles plus discriminantes et au pH plus élevé (qui modifie la mobilité des ions glycinates et chlorures) . La concentration en acrylamide-bisacrylamide de ce dernier gel est choisie en fonction du poids moléculaire des molécules à séparer et de la résolution souhaitée, un pourcentage en acrylamide-bisacrylamide élevé permettant la séparation de molécules de faible poids moléculaire. Au contraire, un pourcentage en acrylamide-bisacrylamide réduit facilite la migration de protéines de haut poids moléculaire.
La taille des bandes protéiques en fin de migration est évaluée au moyen d'un marqueur de taille composé d'un mélange de protéines aux poids moléculaires connus.

Matériel et réactifs :

Le matériel, les réactifs utilisés, et le mode opératoire suivi sont ceux fournis et préconisés par *Bio-Rad*. La solution commerciale de 30 % d'acrylamide-bisacrylamide présente un rapport de 37,5 :1, soit 37,5 g d'acrylamide et 1 g de bisacrylamide pour 100 mL d'eau déminéralisée. La solution commerciale de 10 % de SDS correspond à une concentration massique de 10 g pour 100 mL. L'ovoinhibiteur, l'ovomucoïde, la cystatine et la papaïne proviennent tous de chez *Sigma Aldrich* et le standard de poids moléculaire de chez *Bio-Rad* (*Precision Plus Protein Standards*)

Mode opératoire :

Pour l'analyse SDS-PAGE des fractions collectées lors des trois purifications, des gels de résolution à 12,5 % d'acrylamide-bisacrylamide et de concentration à 4 % d'acrylamide-bisacrylamide ont été préparés et coulés successivement. Les proportions pour un petit gel de 15 puits et d'épaisseur 1 mm sont indiquées dans le Tableau II.1. On notera que les deux constituants assurant la polymérisation, l'APS et le TEMED, sont ajoutés au dernier moment de la préparation.

Tableau II.1 : Composition d'un gel de 1 mm d'épaisseur à 12,5 % de polyacrylamide

Volumes en mL	**Gel de séparation 12,5%**		**Gel de concentration 4%**	
Eau déminéralisée		1,57		1,793
Tampon Tris-HCl	1,5 M, pH 8,8	1,25	0,5 M, pH 6,8	0,75
Acrylamide-bisacrylamide 30 %		2,08		0,4
SDS 10 %		0,05		0,03
Persulfate d'ammonium (APS) 10 %		0,05		0,025
TEMED		0,005		0,0025
Volume total		**5,005**		**3,0005**

Parallèlement, les échantillons que l'on souhaite déposer sur le gel ont été préparés dans le tampon adéquat. Les échantillons du « non-fixé » (NF), des lavages (L) et de l'élution (E) sont analysés en conditions réductrices ou non-réductrices (250 µL de Tris-HCl 0,5 M, pH 7,8 mélangés à 200 µL de glycérol, 400 µL de SDS 10 %, 50 µL de bleu de bromophénol, avec ou sans β-mercaptoéthanol). On remarquera que les fractions de lavages ne sont intéressantes que par la comparaison du dernier lavage (DO 280 nm ≈ 0) avec les fractions éluées (DO 280 nm > 0), qui reflète la spécificité de l'interaction existant entre les protéines éluées et les billes.
Les échantillons analysés en conditions réductrices (tampon de solubilisation incluant du β-mercaptoéthanol, qui rompt les ponts disulfures) auront été préalablement bouillis au bain-marie pendant 5 minutes.

Chaque échantillon ainsi préparé est déposé dans un puits à l'aide d'un cône effilé ; on dépose également en bordure de gel 5 µL du marqueur de taille précoloré.
Le gel chargé est ensuite placé dans un tampon de migration Tris-HCl 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1 %, pH 8,3. L'ensemble est mis sous champ électrique à une tension de 80 V,

pour une pénétration des protéines dans le gel de concentration, puis de 120 V pour la séparation dans le gel de résolution.
L'avancement de la migration est suivi grâce au front de Bleu de bromophénol compris dans les tampons de solubilisation.

A l'issue de la migration, le gel est placé dans une solution de bleu de Coomassie, pour colorer les bandes protéiques de différents poids moléculaires. On procède ensuite à la décoloration du maillage d'acrylamide par des bains successifs dans une solution d'éthanol 40 %, acide acétique 10 %, pour faire apparaître en contraste les bandes de protéines ayant fixé le colorant.

II.4 Spectrométrie de masse

Principe :

Les constituants des fractions concentrées des trois purifications, révélés par SDS-PAGE, sont découpés dans le gel après identification de leur poids moléculaire apparent, et analysés par spectrométrie de masse : une protéase, communément la trypsine, réalise l'hydrolyse des protéines contenues dans le gel en coupant préférentiellement en carboxy-terminal des résidus basiques des protéines (arginine, lysine). Les peptides générés sont analysés par chromatographie liquide (dessalage sur micro-précolonne et séparation sur colonne capillaire en phase reverse, équipement *nanoHPLC CapLC* de *Waters*) couplée à un spectromètre de masse tandem (deux fragmentations successives, équipement *Q-TOF Ultima* de *Micromass*) équipé d'une source d'ionisation en électrospray selon le principe de la Figure II.5.
La comparaison des fragments de protéolyse ainsi obtenus, avec une base de données, permet d'identifier, par leur rapport masse/charge, des protéines connues ou proches de séquences déjà analysées.

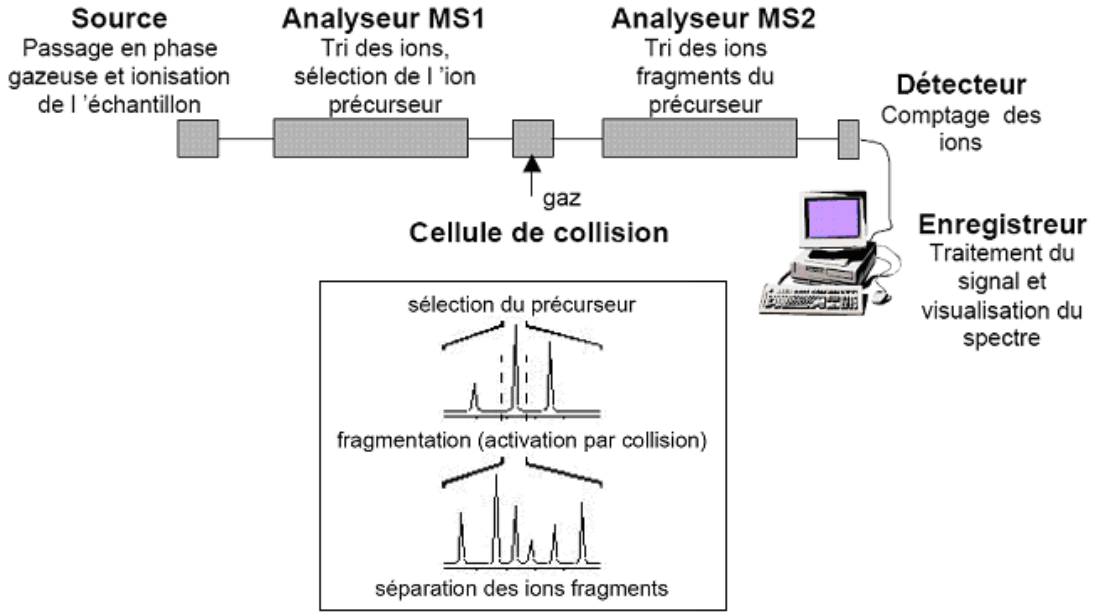


Figure II.5 : Schéma de principe de la spectrométrie de masse tandem (ou MS/MS)
(*Source* : JoëlleVINH - http://www.bio.espci.fr/spectro/Joelle/ch1_ms.pdf)

Mode opératoire :

On réalise une migration SDS-PAGE des trois fractions selon le protocole détaillé en II.3, en apportant une attention particulière aux manipulations afin de ne pas contaminer le gel par des protéines externes ou de la kératine. Après décoloration, les bandes protéiques sont découpées dans le gel au moyen d'un scalpel et placées dans des microtubes bien identifiés. Les bandes sont conservées séparément à -20°C et confiées à l'équipe gérant le service de Spectrométrie de Masse et de Protéomique, de l'INRA de Tours-Nouzilly.

II.5 Tests des activités enzymatiques des fractions purifiées

On utilise des substrats chromogéniques spécifiques de chaque protéase cible. Les substrats synthétiques utilisés comprennent un groupement chromogénique para-nitroanilide (pNA) situé en carboxy-terminal d'une séquence peptidique. La reconnaissance spécifique de ces acides aminés, notamment celui en position P1 (selon la nomenclature de Schechter et Berger (Schechter and Berger, 1967), voir Annexe 1) par la protéase, entraîne le clivage entre résidu amino-acide et groupement chromogénique (Fig. II.6) ; la para-nitroaniline libérée absorbe à 410 nm (coloration jaune). On peut suivre l'hydrolyse du substrat en continu par spectrophotométrie en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 410 nm en fonction du temps (lecteur de microplaques *Argus 300, Hewlett Packard*).

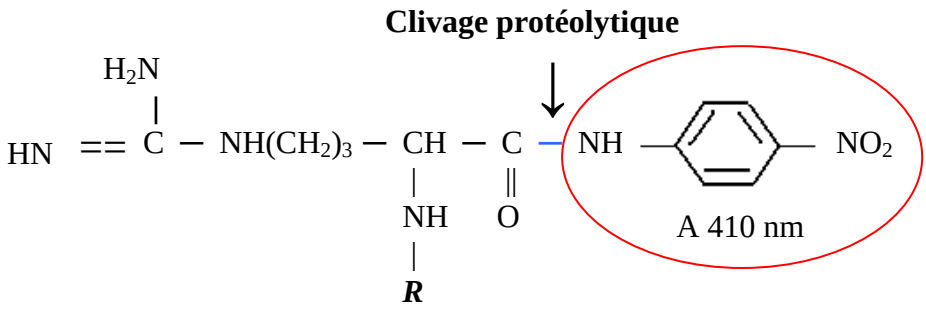


Figure II.6 : Structure générale d'un substrat chromogénique de type R-Arginine-pNA
R : séquence peptidique variant d'un substrat à l'autre

Matériel et réactifs :

- plaque de test Elisa, 96 puits (*Nunc, Apogent*) et film plastique adapté
- solution d'albumine sérique bovine ou BSA (*Sigma-Aldrich*) à 0,2 % de BSA, 0,02 % de NaN_3 filtrée (0,22 µm)
- protéases (*Sigma-Aldrich*): chymotrypsine bovine, trypsine bovine, papaïne
- antiprotéases (*Sigma-Aldrich*): ovoinhibiteur, ovomucoïde, cystatine
- échantillons : éluat concentré de la chymotrypsine-sépharose à 0,1 mg/mL, de la trypsine-sépharose à 0,1 mg/mL et de la papaïne-sepharose à 1,23 mg/mL
- substrats (*Sigma-Aldrich*, pour les notations d'acides aminés, voir Annexe 2): pour la chymotrypsine : N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide (Suc-AAPF-pNA) à 20 mM ; pour la trypsine : N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilide acétate (Tosyl-GPR-pNA) à 10 mM ; pour la papaïne : pGlu-Phe-Leu-p-nitroanilide (pEFL-pNA) à 10 mM

Tableau II.2 : Plan de plaque pour l'étude de l'activité inhibitrice de l'éluat de la chymotrypsine-sépharose

	1	2	3	4	5	6	7	
chymotrypsine		2 nM			2 nM	2 nM	2 nM	
inhibiteur commercial			10 nM		10 nM			
fraction				2 µg/mL		2 µg/mL	0,2 µg/mL	x 3
substrat Suc-AAPF-pNA	300 µM	300 µM	300 µM	300 µM	300 µM	300 µM	300 µM	
tampon Hepes	*qsp 200 µL totaux*	*qsp 200 µL totaux*	*qsp 200 µL totaux*	*qsp 200 µL totaux*	*qsp 200 µL totaux*	*qsp 200 µL totaux*	*qsp 200 µL totaux*	
témoins	*S*	*E + S*	$I_{commercial}$ *+ S*	*fraction* $_{Cmax}$ *+ S*	*I + E + S*	*fraction* $_{Cmax}$ *+ E + S*	*fraction* $_{Cmin}$ *+ E + S*	

Tableau II.3 : Plan de plaque pour l'étude de l'activité inhibitrice de l'éluat de la trypsine-sépharose

	1	2	3	4	5	6	7	
trypsine		1 nM			1 nM	1 nM	1 nM	
inhibiteur commercial			2,5 nM		2,5 nM			
fraction				0,1 µg/mL		0,1 µg/mL	0,01 µg/mL	x 3
substrat Tosyl-GPR-pNA	150 µM	150 µM	150 µM	150 µM	150 µM	150 µM	150 µM	
tampon Hepes	*qsp 200 µL totaux*	*qsp 200 µL totaux*	*qsp 200 µL totaux*	*qsp 200 µL totaux*	*qsp 200 µL totaux*	*qsp 200 µL totaux*	*qsp 200 µL totaux*	
témoins	*S*	*E + S*	$I_{commercial}$ *+ S*	*fraction* $_{Cmax}$ *+ S*	*I + E + S*	*fraction* $_{Cmax}$ *+ E + S*	*fraction* $_{Cmin}$ *+ E + S*	

Tableau II.4 : Plan de plaque pour l'étude de l'activité inhibitrice de l'éluat de la papaïne-sépharose

	1	2	3	4	5	6	7	
papaïne		50 nM			50 nM	50 nM	50 nM	
inhibiteur commercial			275 nM		275 nM			
fraction				32 µg/mL		32 µg/mL	12 µg/mL	x 3
substrat pGlu-FL-pNA	500 µM	500 µM	500 µM	500 µM	500 µM	500 µM	500 µM	
tampon Acetate	*qsp 200 µL totaux*	*qsp 200 µL totaux*	*qsp 200 µL totaux*	*qsp 200 µL totaux*	*qsp 200 µL totaux*	*qsp 200 µL totaux*	*qsp 200 µL totaux*	
témoins	*S*	*E + S*	$I_{commercial}$ *+ S*	*fraction* $_{Cmax}$ *+ S*	*I + E + S*	*fraction* $_{Cmax}$ *+ E + S*	*fraction* $_{Cmin}$ *+ E + S*	

Suc-AAPF-pNA : succinyl – Ala-Ala-Pro-Phe – p-nitroanilide (voir nomenclature des acides aminés naturels en Annexe 2)
Tosyl-GPR-pNA : tosyl - Gly-Pro-Arg – p-nitroanilide
pGlu-FL-pNA : pGlu-Phe-Leu-p-nitroanilide
tampon Hepes : Hepes 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,4
tampon Acetate : acétate100 mM, EDTA 1 mM, DTT 4mM
qsp 200 µL totaux : quantité suffisante de tampon pour un volume total de 200 µL
$I_{commercial}$ *: inhibiteur de source commerciale (ovoinhibiteur, ovomucoïde, cystatine)*
fraction $_{Cmax}$ *: fraction testée à une concentration ajustée pour atteindre l'inhibition totale de la protéase*
fraction $_{Cmin}$ *: fraction testée à une concentration ajustée pour atteindre une inhibition partielle de la protéase*

- tampons d'activation des protéases : pour la chymotrypsine et la trypsine, tampon Hepes 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,4 ; pour la papaïne : tampon Acétate 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 4 mM, pH 5,5

Mode opératoire :

Les plaques ELISA sont préalablement incubées avec de la BSA 0,2 %, sur une nuit à 4°C. A l'issue de l'incubation, la BSA est éliminée et la plaque est séchée à l'air libre, sous hotte. Ce « coating » permet de limiter l'adsorption des protéines à la surface des matériaux.

Les protéases et des inhibiteurs sont incubés avec le tampon d'activité spécifique des enzymes testées, pendant 1 heure, à 37°C. Les volumes et concentrations sont ajustés sur 200 µL totaux, de façon à respecter un ratio protéase/inhibiteur d'environ 10. Les expériences sont réalisées en triplicata (Tableaux II.2, II.3, II.4).

La protéase et l'inhibiteur (ou la fraction inhibitrice) sont pré-incubés 30 minutes à 37°C avant l'ajout du substrat pNA de chacune des trois enzymes. L'hydrolyse des substrats (l'apparition du groupement pNA) est suivie en continu pendant 20 minutes, à 37°C par le lecteur de microplaques et grâce au logiciel KC4. Cet appareil mesure l'absorbance des mélanges réactionnels à 410 nm, à la fréquence de 6 relevés par minute et par puits; le logiciel KC4 calcule la pente moyenne par régression linéaire, en mUA/min où UA correspond à des unités d'absorbance. Cette pente permet de calculer les pourcentages d'activité restante (et donc, par différence, les pourcentages d'inhibition) des fractions de purification par rapport au témoin « protéase + substrat » dont la pente est rapportée à 100 % d'activité.

II.6 RT-PCR

Principe général :

L'expression d'un tissu au niveau transcriptionnel peut être étudiée à travers les acides ribonucléiques messagers (ARNm) présents dans les cellules tissulaires à un stade physiologique donné. La démarche permettant de remonter à cette information à partir d'un échantillon de tissu repose sur les trois étapes suivantes :

1/ extraction des ARN totaux (ARN messagers, de transfert, ribosomaux, etc.) des cellules du tissu
2/ synthèse des acides désoxyribonucléiques complémentaires (ADNc) de ces ARN par transcription inverse (*Reverse transcription*, RT)
3/ amplification de la séquence recherchée sur les ADNc par réactions de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction*, PCR)

A chacun des deux stades 3h- et 18h-post-ovulation, des poules pondeuses de race ISA Brown ont été sacrifiées pour le prélèvement de cinq tissus : magnum, isthme blanc, isthme rouge, utérus et foie.
Par ailleurs, afin de limiter le biais apporté par un individu, l'étude de l'expression a été réalisée sur les tissus de deux poules différentes ; grâce à ce doublage des échantillons, la dégradation de l'ARN extrait d'un tissu donné à un stade donné ne remettait pas en cause la poursuite de la démarche (RT et PCR) pour l'échantillon analogue de l'autre poule.

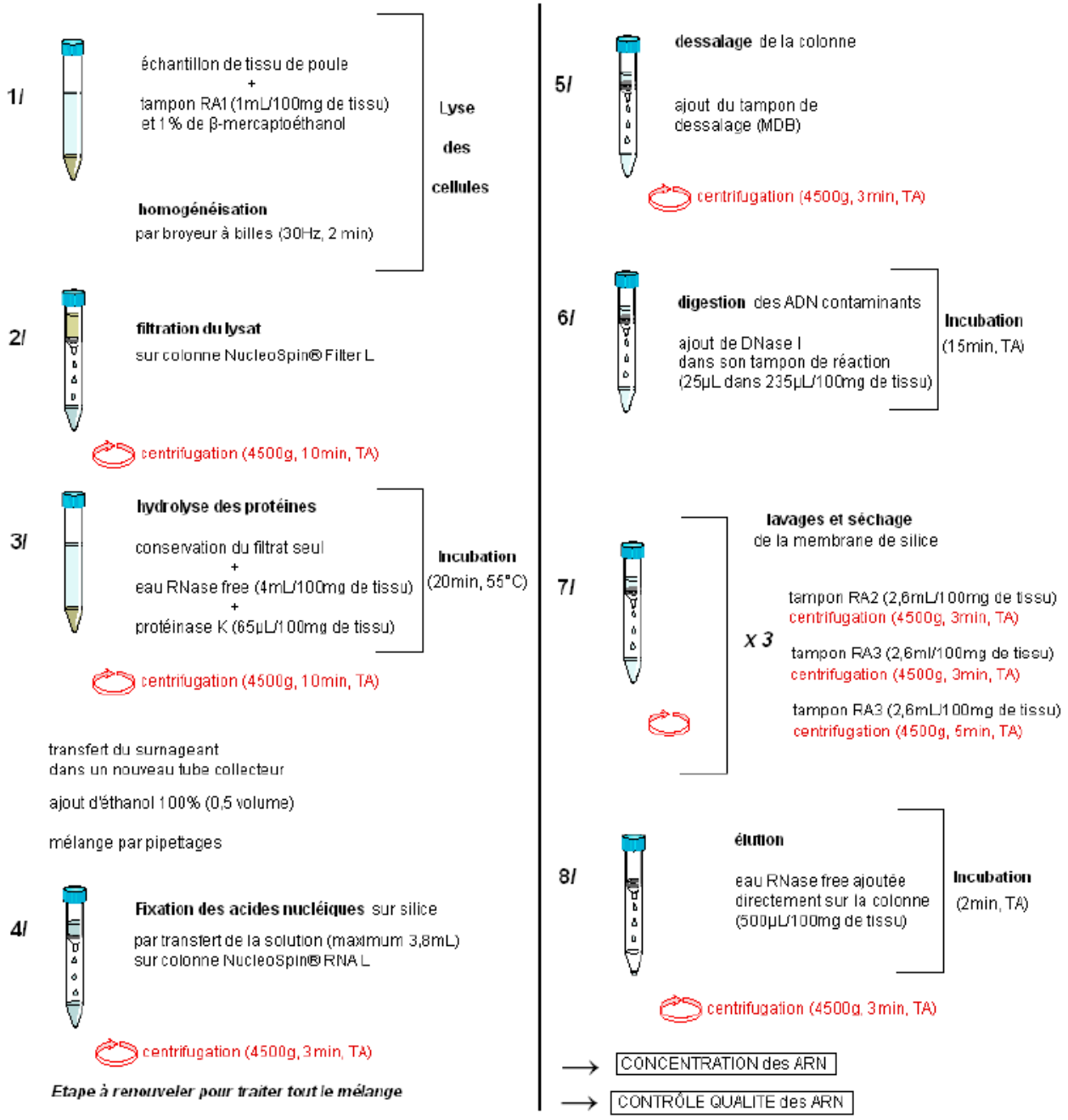


Figure II.7 : Extraction d'ARN par kit *NucleoSpin RNA-L* de *MACHEREY-NAGEL*
(*Source* : schéma inspiré des notices **NucleoSpin® RNA L procedure**)

TA, température ambiante
MDB, Membrane Desalting Buffer
RA1, RA2, RA3, tampons de réaction du kit

On précisera néanmoins que les poules impliquées n'étaient pas toujours les mêmes d'un tissu à l'autre, pour des raisons de qualité d'ARN déjà extraits.

II.6.1 Extraction d'ARN totaux sur tissus de poule

Principe :

On extrait, par broyage des cellules et précipitations différentielles des constituants cellulaires, les ARN totaux d'un tissu ; mais seuls les ARN messagers sont d'intérêt pour nous, puisqu'ils sont les « précurseurs » des protéines : leur présence, en plus ou moins grande quantité, dans un tissu, nous donne une idée de la nature et de l'abondance des protéines traduites.
Les étapes décrites ci-après ont été réalisées en veillant à limiter l'introduction d'enzymes dégradant les ARN (RNases) ainsi que la contamination des échantillons par de l'ARN et de l'ADN exogènes.

Les tissus traités par ces deux protocoles ont été pesés pendant le prélèvement et conservés en microtubes à -80°C. Le tableau ci-dessous indique les poids des tissus traités lors de la manipulation (les autres échantillons d'ARN avaient été extraits auparavant) ainsi que la méthode d'extraction d'ARN suivie.

Tableau II.5 : Tissus dont les ARN ont été extraits lors de la manipulation

Echantillons	Poids Tissus (g)	Méthode extraction
WI 4.2	0,113	Macherey-Nagel RNA L fibrous
RI 4.1	0,145	Macherey-Nagel RNA L fibrous
RI 6.1	0,126	Macherey-Nagel RNA L fibrous
RI 10.3	0,13	Macherey-Nagel RNA L fibrous
RI 11.2	0,11	Macherey-Nagel RNA L fibrous
L 4.2	0,229	RNA NOW
L 6.2	0,198	RNA NOW
L 10.2	0,151	RNA NOW
L 11.1	0,179	RNA NOW

Les deux premières lettres correspondent au tissu d'origine (WI pour isthme blanc, RI pour isthme rouge, L pour foie), le premier chiffre au numéro de poule pondeuse sur laquelle les prélèvements ont été réalisés, le deuxième chiffre indique de quel triplicata d'échantillon il s'agit.

La méthode *RNA Now* de *Biogentex* a été choisie pour son efficacité à permettre l'extraction des ARN des tissus particulièrement riches tels le foie.
Quelle que soit la méthode d'extraction suivie, le traitement s'applique à environ 100 mg de tissu ; pour des échantillons de masse supérieure, il a été répété autant de fois que nécessaire.

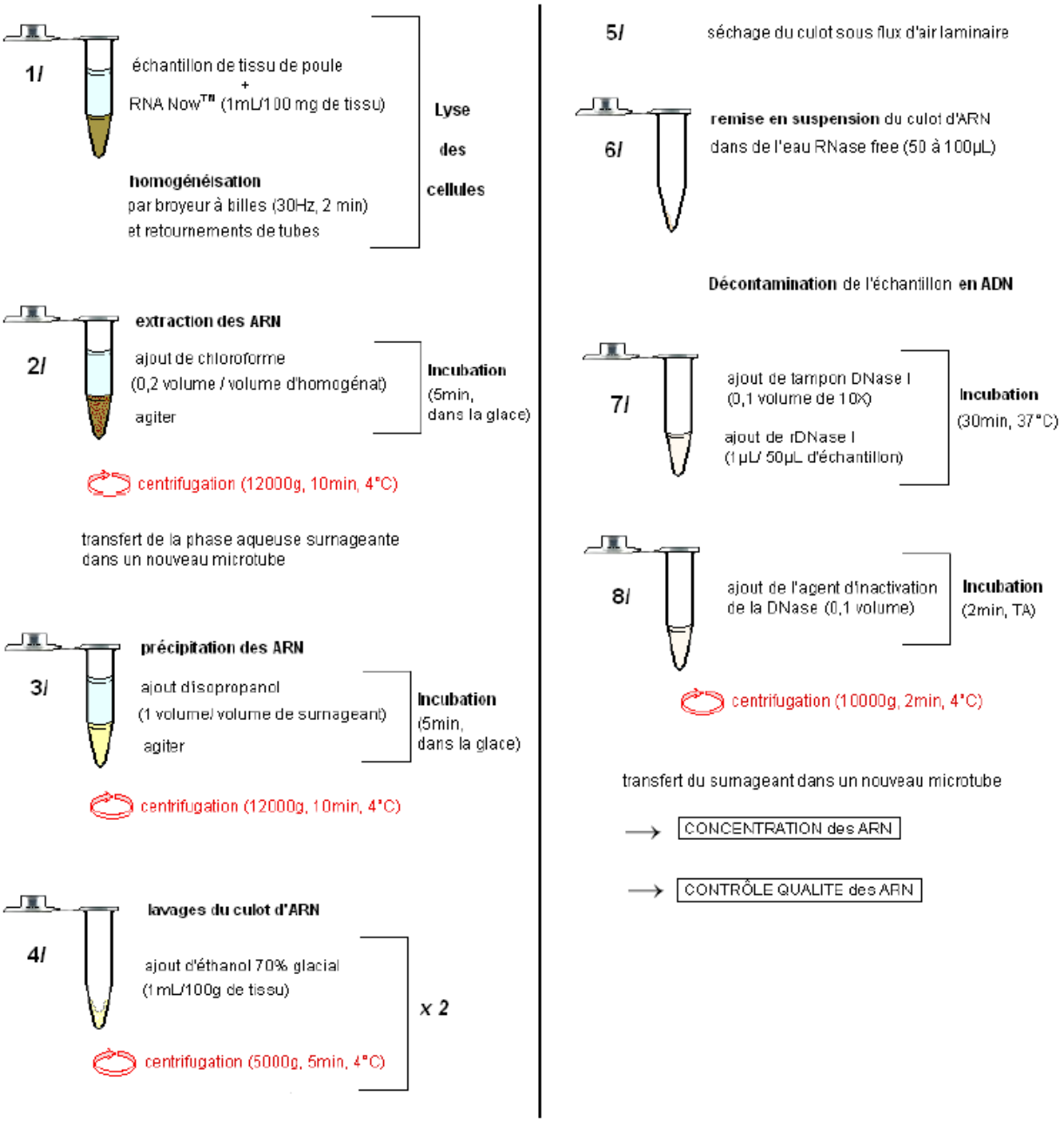


Figure II.8 : Extraction d'ARN de foie par la méthode *RNA Now™* de *Biogentex*

rDNase I, enzyme désoxyribonucléase recombinante I
TA, température ambiante

a) Extraction d'ARN des tissus reproducteurs

Matériel et réactifs :

Les réactifs, tubes collecteurs et colonnes utilisés sont issus d'un kit *NucleoSpin® RNA-L* de *MACHEREY-NAGEL*, adapté aux tissus fibreux en quantité abondante (jusqu'à 200 mg de tissu).
La protéinase K est fournie par *QIAGEN* à 20 mg/mL.

Mode opératoire :

Le protocole suivi est adapté des instructions de *MACHEREY-NAGEL* ; il est résumé sur le schéma ci-contre (Fig. II.7).

Après broyage et lyse cellulaire de l'échantillon de tissu, un traitement protéasique (Fig. II.7, étape 3) est ajouté au protocole prévu par le kit commercial, afin de faciliter l'extraction d'ARN par digestion des grosses protéines cellulaires.
L'ajout d'éthanol à l'échantillon lysé et filtré réduit la solubilité des ARN dans la solution et favorise leur fixation sur la matrice de silice de la colonne. La procédure *NucleoSpin* fait référence à de l'éthanol 70 % (ajouté à 1,8 ml/100 mg de tissu); nous avons choisi, pour notre part, de recourir, comme à chaque étape de précipitation des ARN, à de l'éthanol 100 % pour une efficacité accrue de la fixation. Les lavages, quant à eux, sont réalisés par de l'éthanol à 70 % pour un même souci de performance de l'étape.
Le tampon de dessalage MDB (*Membrane Desalting Buffer*), passé sur la colonne avant traitement DNase, permet de solubiliser les sels adsorbés à la membrane ou matrice de silice et de les évacuer dans l'éluat. Ces sels proviennent des tampons d'extraction utilisés précédemment ; ils ne favorisent pas l'activité de l'enzyme DNase et l'empêchent d'assurer une purification optimale de l'extrait en ADN.

b) Extraction d'ARN de foie

Matériel et réactifs :

Les solutions de chloroforme (99 % stabilisé par amylènes), isopropanol (propan-2-ol, 99 %) et éthanol glacial 100 % utilisées sont des solutions commerciales classiques de laboratoire (*Sigma*). L'éthanol à 70 % est préparé dans de l'eau ultrapure.
L'agent de lyse *RNA Now*™ est un produit *Biogentex*, fourni par *Ozyme*.
La DNase I recombinante, son tampon concentré 10 fois et l'agent d'inactivation de la DNase I sont issus d'un kit *DNA-free™* d'*Ambion* pour traitement DNase et élimination des réactifs.

Mode opératoire :

Le protocole préconisé par *Biogentex* est résumé ci-contre (Fig. II.8). Il est basé sur l'utilisation du produit *RNA Now™* et une méthode d'extraction en une étape, proposée par CHOMCZYNSKI et SACCHI (Chomczynski and Sacchi, 1987).

La lyse cellulaire des foies de poule pondeuse (Fig. II.8, étape 1) est réalisée, en même temps que le broyage tissulaire, par une solution commercialisée sous le nom de *RNA Now™* ; cet agent réactif contribue notamment à la réduction des protéines à leur structure primaire ; il associe des agents chaotropiques tels que :

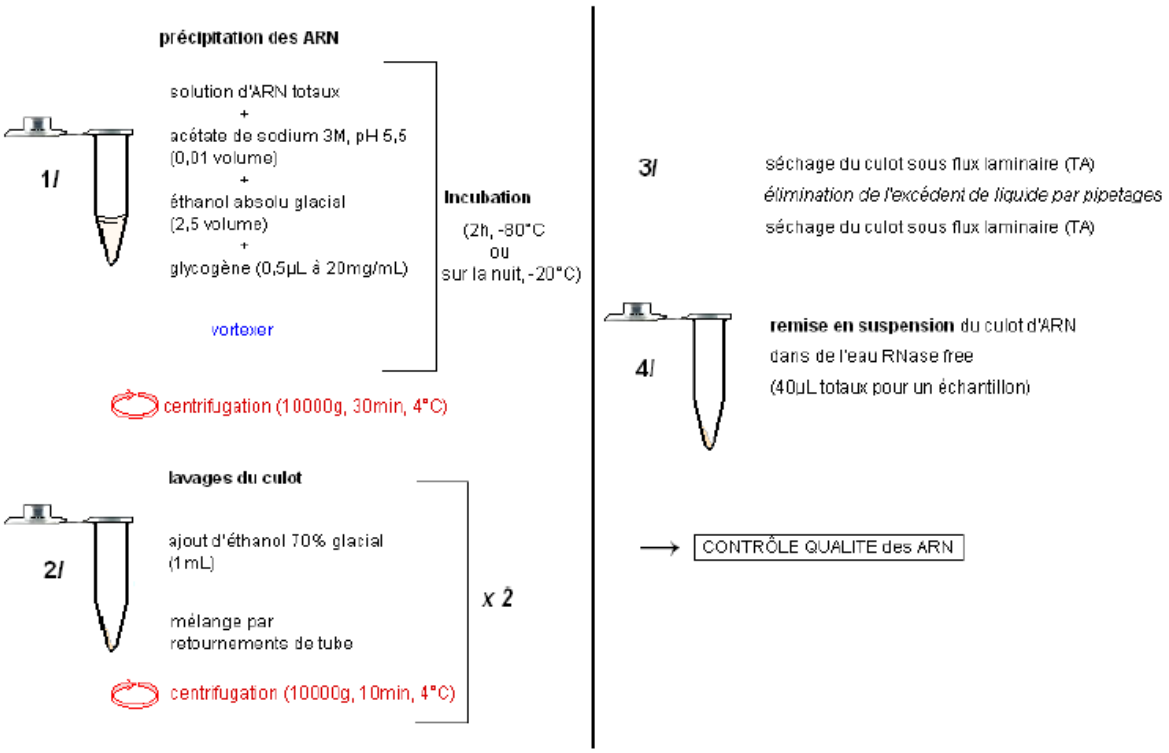


Figure II.9 : Concentration de solutions d'ARN par précipitation

TA, température ambiante
Ethanol absolu, éthanol 100 %

- un composé dérivé du guanidium, qui altère les structures secondaires et tertiaires des protéines et polysaccharides ;
- un solvant réactif (*DNA Now*) inactivant les RNases, améliorant la lyse des cellules et la solubilisation des tissus ;
- un détergent favorisant la dissociation des nucléoprotéines ;
- du phénol ultrapur stabilisé.

Après la lyse des tissus et homogénéisation de l'échantillon, les divers constituants cellulaires extraits sont séparés par différentes opérations de précipitations différentielles.
Après ajout de chloroforme, les ARN, présentant peu d'affinité pour la phase organique ainsi créée, se concentrent dans la phase aqueuse en surface et sont alors séparés des protéines, débris cellulaires, et autres contaminants constituant une phase organique rouge et dense ; les lipides abondants du foie se répartissent, quant à eux, dans une phase intermédiaire.
L'ajout d'isopropanol au surnageant d'ARN provoque l'effet inverse ; insolubles en présence de cet alcool, les ARN précipitent et sont récupérés dans le culot après centrifugation.
Le précipité d'ARN est lavé à deux reprises avec de l'éthanol à 70 %, puis séché à l'air libre sous hotte à flux d'air laminaire, à température ambiante, pour éliminer les dernières traces d'éthanol.
Avant d'utiliser l'extrait d'ARN pour une transcription inverse, il importe de le décontaminer de toute trace d'ADN qui compromettrait le bon déroulement des opérations suivantes. On a donc recours à la digestion des ADN par l'enzyme DNase I ; deux unités de cette enzyme, soit 1 µL de solution, permettent l'élimination de 2 µg d'ADN génomique à partir de 50 µL de suspension d'ARN (soit 10 µg d'ARN au maximum). Le réactif d'inactivation de la DNase I met fin à cette digestion et précipite l'enzyme inactive ainsi que des cofacteurs de catalyse d'ARN (calcium, magnésium) qui sont éliminés par centrifugation.

On obtient donc, à l'issue de ces extractions de tissus d'oviducte et de foie, des suspensions d'ARN vierges d'ADN. Tant qu'ils sont sous forme soluble, les ARN restent néanmoins très sensibles à la dégradation. Ils sont donc stockés à -80°C et sortis à température ambiante aussi peu que possible.

c) Concentration des ARN extraits

Après mesure des volumes et concentrations en acides nucléiques des suspensions (par spectrophotométrie à 260 nm au *Nanodrop*), il apparaît nécessaire de concentrer les extraits. On procède là encore par précipitation des ARN et lavages successifs du culot, avant remise en suspension dans un volume défini. La Figure II.9 détaille le protocole suivi et les réactifs utilisés.
A l'issue de cette concentration, les échantillons extraits sont tous sous un volume de 40 µL. Après mesure de leur concentration en acides nucléiques (*a priori* ARN uniquement), et avant de poursuivre la manipulation par la transcription inverse, on s'assure qu'il n'y a pas eu dégradation des ARN, par un contrôle qualité.

d) Contrôle qualité des ARN extraits

Principe :

En point final de l'extraction, on dépose les ARN sur un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium (BET) et on procède à la séparation des fragments selon leur taille, par migration électrophorétique horizontale et immergée. La migration est suivie grâce à des colorants

inclus dans les tampons de solubilisation des échantillons. Un marqueur de taille pour ADN permet également de suivre la migration de façon à atteindre une bonne résolution des bandes d'ARN. En fin de migration, les bandes d'ARN sont révélées par l'application d'un rayonnement ultraviolet sur le gel ; le BET activé émet alors une fluorescence au niveau des bandes d'ARN. Les ARN les plus abondants dans les cellules eucaryotes étudiées sont les ARN ribosomaux 18S et 28S ; une forte intensité de fluorescence et la netteté de ces bandes pour chaque puits d'échantillon témoignent d'une bonne qualité des ARN extraits.

Matériel et réactifs :

Echantillons d'ARN dilués à 100 ng/µL d'acides nucléiques
Poudre d'agarose pour biologie moléculaire d'*Invitrogen*
Bromure d'éthidium à 10 mg/mL de *Bio-Rad*
Tampon de gel et de migration Tris-acétate TAE 1X
Tampon de charge des échantillons (0,25 % de bleu de bromophénol, 0,25 % xylène cyanol FF, 30 % de glycérol)
Marqueur de taille *Ready Load 100 bp DNA Ladder* d'*Invitrogen*

Mode opératoire :

Un gel à 1 % d'agarose a été réalisé dans du tampon TAE 1X contenant du BET (0,1 mg/L final) et coulé dans le moule adapté pour un petit gel de 17 puits.
Après prise en masse, il est immergé dans du tampon TAE 1X et les puits sont chargés des échantillons préparés ainsi que de marqueurs de taille, placés de part et d'autre des échantillons (500 ng dans du tampon de charge). La migration est réalisée sous 100 V jusqu'à séparation distincte des deux fronts de colorants incorporés dans les échantillons.

A l'issue de la migration, le gel est placé sous rayonnement ultraviolet (en enceinte confinée) pour révéler les bandes d'ARN.

II.6.2 Transcription inverse

Principe :

Afin de remonter à l'information génomique contenue dans les ARN totaux extraits, on synthétise un brin d'ADN complémentaire de la séquence nucléotidique d'ARN, grâce à une ADN-polymérase, ARN-dépendante et exonucléase.
Cette enzyme effectue sa synthèse dans le sens 5' (Carbone portant le groupement phosphate) → 3' (Carbone portant un groupement OH), à partir d'une amorce de départ et en digérant les amorces intermédiaires par leur nucléotide extérieur ; les amorces *Random hexamers* (hexamères désoxyribonucléotidiques aléatoires) alors utilisées ne sont pas spécifiques d'une séquence donnée.

Mode opératoire :

Les échantillons sont préparés suivant le protocole *Invitrogen* d'utilisation de la *SuperScript II Reverse Transcriptase*.
10 µg d'ARN totaux de chaque échantillon ont été incubés à 65°C pendant 5 minutes avec des amorces aléatoires hexamèriques (*Promega*) à 21 ng/µL et des désoxyribonucléotides (*Sigma*) à 0,8 mM dans de l'eau ultrapure, de façon à dénaturer les doubles brins éventuels et garantir

l'absence de repliement des ARN en épingle à cheveu. Un échantillon témoin d'eau ultrapure est préparé de la même façon.
Après un rapide refroidissement dans la glace, l'enzyme *Superscript II Reverse transcriptase* (*Invitrogen*) est ajoutée au milieu réactionnel à hauteur de 400 U/échantillon, dans son tampon (*First Strand Buffer 5X* d'*Invitrogen*) de concentrations finales Tris-HCl 50 mM, KCl 75 mM, $MgCl_2$ 3 mM, pH 8,3, en présence de DTT à 10 mM finaux et d'un inhibiteur de ribonucléase (*RNase-OUT* d'*Invitrogen*) à 80 U/échantillon.
L'ensemble des microtubes est placé dans un thermocycleur pour une incubation à 25°C pendant 10 minutes, afin d'hybrider les amorces aux séquences ARN, puis à 42°C pendant 50 minutes, pour la synthèse d'ADNc. La synthèse est arrêtée par 15 minutes d'incubation à 70°C et les ADNc (sous un volume d'environ 40 µL) sont refroidis à 4°C avant stockage à -20°C.

II.6.3 Amplification des fragments d'intérêt par réactions de polymérisation en chaîne

Principe :

Les ADNc synthétisés représentent l'ensemble des gènes exprimés dans un tissu donné. Des réactions de polymérisation en chaîne vont permettre d'amplifier, dans ces brins d'ADN monocaténaire, un fragment spécifique du gène de l'antiprotéase recherchée et son complémentaire, pour peu qu'elle soit exprimée dans ce tissu.
On choisit ici de simplifier le suivi de l'amplification en ne la contrôlant qu'à l'issue de la PCR (PCR en point final ou *End Point PCR*). Cette amplification d'un fragment spécifique d'ADNc est réalisée par une enzyme ADN polymérase résistante à des températures élevées (Taq-polymérase), à partir d'amorces ADN d'une vingtaine de paires de bases, conçues spécifiquement pour encadrer la région de gène ciblée (cent à deux cent nucléotides).
Le choix des amorces étant fait minutieusement pour éviter toute reconnaissance d'une autre séquence génomique, on espère n'amplifier que la région cible d'ADNc. Deux couples d'amorces ont été choisis pour chaque antiprotéase.
De même que les températures imposées au cours du cycle de polymérisation, le milieu réactionnel de PCR est d'importance pour une activité optimale de l'enzyme ; il doit notamment comporter des ions Mg^{2+}, cofacteurs de la Taq-polymérase, qui peuvent être apportés séparément du tampon d'activation pour une concentration finale optimale.

Les « produits de PCR » sont ensuite séparés selon la taille des fragments, par migration électrophorétique. On peut conclure sur l'expression du gène cible au vu de la présence ou de l'absence d'une bande nucléotidique à la taille attendue. On notera toutefois que ce suivi de la PCR en point final, plutôt qu'en temps réel (suivi des réactions par spectrométrie et fluorescence), ne permet qu'une interprétation qualitative de l'expression d'un tissu mais ne permet pas de quantifier l'expression d'un tissu par rapport à un autre. .

Mode opératoire :

Les milieux réactionnels puis les échantillons ont été déposés dans les puits de plaques PCR (*AB-600 Thermi-Fast® 96, Non-skirted* d'*ABgene*) thermofilmées ou recouvertes de capsules individuelles regroupées par rangée de puits (*Cap Strips* d'*ABgene*). Les ADNc des 21 échantillons (1,5 µL de produit de transcription inverse soit 375 ng d'ARN théoriquement) ont été amplifiés par l'enzyme Taq-polymérase (*UptiTherm DNA Polymerase* d'*Interchim*) ajoutée à 2,5 U/échantillon.
La réaction est réalisée en présence d'oligonucléotides (dNTP, *Sigma*) à 0,2 mM finaux (pour chacune des quatre bases), dans un milieu recommandé par le fournisseur de l'enzyme

polymérase et composé, en concentrations finales, de Tris-HCl (pH 9,0) à 7,5 mM, $MgCl_2$ à 60 µM, KCl à 5 mM, $(NH_4)_2SO_4$ à 2 mM.
Les amorces sont fournies par *Eurogentec*, pour les antiprotéases, et *Invitrogen*, pour la séquence codant pour l'ARN 18S, diluées à 10 µM et incorporées au milieu réactionnel à 0,4 µM finaux. Leurs séquences et identifiants sont rappelés dans le Tableau II.3.

Tableau II.3 : Séquences nucléotidiques des amorces spécifiques et taille du produit de PCR attendu

Antiprotéase	Identification expérimentale	Séquence nucléotidique	Taille du produit de PCR (pb)
cystatine	Cyst-F1/B1	5'-AGATGAGAACGACGAGGGCTTG-3'	173
		5'-GGCAAGTTGTGCGACCAATCTC-3'	
	Cyst-F2/B2	5'-AGGTTGAGATTGGTCGCACAAC-3'	160
		5'-TGGCACTTGCTTTCCAGCAG-3'	
ovomucoïde	OvoM F1/B1	5'-CAGTAGGTTTCCCAACGCTACAGAC-3'	160
		5'-GTGCTCTTTGCTGATATTGGTTCC-3'	
	OvoM F2/B2	5'-GCCTACAGCATAGAATTTGGAACC-3'	172
		5'-AGGTGACTCCATCAGTACCACAGAC-3'	
ovoinhibiteur	OvoI F1/B1	5'-CGCCTACAACGCAGAACATCAC-3'	119
		5'-TCCTGCCATCCTTAGAGACTGTGG-3'	
	OvoI F2/B2	5'-CCAATGGTGTCAACCTATGCCAG-3'	142
		5'-GGAGAGACTTTCTGGAACTCACGG-3'	
18S	18S F1/B1	5'-CGCGTGCATTTATCAGACCA-3'	167
		5'-ACCCGTGGTCACCATGGTA-3'	

Les PCR ont été menées en thermocycleur selon les conditions suivantes : dénaturation initiale de 4 minutes à 94°C, suivie de 25 à 30 cycles de dénaturation (94°C, 30 secondes), hybridation des amorces (température d'hybridation spécifique de chaque couple d'amorce, 45 secondes, Tableau II.4) et élongation (72°C, 1 minute), avant de finir par une élongation terminale (72°C pendant 10 minutes) et refroidissement à 4°C.

Tableau II.4 : Températures et nombre de cycles optimaux des couples d'amorces spécifiques employés

Identification expérimentale	Température d'hybridation (°C)	Nombre de cycles
Cyst-F1/B1	58	30
Cyst-F2/B2	55	30
OvoM F1/B1	55	25
OvoM F2/B2	55	30
OvoI F1/B1	55	25
OvoI F2/B2	55	25
18S F1/B1	58	30

Les températures d'hybridation sont calculées en fonction du pourcentage de bases Guanidine-Cyanidine dans la séquence ADN des amorces. Pour certaines amorces amplifiant

abondamment en conditions standard, le nombre de cycles de PCR a été réduit pour limiter la saturation des signaux lors de la révélation des gels.
Parallèlement, un contrôle qualité des produits de transcription inverse utilisés pour les PCR a été réalisé par amplification du gène d'ARN 18S, présent chez tous les eucaryotes et exprimé de manière ubiquitaire. Les conditions de PCR ont été celles exposées ci-dessus (Tableau II.4), avec une température d'hybridation de 58°C, sur 30 cycles de polymérisation.

Les produits de PCR sont analysés sur un gel d'agarose à 1,4 % comme décrit précédemment (voir II.6.1.d).

II.7 Tests d'inhibition de croissance bactérienne

Les tests d'évaluation du potentiel antibactérien de nos fractions d'antiprotéases ont été initiés suivant le principe des tests de diffusion radiale.

Principe :

On teste l'effet inhibiteur d'une substance sur la prolifération de bactéries en milieu solide, par diffusion radiale à partir de disques imbibés du composé à tester.

Un milieu nutritif d'agar est coulé dans une boîte de Pétri puis ensemencé par inondation avec la souche bactérienne étudiée. Des disques de papier buvard imprégnés de quantités connues des substances à tester sont ensuite déposés à la surface du milieu. Les substances diffusent aussitôt dans le milieu puis, durant l'incubation, la compétition éventuelle entre la croissance bactérienne et la diffusion radiale de la substance crée un gradient de concentrations décroissantes. Après incubation, des zones circulaires d'inhibition de la prolifération bactérienne apparaissent autour des disques, contrastant avec le tapis bactérien couvrant le reste de la surface. La taille de ces zones est proportionnelle à la sensibilité de la bactérie : en effet, la culture s'arrête lorsqu'elle rencontre dans le milieu une concentration égale à la concentration minimale inhibitrice (CMI) (Bosgiraud and AEMIP, 2003). C'est pourquoi on peut caractériser l'effet des substances sur la population bactérienne en mesurant le diamètre de ces zones d'inhibition.

Un antibiotique de zone d'inhibition approprié est choisi comme témoin positif ; le tampon de dilution des substances protéiques fait office de témoin négatif.

Matériel et réactifs :

Souche de *Salmonella enterica* Enteritidis LA 5 en phase stationnaire (soit après une nuit de culture à 37°C)
Milieu agar LB, NaCl 170 mM
Milieu agar LB, NaCl 50 mM
Disques de papier buvard stériles non imprégnés d'1 cm de diamètre (*Fluka*, *BioChemika*), de 6 mm de diamètre (*bioMérieux*)
Disques d'antibiotiques (*Bio-Rad*) de 6 mm de diamètre : rifampicine (30 µg/disque), ampicilline (10 µg), streptomycine (500 µg), tétracycline (30 U.I.), chloramphénicol 30 µg), spectinomycine (100 µg)

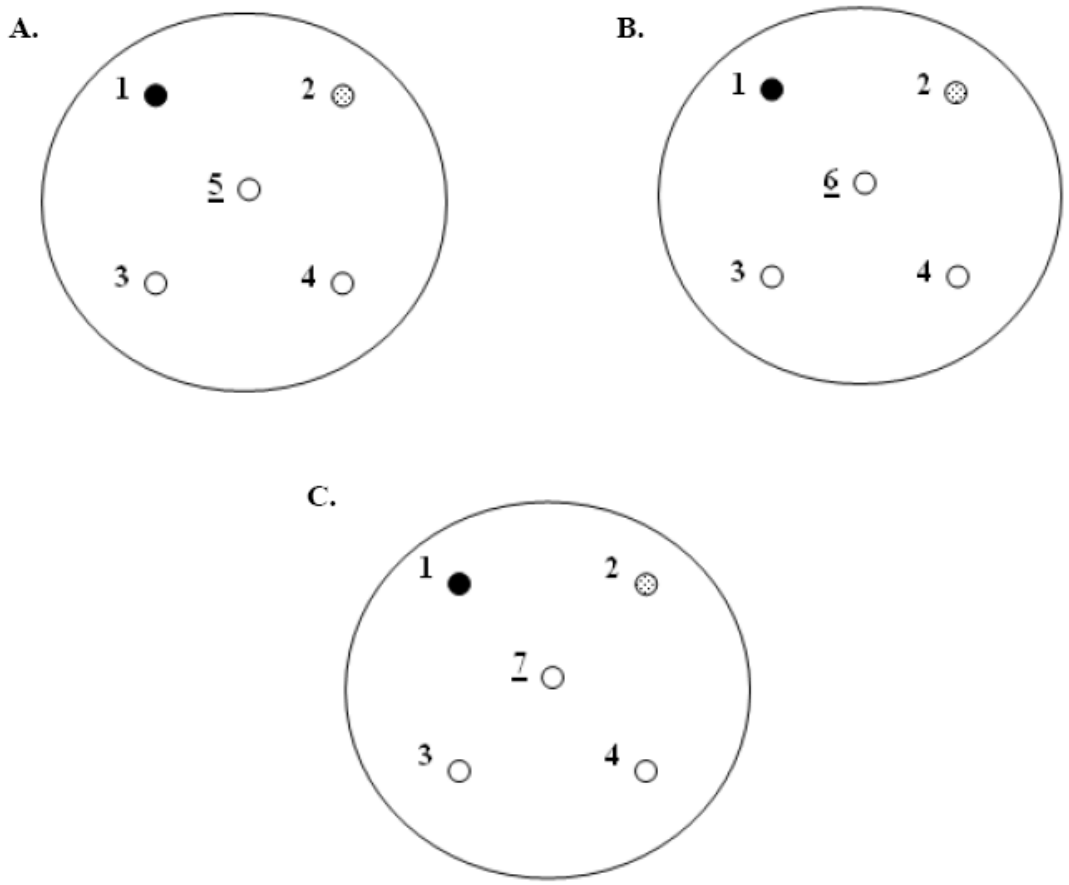


Figure II.10 : Tests de diffusion radiale pour l'étude des activités antibactériennes des antiprotéases commerciales sur *S.* Enteritidis

Plan d'expérience suivi sur deux milieux : LB agar NaCl 170 mM et LB agar NaCl 50 mM.

A. : test de l'ovoinhibiteur ; **B.** : test de l'ovomucoïde ; **C.** : test de la cystatine.

1, TBS 1X, témoin négatif (20 à 40 µL) ; 2, antibiotique, témoin positif (rifampicine, 30 µg) ; 3 et 4, lysozyme (40 µL à 100 µM) et ovotransferrine (40 µL à 100 µM), contrôles d'inhibition de prolifération ; 5, ovoinhibiteur commercial (40 µL à 100 µM) ; 6, ovomucoïde commercial (40 µL à 100 µM) ; 7, cystatine commerciale (40 µL à 100 µM).

Lysozyme (*Sigma*)
Ovotransferrine (Conalbumine) (*Sigma*)
Ovoinhibiteur, ovomucoïde, cystatine (*Sigma*)
TBS 1X stérilisé par autoclave

II.7.1 Choix du témoin positif par antibiogramme

Des boîtes de milieu agar LB à 170 mM et 50 mM de NaCl ont été préparées puis inondées par un bouillon de culture de *S.* Enteritidis LA 5 à une concentration estimée à 4,74 x 10^7 bactéries/mL.

La concentration de bactéries est estimée sur 1 mL de brouillon initial dilué au dixième, par spectrophotométrie à 600 nm de longueur d'onde, une unité de densité optique correspondant à environ 2 x 10^9 bactéries/mL.
Après séchage sous flux d'air stérile, des disques de différents antibiotiques sont disposés sur la boîte par un distributeur stérile. Une incubation de 18 heures à 37°C permet la diffusion des antibiotiques et la visualisation de zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques. On procède à la lecture de l'antibiogramme en mesurant avec une règle graduée le diamètre maximum de la zone d'inhibition (en mm).
On choisit l'antibiotique pour lequel le diamètre de la zone d'inhibition est le plus compatible avec le nombre de substances que l'on souhaite tester sur une même boîte.

II.7.2 Tests de diffusion radiale

20 mL de milieu ont été coulés à l'avance en autant de boîtes de Pétri que prévu dans le plan d'expérience (Fig. II.10).
Les disques de substances à tester sont préparés un jour avant dépôt : placés dans une boîte de Pétri vide par type de substance, ils sont imbibés de 20 µL (disques de 6 mm de diamètre) à 40 µL (disques d'1 cm de diamètre) de solution protéique préparée à 100 µM dans du TBS 1X stérile. Une fois secs, on les rassemble pour chaque substance dans un flacon conservé à 4°C.

Les milieux agar LB sont ensemencés par inondation avec un brouillon bactérien de concentration connue (estimée par spectrométrie à 600 nm) puis les disques de substances sont disposés un à un sur le milieu (Fig. II.10), avec un témoin positif (Antibiotique), un témoin négatif (TBS 1X) et deux contrôles à action antibactérienne connue. Comme en II.7.1, les résultats s'expriment en mm de diamètre de l'éventuelle zone d'inhibition autour du disque de substance, après 18 heures d'incubation à 37°C.

III. Résultats / Discussion

III.1. Purification et caractérisation des antiprotéases du blanc d'œuf

On cherche à identifier des antiprotéases du blanc d'œuf de poule (dont l'ovoinhibiteur, l'ovomucoïde et la cystatine de poulet), à les purifier afin de caractériser leurs activités et notamment leur potentiel antimicrobien vis-à-vis de *Salmonella*.

III.1.1 Isolation des antiprotéases du blanc d'œuf par chromatographie d'affinité de type protéase-sépharose

a) Stratégie

La stratégie utilisée pour isoler les antiprotéases du blanc d'œuf est inspirée de l'article d'ANASTASI (Anastasi *et al.*, 1983) et s'appuie sur leurs activités inhibitrices, spécifiques d'une classe de protéases donnée et conduisant à la formation de complexes protéases/antiprotéases. En incubant du blanc d'œuf avec des billes de sépharose présentant à leur surface une protéase cible de l'antiprotéase recherchée, c'est-à-dire en réalisant un couplage « billes de sépharose – protéase », on espère retenir les inhibiteurs de la protéase, parmi lesquels on identifiera, vraisemblablement, des inhibiteurs déjà connus ; on espère également isoler des antiprotéases non décrites par la littérature. Cette technique de purification a été mise au point en s'appuyant sur la spécificité inhibitrice de trois antiprotéases connues du blanc d'œuf (ovoinhibiteur, ovomucoïde et cystatine) afin d'isoler des antiprotéases du blanc d'œuf présentant les mêmes caractéristiques. Cette nouvelle compétence pourra par la suite être exploitée au sein du laboratoire et adaptée à d'autres fluides biologiques tels que le jaune d'œuf ou des extraits protéiques de la coquille.

L'ovoinhibiteur et l'ovomucoïde sont capables d'inhiber des protéases à sérine. L'ovoinhibiteur présentant une plus grande spécificité de reconnaissance pour la chymotrypsine que pour la trypsine, on choisit de retenir cette antiprotéase par des billes couplées à la chymotrypsine. De même, des expériences antérieures (Rhodes *et al.*, 1960; Feeney *et al.*, 1963) ont montré que l'ovomucoïde interagissait préférentiellement avec la trypsine, on effectuera donc un couplage trypsine-sépharose pour la pré-purification de l'ovomucoïde.
La cystatine de poulet, quant à elle, peut être retenue par chromatographie d'affinité avec la papaïne, une protéase à cystéine, comme l'a démontré ANASTASI (Anastasi *et al.*, 1983).

b) Résultats

Les chromatographies d'affinité sont réalisées par couplage covalent des billes de sépharose activées par le bromure de cyanogène avec la protéase cible, la chymotrypsine, la trypsine ou la papaïne. Les billes alors obtenues sont incubées avec le blanc d'œuf puis lavées de manière à éliminer les protéines non spécifiques. Enfin, les protéines affines sont éluées à pH 2 ou 11 (voir II.1, II.2).
Il importe, ensuite, de vérifier la qualité de notre pré-purification et la présence, dans la fraction protéique récupérée, des antiprotéases recherchées, parmi d'autres inhibiteurs de protéases qu'il peut être intéressant d'identifier pour élargir le champ de nos connaissances.

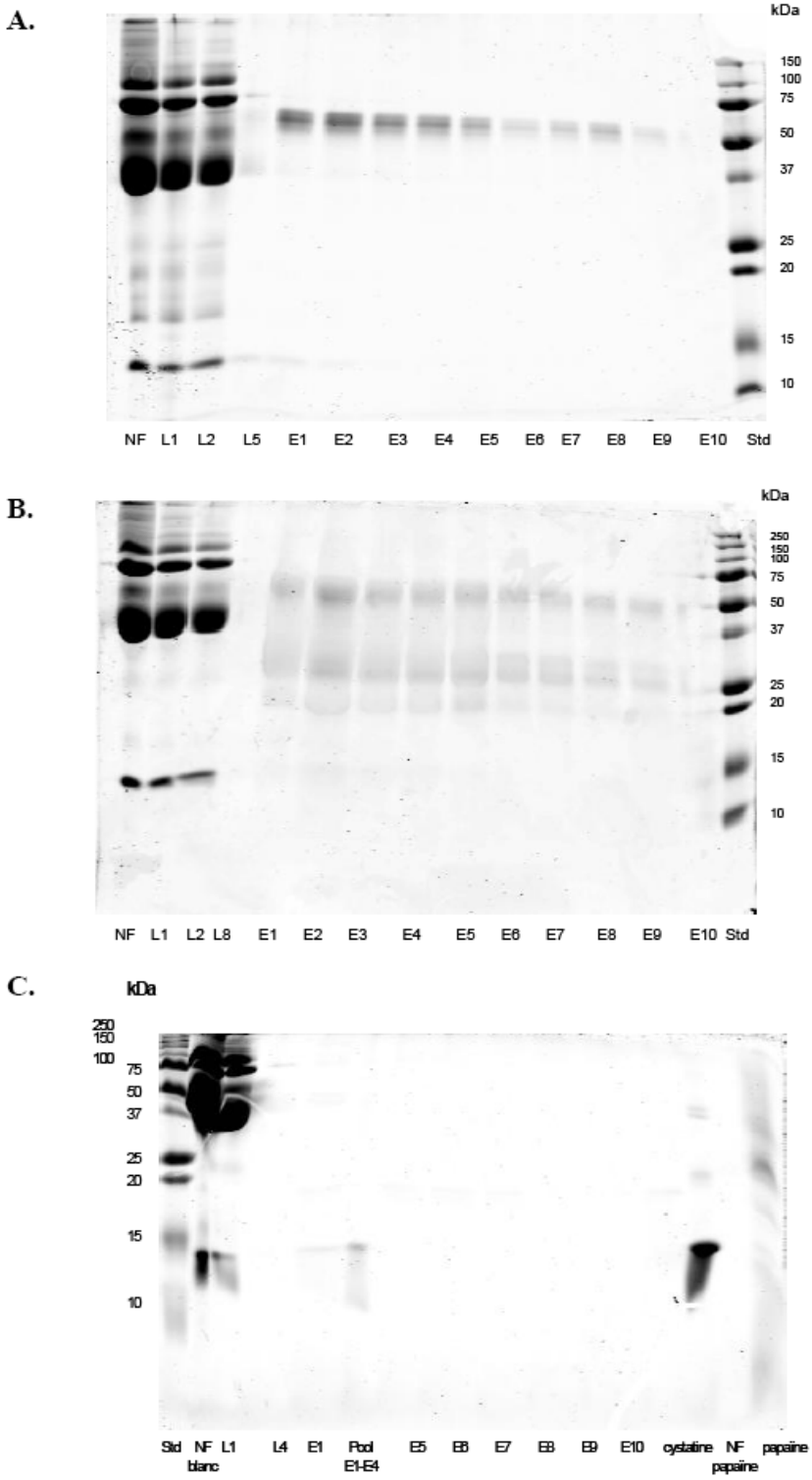


Figure III.1 : Gel SDS-PAGE (12,5 %) des purifications sur protéase-sépharose
A. Fraction issues de la chymotrypsine-sépharose. **B.** Fractions issues de la trypsine-sépharose. **C.** Fractions issues de la papaïne-sépharose. NF, non fixé, 2 µL ; L1, Lavage 1, 5 µL ; L2-L8, lavages, 20 µL ; E1-E10, fractions d'élutions, 20 µL ; Std, standard de poids moléculaire, 5 µL ; cystatine, cystatine commerciale. Les échantillons ont été solubilisés dans un tampon de Laemmli non réducteur, et n'ont pas été bouillis afin de préserver au maximum leur configuration native.

C'est pourquoi, on analyse, dans un premier temps, la composition protéique des fractions issues des trois purifications (par trypsine-, chymotrypsine- et papaïne-sépharose) sur gel de polyacrylamide.

Les purifications semblent avoir bien marché (Fig. III.1) : en effet le dernier lavage (L5, L8 ou L4 de Fig. III.1.A, B, C respectivement) montre très peu de protéines résiduelles non fixées sur les billes, tandis que l'élution (E1 et fractions suivantes) entraîne le décrochement des protéines affines. Les fractions présentant la plus forte concentration en protéines (estimée par spectrophotométrie au *Nanodrop*) ont été regroupées, dialysées et lyophilisées pour former la fraction de purification CT-sépharose (chymotrypsine-sépharose), T-sépharose (trypsine-sépharose) ou P-sépharose (papaïne-sépharose). Comme attendu, parmi les bandes protéiques éluées de la chymotrypsine-sépharose, on peut noter la présence de protéines d'un poids moléculaire apparent d'environ 50 kDa pouvant correspondre à celui de l'ovoinhibiteur (Fig. III.1.A). De même, on observe pour la trypsine-sépharose, des protéines de poids moléculaire apparent similaire à celui de l'ovomucoïde, de 27 à 35 kDa (Fig. III.1.B). Enfin, très peu de protéines sont éluées de la papaïne-sépharose, mais on constate néanmoins la présence d'une protéine d'environ 14 kDa, de poids similaire à celui de la cystatine commerciale (Fig. II.1.C, Pool E1-E4 *versus* cystatine).

III.1.2 Identification des protéases par spectrométrie de masse

L'analyse des bandes protéiques de chaque fraction par spectrométrie de masse nous permet, dans un second temps, d'identifier avec précision les constituants des fractions de purification, suite à leur digestion en fragments peptidiques par la trypsine (voir Matériel et méthodes II.4).

Une première identification a été tentée sur des bandes de gel obtenues par SDS-PAGE en conditions non réductrices (Fig. III.2).

On s'attendait à une identification de la cystatine dans la bande de poids moléculaire apparent 14 kDa (bande P-14), de l'ovomucoïde dans la bande T-30 et de l'ovoinhibiteur dans la bande CT-45/55.

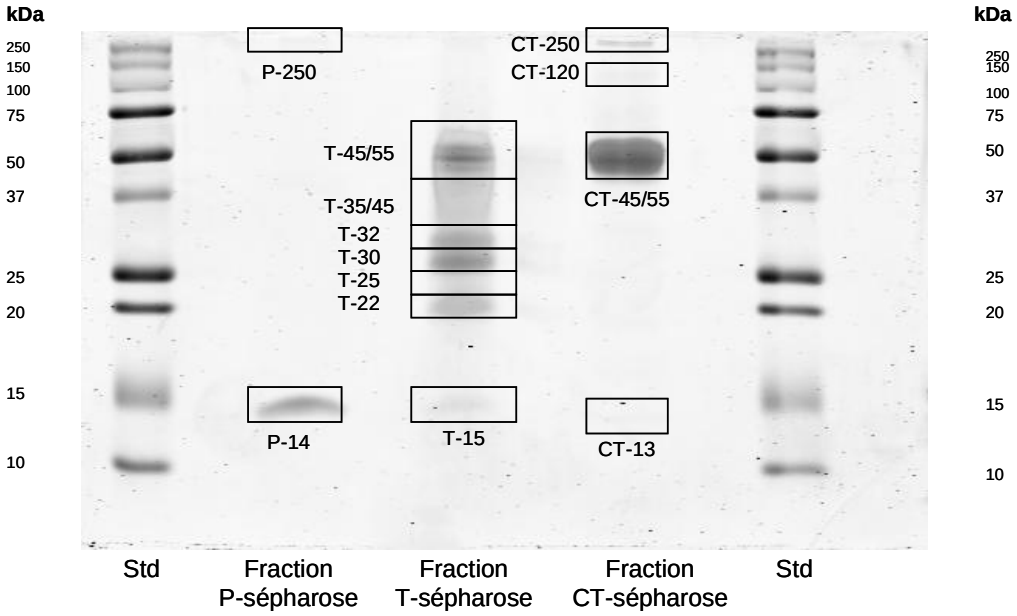


Figure III.2 : **Bandes de gel SDS-PAGE (12,5 % de polyacrylamide, conditions non réductrices) découpées pour digestion et analyse par spectrométrie de masse.** La piste identifiée comme « Fraction P-sépharose » correspond à la fraction obtenue par chromatographie sur papaïne-sépharose (environ 8 µg déposés); de même la fraction purifiée sur trypsine-sépharose a été déposée dans le puits « Fraction T-sépharose » (environ 8 µg) et la fraction purifiée sur chymotrypsine-sépharose dans le puits « Fraction CT-sépharose » (environ 8 µg). Les bandes sont identifiées par leur origine (P- pour piste papaïne, T- pour piste trypsine, CT- pour piste chymotrypsine) et leur poids moléculaire apparent (en kilodalton). Std, marqueur de taille.

En réalité, suite à la digestion trypsique des échantillons et l'analyse de leurs fragments peptidiques par spectrophotométrie de masse, seules trois protéines ont été identifiées (voir Annexe 3) : on relève en effet la présence de cystatine dans la fraction obtenue par chromatographie d'affinité sur papaïne-sépharose, au poids moléculaire attendu (14 kDa), la présence d'ovoinhibiteur dans la fraction obtenue sur trypsine-sépharose (à 45/55 kDa) et la présence probable de lysozyme dans la fraction issue de la pré-purification sur chymotrypsine-sépharose (à un poids moléculaire apparent de 13kDa). On notera que l'identification de cette dernière protéine n'est pas certaine ; en effet un seul fragment peptidique a été reconnu, sur les trois exigés au minimum pour assurer la présence de la protéine mère dans la bande analysée. De plus, le lysozyme n'est pas une antiprotéase et, par le fait, ne devrait pas se fixer sur la colonne.
Les fragments protéiques des autres bandes n'ont pu être identifiés ; néanmoins, leur présence effective dans les échantillons traités à la trypsine a été confirmée par le relevé de pics distincts sur spectrogramme MALDI-TOF (voir Annexe 4).

La première protéine (bande P-14) correspond à nos souhaits : la papaïne-sépharose a bien retenu la cystatine parmi d'autres antiprotéases du blanc d'œuf. Néanmoins la deuxième bande identifiée (T-45/55) ne nous satisfait pas : on attendait en effet la présence d'ovomucoïde dans la fraction purifiée sur trypsine-sépharose, au moins dans l'une des bandes présentant un poids moléculaire entre 27 et 35 kDa. La présence de l'ovoinhibiteur dans cette fraction de purification n'est cependant pas surprenante, dans la mesure où cette antiprotéase possède au moins quatre sites inhibiteurs de la trypsine (voir Fig. IV.1 en conclusion).
En ce qui concerne la recherche de nouvelles antiprotéases du blanc d'oeuf, on peut s'étonner du faible nombre de protéines identifiées, sur le nombre total de bandes analysées.

Tableau III.1 : Résultats d'identification par spectrométrie de masse des bandes de poids moléculaire apparent découpées du gel en Figure III.3.

Bande	MS/MS Q-TOF	Nb Pep.	MS/MS *ion trap*	Nb Pep.
P->300				
P-30	***clusterin*** *[Gallus gallus]*	*1*	*CYT_CHICK (P01038)* ***Cystatin*** *precursor (Egg-white cystatin)*	*2*
P-22	NON RENSEIGNE		*CYT_CHICK (P01038)* ***Cystatin*** *precursor (Egg-white cystatin)*	*2*
P-14	***cystatin*** *C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage) [Gallus gallus]*	*5*	*CYT_CHICK (P01038)* ***Cystatin*** *precursor (Egg-white cystatin)*	*6*
T-27/37	NON RENSEIGNE			
T-27/37b			*IOVO_PTEPE (P67943)* ***Ovomucoid*** *(Fragment)*	*1*
T-20/26	NON RENSEIGNE			
T-20/26b	NON RENSEIGNE			
T-17	NON RENSEIGNE		*IOV7_CHICK (P10184)* ***Ovoinhibitor*** *precursor*	*1*
T-17b			*CYT_CHICK (P01038) Cystatin precursor (Egg-white cystatin) **	*1*
			IOV7_CHICK (P10184) ***Ovoinhibitor*** *precursor **	*2*
T-14				
T-14b				
T-12	NON RENSEIGNE		*IOV7_CHICK (P10184)* ***Ovoinhibitor*** *precursor **	*2*
T-12b	NON RENSEIGNE			
CT->300	NON RENSEIGNE		*OVOS_CHICK (P20740)* ***Ovostatin*** *precursor (Ovomacroglobulin)*	*2*
CT-50	NON RENSEIGNE		*IOV7_CHICK (P10184)* ***Ovoinhibitor*** *precursor*	*3*
CT-37/45	*similar to* ***ovoinhibitor*** *precursor [validated] - chicken [Gallus gallus]*	*9*	*IOV7_CHICK (P10184)* ***Ovoinhibitor*** *precursor*	*4*
CT-30/35	*similar to* ***ovoinhibitor*** *precursor [validated] - chicken [Gallus gallus]*	*7*	*IOV7_CHICK (P10184)* ***Ovoinhibitor*** *precursor*	*3*
CT-20				
CT-18	*similar to* ***ovoinhibitor*** *precursor [validated] - chicken [Gallus gallus]*	*2*	*IOV7_CHICK (P10184)* ***Ovoinhibitor*** *precursor*	*4*
CT-16	*similar* ***to ovoinhibitor*** *precursor [validated] - chicken [Gallus gallus]*	*2*	*IOV7_CHICK (P10184)* ***Ovoinhibitor*** *precursor*	*2*
CT-14	*similar* ***to ovoinhibitor*** *precursor [validated] - chicken [Gallus gallus]*	*2*	*IOV7_CHICK (P10184)* ***Ovoinhibitor*** *precursor*	*4*
CT-12			*IOV7_CHICK (P10184)* ***Ovoinhibitor*** *precursor*	*2*

Le nombre de peptides ayant participé à l'identification des protéines (Nb Pep.) est indiqué dans les colonnes adjacentes à chaque dispositif. La mention « NON-RENSEIGNE » indique quels échantillons n'ont pu être analysés par spectromètre Q-TOF, suite à des incidents techniques. Les cases vides correspondent à l'absence de protéine identifiée, outre la trypsine bovine, dont l'origine est discutée ci-dessous. Les protéines identifiées sans certitude, probablement issues de contaminations entre échantillons, sont signalées par un astérisque : *

Malgré les informations apportées par spectrométrie en MALDI-TOF et évoquées ci-dessus, un élément de réponse peut être avancé : l'hydrolyse préalable à la spectrométrie de masse MS/MS (en tandem) est réalisée par la trypsine bovine ; or les bandes analysées ont été obtenues suite à une migration SDS-PAGE en conditions non réductrices : les protéines séparées sont donc sous une conformation relativement native. Certaines de ces protéines ont été isolées du blanc d'œuf pour leur potentiel inhibiteur vis-à-vis de la trypsine (fraction T-sépharose contenant, en principe, l'ovomucoïde) ; elles sont susceptibles d'avoir conservé, durant l'électrophorèse, cette reconnaissance spécifique de la trypsine, d'inhiber ainsi son action hydrolytique, et donc de perturber la génération de fragments peptidiques identifiables par spectrométrie de masse.

Afin de valider ou non cette explication, une identification par spectrométrie de masse a été réalisée sur des bandes issues d'une migration SDS-PAGE en conditions réductrices (Fig. III.3), permettant une inactivation des antiprotéases présentes dans les fractions. On notera que les bandes obtenues en conditions non réductrices diffèrent, par leurs poids moléculaires, des bandes analysées en conditions réductrices, les ponts disulfures étant en effet rompus sous ces conditions. La rupture de ces ponts et la dénaturation des protéines à 95°C provoque la linéarisation des protéines ; celles-ci vont alors migrer uniquement en fonction de leur masse (et non plus selon leur conformation), leur charge individuelle étant négative de par la présence de SDS.

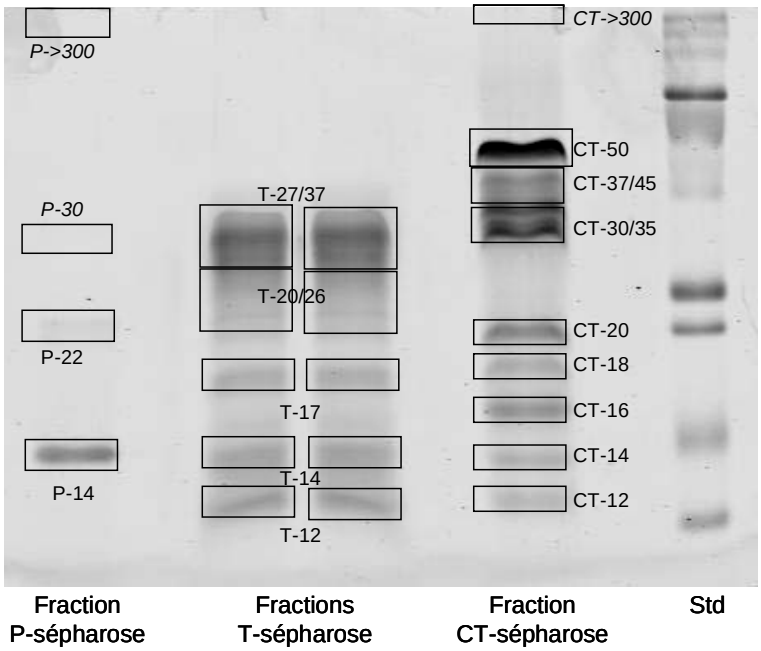


Figure III. 3 : **Bandes de gel SDS-PAGE (12,5 % de polyacrylamide, conditions réductrices) découpées pour digestion et analyse par spectrométrie de masse.** La piste identifiée comme « Fraction CT-sépharose » correspond à la fraction obtenue par chromatographie sur chymotrypsine-sépharose (environ 20 µg déposés); de même la fraction purifiée sur trypsine-sépharose a été déposée dans le puits « Fraction T-sépharose » (environ 20 µg) et la fraction purifiée sur papaïne -sépharose dans le puits « Fraction CT-sépharose » (environ 20 µg). Les bandes sont identifiées par leur origine (P- pour piste papaïne, T- pour piste trypsine, CT- pour piste chymotrypsine) et leur poids moléculaire apparent (en kilodalton). Les échantillons dilués dans leur tampon réducteur ont été bouillis pendant 5 minutes au bain-marie avant leur dépôt dans les puits de gel. Std, marqueur de taille.

Les bandes protéiques CT->300 et P->300 correspondent à des bandes visibles au-delà du marqueur de taille 250 kDa ; leur poids moléculaire apparent ne peut donc être davantage

précisé. Tout comme pour la bande P-30, le dépôt protéique de ces bandes n'est pas visible sur la photographie, car elles ont été extraites d'un autre gel à l'issue d'une purification sur sépharose plus récente, la purification et la migration ayant été réalisées strictement dans les mêmes conditions.

Les bandes de gel confiées à la plateforme de spectrophotométrie ont été digérées par trypsine bovine avant analyse spectrométrique par couplage de nanochromatographie liquide (nanoHPLC) et spectromètre de masse tandem. Pour ce dernier dispositif, les échantillons été analysés sur deux équipements : spectromètre Q-TOF et spectromètre avec trappe ionique. Les deux approches ont fourni des résultats concordants dont la synthèse est présentée dans le tableau ci-contre (Tableau III.1). Les tableaux originaux et détaillés des résultats figurent en Annexes 5 à 6.

Les trois antiprotéases de référence ont, cette fois-ci, été identifiées dans leurs fractions respectives, ce qui tend à valider la stratégie de purification par couplage de type « protéase cible – sépharose ».
Il importe toutefois de se référer au nombre de peptides reconnus par la base de données et ayant ainsi permis l'identification d'une protéine. On considère généralement que trois peptides différents sont nécessaires pour attester avec certitude de la présence d'une protéine dans l'échantillon. Selon ce critère, seuls l'ovoinhibiteur et la cystatine ont une présence avérée dans les fractions. Néanmoins, des incidents techniques, intervenus lors de la spectrométrie par Q-TOF, ont entraîné la perte des données relatives à plusieurs bandes de la fraction purifiée sur trypsine-sépharose ; on peut penser qu'elles auraient renforcé cette information quant à la présence d'ovomucoïde dans la fraction T-sépharose.

Pour la majorité des bandes (exception faite des bandes à 50 et plus de 300 kDa de la fraction purifiée sur chymotrypsine-sépharose), notamment celles où aucune antiprotéase n'a été identifiée (P->300, T-27/37, T-20/26 et T-20/26b, T-14 et T-14b, T-12b et CT-20), des fragments de trypsine bovine ont été décelés par spectrométrie dans les échantillons digérés. Cette trypsine correspond à la trypsine bovine utilisée pour la digestion des protéines avant analyse par spectrométrie de masse. Elle pourrait également correspondre à la trypsine bovine ayant servi à la conception de la trypsine-sépharose et qui se serait décrochée des billes au cours de l'élution.
En ce qui concerne ces bandes P->300, T-27/37, T-20/26 et T-20/26b, T-14 et T-14b, T-12b et CT-20, aucune protéine connue ou inconnue n'a pu être identifiée, en dehors de la trypsine bovine. Pour des raisons de disponibilité technique, ces échantillons n'ont pu être analysés par MALDI-TOF ; on ne dispose donc pas de spectrogramme permettant de trancher sur les raisons de cet échec : s'agit-t-il de fragments protéiques bien présents dans l'échantillon digéré mais inconnus de la base de données du spectromètre ? ou est-ce que la bande protéique n'a pu être digérée par la trypsine parce qu'elle exerçait toujours une inhibition vis-à-vis de cette protéase, malgré les conditions réductrices et dénaturantes de la séparation sur SDS-PAGE (auquel cas, aucun fragment peptidique ne serait de taille à être analysé par spectrométrie) ? La présence de pics sur le spectrogramme MALDI-TOF aurait permis de répondre favorablement à la première hypothèse et d'attester ainsi la purification de nouvelles antiprotéases du blanc d'œuf.

Pour contourner cette incertitude, une nouvelle analyse spectrométrique a été réalisée sur les constituants des fractions purifiées sur chymotrypsine- et trypsine-sépharose, après digestion par une enzyme de spécificité différente de la trypsine : l'endoprotéase Glu-C (*Sigma*), clivant les protéines en carboxy-terminal des résidus glutamate.

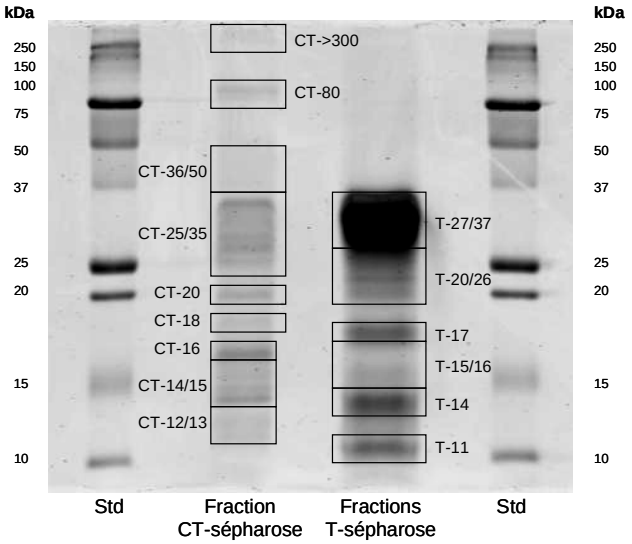


Figure III.4 : Bandes de gel SDS-PAGE (12,5 % de polyacrylamide, conditions réductrices) découpées pour digestion et analyse par spectrométrie de masse. La piste identifiée comme « Fraction CT-sépharose » correspond à la fraction obtenue par chromatographie sur chymotrypsine-sépharose (environ 20 µg déposés); de même la fraction purifiée sur trypsine-sépharose a été déposée dans le puits « Fraction T-sépharose » (environ 20 µg). Les bandes sont identifiées par leur origine (T- pour piste trypsine, CT- pour piste chymotrypsine) et leur poids moléculaire apparent (en kilodalton). Les échantillons dilués dans leur tampon réducteur ont été bouillis pendant 5 minutes au bain-marie avant leur dépôt dans les puits de gel. Std, marqueur de taille.

Cette analyse spectrométrique, menée par équipement Q-TOF, n'a pas apporté d'informations supplémentaires par rapport aux analyses antérieures, hormis une identification plus nette de l'ovomucoïde dans la fraction purifiée sur trypsine-sépharose. Les résultats détaillés ne sont donc pas présentés dans ce rapport mais apparaissent en Annexe 7. On notera néanmoins qu'aucune trace de trypsine bovine n'a été décelée dans les échantillons digérés par l'endoprotéase Glu-C ; les traces relevées lors des analyses précédentes provenaient donc bien de la trypsine utilisée pour la digestion et non pas de la chromatographie.

III.1.3 Caractérisation de l'activité inhibitrice des fractions purifiées

Une première purification par chromatographie d'affinité nous a conduit à isoler des inhibiteurs reconnaissant la même protéase (trypsine, chymotrypsine ou papaïne). Certaines des protéines éluées des différentes chromatographies ont pu être identifiées par spectrométrie de masse, d'autres sont encore en cours d'analyse. A l'issue de cette première étape et avant de purifier davantage les fractions hétérogènes obtenues, il convient de s'assurer de l'intégrité de l'activité inhibitrice des fractions d'antiprotéases, en réalisant des tests cinétiques.

Ces tests reposent sur l'hydrolyse de substrats peptidiques chromogéniques spécifiques des protéases cibles de nos inhibiteurs. En présence de l'enzyme protéasique, un groupement para-nitroanilide (pNA) est libéré d'une séquence peptidique spécifique ; ce groupement présentant un pic d'absorbance à 410 nm, on peut suivre l'accumulation de ce produit dans le milieu réactionnel au cours du temps, ce qui reflète l'hydrolyse du substrat par la protéase.

Si l'on place dans le milieu de réaction un inhibiteur de la protéase, l'activité hydrolytique de cette dernière sera réduite voire annulée, la libération de pNA sera moindre et l'augmentation d'absorbance à 410 nm plus faible. Par comparaison des pentes d'hydrolyse (unités d'absorbance en fonction du temps, voir II.5) en présence et en absence d'antiprotéases, on espère donc souligner l'activité inhibitrice de nos fractions purifiées.

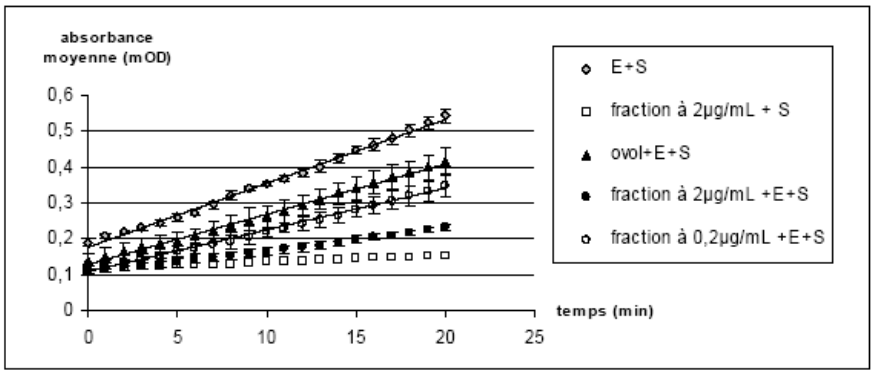


Figure III.5 : **Inhibition de la chymotrypsine par l'ovoinhibiteur commercial et la fraction CT-sépharose.** Moyenne de trois répétitions. E, chymotrypsine ; Fraction, fraction d'élution de la chymotrypsine-sépharose ; ovoI, ovoinhibiteur commercial ; pNA, para-nitroanilide ; S, substrat Suc-AAPF-pNA ; Suc, Succinyl.

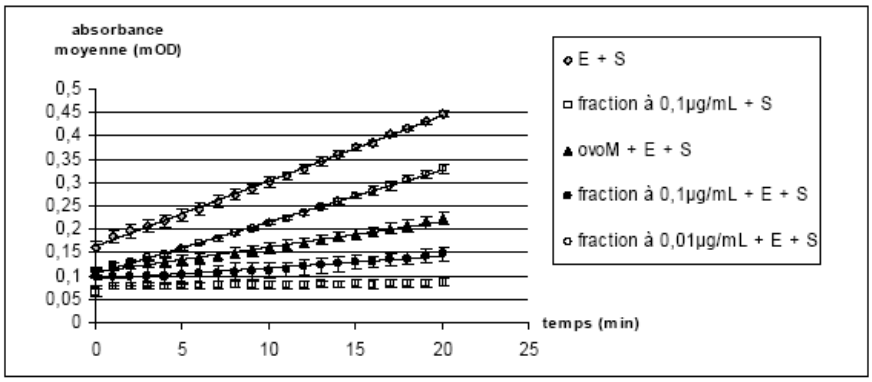


Figure III.6 : **Inhibition de la trypsine par l'ovomucoïde commercial et la fraction T-sépharose.** Moyenne de trois répétitions. E, trypsine ; Fraction, fraction d'élution de la trypsine-sépharose ; ovoM, ovomucoïde commercial ; pNA, para-nitroanilide ; S, substrat N-tosyl-GPR-pNA.

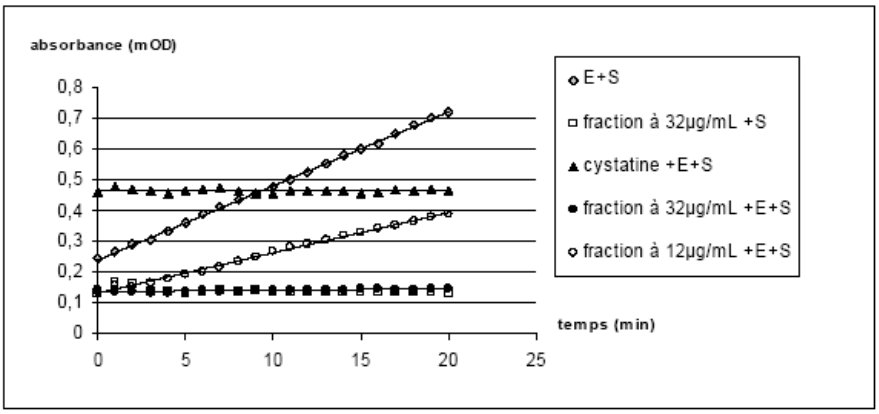


Figure III.7 : **Inhibition de la papaïne par la cystatine commerciale et la fraction P-sépharose.** Echantillon représentatif. E, papaïne ; Fraction, fraction d'élution de la papaïne-sépharose ; cystatine, cystatine commerciale ; pNA, para-nitroanilide ; S, substrat p-GFL-pNA.

Le choix du substrat dépend de la protéase : la chymotrypsine clive spécifiquement après des résidus hydrophobes tels que la leucine (L) et/ou aromatiques tels que la phénylalanine (F) et la tyrosine (Y) ; la trypsine reconnaît spécifiquement des résidus chargés positivement tels que la lysine (K) ou l'arginine (R) ; la papaïne est, quant à elle, surtout sensible à la présence d'un tampon d'activation acide et d'un agent réducteur, le dithiothréitol (DTT).

Dans nos tests d'activité (voir Tableaux II.2, II.3, II.4 dans Matériel et méthodes II.5), le puits de référence associe l'enzyme, le substrat et la fraction de purification. Des mesures de coloration sont effectuées en parallèle sur des témoins :
- un des témoins ne comprend que le substrat afin de visualiser une éventuelle hydrolyse spontanée,
- un témoin associe l'enzyme et le substrat seuls,
- un autre témoin associe l'enzyme, le substrat et une antiprotéase commerciale afin de vérifier que les conditions expérimentales permettent effectivement l'inhibition de la protéase,
- enfin, deux témoins n'associent que l'inhibiteur (fraction ou antiprotéase commerciale) au substrat, afin de garantir que l'inhibiteur n'est pas contaminé par une protéase capable d'hydrolyser elle-même le substrat, ce qui fausserait notre interprétation.

Les tests d'activité protéasique ont été réalisés à deux concentrations de fraction de purification différentes ; celles-ci ont été ajustées de façon à atteindre une inhibition presque totale (environ 100 % d'inhibition) et une inhibition partielle (20 à 50 % d'inhibition), et ainsi visualiser une éventuelle relation dose / réponse entre la concentration de fraction et l'inhibition de protéase effectivement observée.

Les premiers tests effectués mettaient en œuvre des concentrations d'inhibiteur commercial calculées pour respecter un certain ratio inhibiteur / enzyme, les molarités de chacun étant connues. Un tel ajustement n'était pas possible pour nos fractions hétérogènes, les concentrations ont donc été ajustées par tâtonnements, selon l'inhibition observée.

Ces ajustements ont ainsi abouti à tester le potentiel inhibiteur de la fraction purifiée sur chymotrypsine-sépharose aux concentrations 2 µg/mL et 0,2 µg/mL, en parallèle d'un contrôle commercial à 10 nM. Pour la fraction purifiée sur trypsine-sépharose, les concentrations ont été ajustées à 0,1 et 0,01 µg/mL, en parallèle d'un contrôle commercial à 2,5 nM. Enfin, la fraction purifiée sur papaïne-sépharose a été caractérisée aux concentrations de 32 et 12 µg/mL, en parallèle d'un contrôle commercial à 275 nM. Les résultats sont présentés Fig. III.5, III.6 et III.7. Tous les tests ont été réalisés en triplicata.

Quels que soient les substrats testés, nous n'avons pas observé d'apparition d'hydrolyse spontanée ni d'absorbance basale élevée, ce qui témoigne de l'intégrité des substrats. Les fractions issues des différentes purifications ne semblent pas hydrolyser significativement les substrats dans les conditions choisies pour ces tests.
Les tests sur papaïne ont montré, pour quelques répétitions, des absorbances anormalement élevées dès la première mesure, d'où une moyenne peu représentative et des écarts-types importants; néanmoins lorsque l'on s'intéresse aux pentes d'hydrolyse, on retrouve le même comportement pour les trois répétitions. Le test reste donc satisfaisant. Pour simplifier la lecture graphique, en s'affranchissant des barres d'erreur standard, nous avons choisi d'illustrer les résultats par les valeurs d'un échantillon représentatif des trois répétitions (Fig. III.7). L'absorbance élevée étant maintenue tout au long de la durée de lecture spectrométrique, ces artefacts pour le test d'inhibition de la papaïne, visibles notamment sur la

droite de contrôle cystatine, sont sans doute à attribuer à une opacité des puits de dépôt, peut-être suite au pré-coating par l'albumine sérique bovine.

Plus que les valeurs de densité optique, nous nous intéressons aux variations de pentes par rapport au témoin associant la protéase et le substrat dont la pente est ramenée à 100 % d'activité. Ces variations de pentes permettent le calcul d'un pourcentage d'activité résiduelle de la protéase et, par différence, d'un pourcentage d'inhibition par l'antiprotéase commerciale ou la fraction selon la formule suivante :

$$\frac{\text{Pente moyenne du milieu testé} - \text{Pente moyenne du contrôle « milieu sans la protéase »}}{\text{Pente moyenne du contrôle « protéase + substrat »}} \times 100$$

La pente moyenne du contrôle « milieu sans la protéase » n'est prise en compte que lorsqu'elle est positive (les valeurs négatives sont des artefacts, elles ont été arrondies à 0).
Pour l'activité résiduelle en présence de la fraction à la concentration C1, le contrôle sans la protéase n'a été réalisé qu'à la concentration C2 ; on en tient compte en multipliant sa pente moyenne (lorsqu'elle est positive) par le rapport des deux concentrations.

Un écart-type est indiqué, calculé comme suit :

$$\frac{\text{Ecart-type par rapport à la pente moyenne}}{\text{Pente moyenne du contrôle « protéase + substrat »}} \times 100$$

Les résultats sont présentés dans le Tableau III.2 ci-dessous.

Tableaux III.2: Activité résiduelle moyenne de la protéase en présence des fractions purifiées

	Pourcentage d'activité résiduelle		
Protéase inhibée	I + E + S	Fraction à C1 + E + S	Fraction à C2 + E + S
Chymotrypsine	77,06 ± 4,00	63,88 ± 5,00	22,82 ± 3,00
Trypsine	36,28 ± 2,00	79,35 ± 5,00	15,99 ± 2,00
Papaïne	0,00 ± 1,00	52,77 ± 9,00	2,66 ± 1,00

I, inhibiteur commercial spécifique de chacune des enzymes ; E, enzyme testée ; S, substrat spécifique de l'enzyme testée ; Fraction, fraction CT-sépharose à 0,2 (C1) et 2 µg/mL (C2), fraction T-sépharose à 0,01 (C1) et 0,1 µg/mL (C2) ou fraction P-sépharose à 12 (C1) et 32 µg/mL (C2).

Dans les trois types de tests, les activités résiduelles des protéases, après incubation avec les inhibiteurs commerciaux, sont de l'ordre de 77 à 0 %, ce qui correspond à une inhibition partielle (23 %) à totale (100 %). Ceci valide nos conditions expérimentales pour l'étude de l'activité inhibitrice des fractions d'élution.
Nos trois fractions purifiées sur chymotrypsine-, trypsine- et papaïne-sépharose montrent également une activité inhibitrice vis-à-vis de leur protéase cible. Les ajustements de concentrations ont abouti à la détermination d'une concentration C1, propre à chaque fraction, pour laquelle on observe une inhibition partielle de la protéase (53 à 80 % d'activité résiduelle de la protéase, soit 20 à 47 % d'activité inhibitrice selon les fractions considérées), en

opposition à une concentration C2, montrant une inhibition presque totale de la protéase cible (3 à 23 % d'activité résiduelle, soit 77 à 97 % d'inhibition).
Outre la démonstration d'une activité inhibitrice des fractions pré-purifiées, ces tests cinétiques mettent donc en exergue une relation dose-dépendante entre cette activité et la concentration de fraction dans le milieu.

III.2. Etude de l'expression transcriptionnelle des gènes de trois antiprotéases du blanc d'œuf dans l'oviducte de poule

Parallèlement à la purification, à partir de blanc d'œuf, de l'ovoinhibiteur, de l'ovomucoïde, de la cystatine et d'autres antiprotéases nouvellement identifiées, on cherche à mieux définir les lieux d'expression privilégiée des gènes de ces antiprotéases par une étude globale *via* une PCR en point final.
On s'intéresse aux tissus impliqués dans la formation de l'œuf, c'est à dire aux tissus de l'appareil reproducteur de la poule pondeuse *Gallus gallus* ou oviducte (magnum, isthme blanc, isthme rouge et utérus), en comparant leur expression à deux stades du processus séquentiel de formation de l'œuf :

- le stade *3h-post-ovulation*, correspondant au passage de l'œuf dans le magnum et au cours duquel le blanc est déposé,
- le stade *18h-post-ovulation*, lorsque l'œuf évolue dans l'utérus et voit sa coquille déposée.

Nous avons également inclus le foie car il est le lieu de synthèse des protéines constituantes du jaune d'œuf et déposées avant ovulation.
Les manipulations ont donc été effectuées sur cinq tissus, identifiés par la suite : Ma pour magnum, WI (*White isthmus*) pour isthme blanc, RI (*Red isthmus*) pour isthme rouge, Ut pour utérus et L (*Liver*) pour foie, et prélevés aux deux stades de formation de l'œuf évoqués ci-dessus (voir Figure I.3).

III.2.1 Préparation des échantillons d'ADN complémentaires

A l'issue de l'extraction des 20 échantillons d'ARN totaux, ceux-ci sont concentrés par précipitation dans l'éthanol et solubilisés dans un volume défini, afin de garantir une plus grande pureté des ARN extraits. Des estimations de concentration en acides nucléiques, par mesures spectrophotométriques au *Nanodrop* à 260 nm, ont été effectuées avant et après cette concentration par précipitation ; elles permettent de calculer un rendement de l'opération, rendant compte de la rigueur de la manipulation.

Tableau III.3 : Rendement de l'étape de concentration des échantillons d'ARN extraits.

Echantillons	qté ARN départ en µg	qté ARN finale en µg	Rendement en %
WI 4.2	55,93	44	78,7
RI 4.1	275,5	191,2	69,4
RI 6.1	181,45	127,2	70,1
RI 10.3	230,85	161,6	70,0
RI 11.2	120,05	90,8	75,6
L 4.2	39,102	35,6	91,0
L 6.2	41,04	38,4	93,6
L 10.2	39,672	44,8	112,9
L 11.1	35,853	34	94,8

Seuls figurent les échantillons extraits par nos soins lors de cette expérience. Les échantillons d'utérus et les trois premiers échantillons d'ARN totaux d'isthme blanc avaient été extraits et concentrés antérieurement.

Les rendements sont globalement satisfaisants. On notera toutefois le rendement de la concentration de l'échantillon d'ARN de foie L 10.2, anormalement élevé (112 %). Cela s'explique sans doute par le biais d'estimation de la concentration par l'équipement de spectrophotométrie ; il aurait été plus rigoureux de recommencer ces mesures sur une dilution au ½ de l'échantillon d'ARN extraits. Cependant, une telle valeur ne remet pas en cause la pureté de l'échantillon puisque le spectrophotomètre indiquait, par ailleurs, un rapport A260/A280 (indicateur de pureté d'ARN vis-à-vis des protéines à acides aminés aromatiques) tout à fait correct.

Suite à cette étape de concentration des ARN extraits, un contrôle de leur qualité a été réalisé sur gel d'agarose afin de s'assurer de leur non-dégradation, avant transcription inverse.

La synthèse d'ADN complémentaires (ADNc) des ARN totaux de tissus de poule a elle-aussi donné lieu à une vérification : les ADNc ont été amplifiés en présence d'amorces spécifiques de la séquence génique codant pour l'ARN 18S, un ARN ubiquitaire chez les organismes eucaryotes. Le gel dont la photographie figure ci-dessous (Fig. III.8) a été obtenu à l'issue d'une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) dans les conditions optimales explicitées en II.6.3 (Matériel et méthodes).

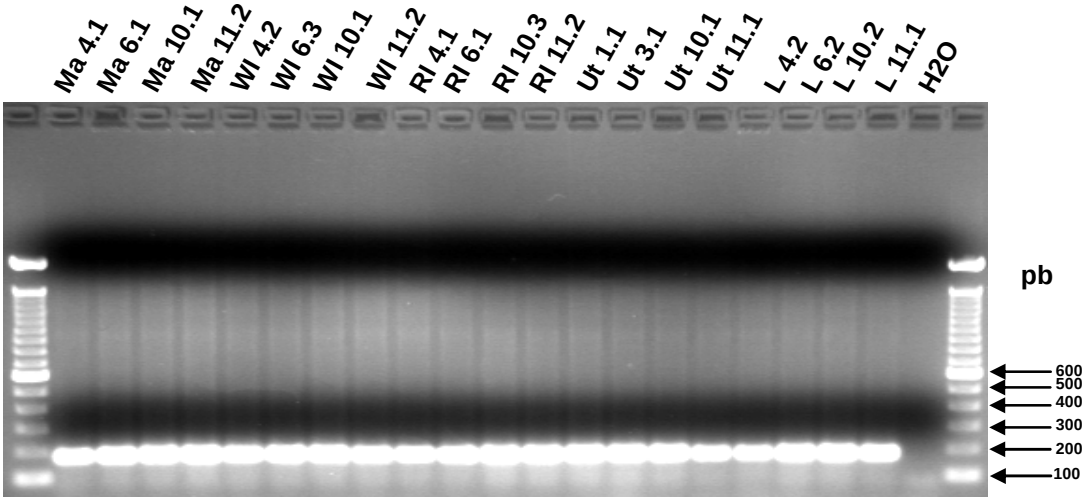


Figure III.8 : Gel d'agarose (1,4 %) des produits de la PCR réalisée en présence d'amorces spécifiques de la séquence codant pour l'ARN 18S.

Ma 4.1, 6.1, magnum 3h-post-ovulation ; Ma 11.2, 10.1, magnum 18h-post-ovulation ; WI 4.2, 6.3, isthme blanc 3h-post-ovulation ; WI 10.1, 11.2, isthme blanc 18h-post-ovulation ; RI 4.1, RI 6.1, isthme rouge 3h-post-ovulation ; R.I.10.3, 11.2, isthme rouge 18h-post-ovulation ; Ut 1.1, Ut 3.1, utérus 3h-post-ovulation ; Ut 10.1, Ut 11.1, utérus 18h-post-ovulation ; L4.2, L6.2, foie 3h-post-ovulation,; L10.2, L11.1, foie 18h-post-ovulation.

L'échantillon identifié H_2O correspond à un témoin négatif des conditions de transcription inverse et de PCR : il comportait tous les réactifs pour cette étape à l'exception d'ARN extraits, remplacés par de l'eau ultrapure, et a subi strictement les mêmes conditions de réaction.

Les puits de bordure étaient chargés d'un marqueur de taille pour ADN dont les plus basses valeurs sont indiquées en paires de bases (pb).

Les bandes de forte intensité vers 200 pb correspondent aux produits de PCR attendus (167 pb). Les bandes de très faible intensité en deçà de 100 pb correspondent vraisemblablement à des dimères ou associations des amorces utilisées, ce qui explique leur présence dans le contrôle négatif (H_2O ultrapure).

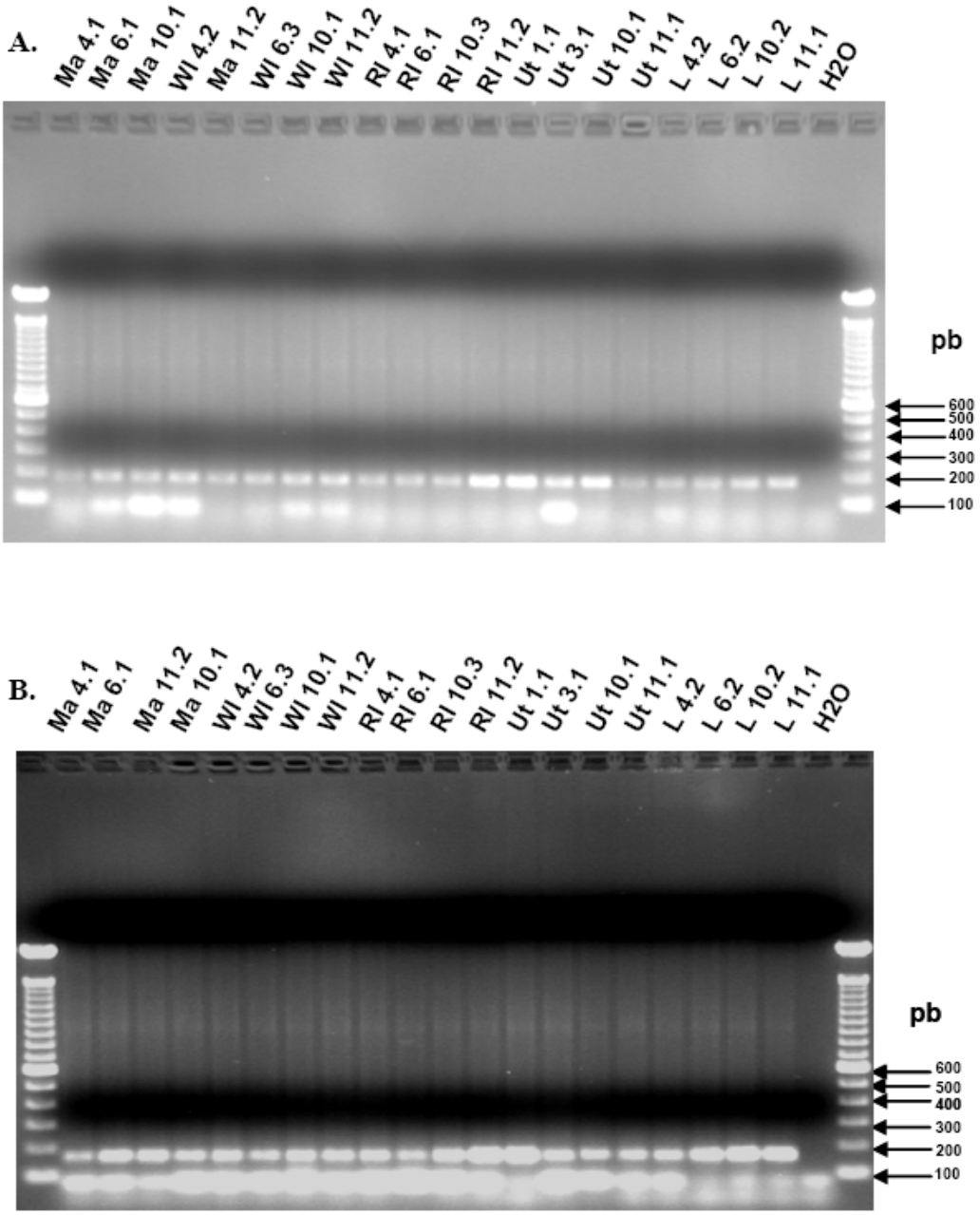


Figure III.9 : Analyse de l'expression de la cystatine de poulet par RT-PCR (gel d'agarose 1 %). A. : couple d'amorces F1/B1 ; **B.** : couple d'amorces F2/B2.
Ma 4.1, 6.1, magnum 3h-post-ovulation ; Ma 11.2, 10.1, magnum 18h-post-ovulation ; WI 4.2, 6.3, isthme blanc 3h-post-ovulation ; WI 10.1, 11.2, isthme blanc 18h-post-ovulation ; RI 4.1, RI 6.1, isthme rouge 3h-post-ovulation ; R.I.10.3, 11.2, isthme rouge 18h-post-ovulation ; Ut 1.1, Ut 3.1, utérus 3h-post-ovulation ; Ut 10.1, Ut 11.1, utérus 18h-post-ovulation ; L4.2, L6.2, foie 3h-post-ovulation ; L10.2, L11.1, foie 18h-post-ovulation. L'échantillon identifié H_2O correspond au témoin de conditions de transcription inverse et de PCR.
Les puits en bordure sont chargés d'un marqueur de taille pour ADN dont les plus basses valeurs sont indiquées en paires de bases (pb).

Tous les produits de PCR issus d'ARN extraits montrent l'amplification, donc la présence, d'une même séquence d'ADN complémentaire d'ARN 18S. La forte intensité de cette bande pour les 20 échantillons témoigne d'une bonne qualité des produits de transcription inverse, soit un déroulement correct et homogène de cette étape. On pourra donc interpréter librement les autres PCR.

III.2.2 Etude de l'expression de la cystatine

Que l'on considère l'un ou l'autre couple d'amorces (pour leurs différences, voir II.6.3), un fragment d'environ 200 pb est amplifié dans tous les échantillons de produits de PCR, d'intensité relativement homogène (Fig. III.9). Cela correspond à la taille de l'amplicon attendu (173 pb pour le couple F1/B1, 160 pb pour le couple F2/B2). Les bandes plus basses à moins de 100 pb correspondent vraisemblablement à des assemblages d'amorces, puisqu'on les retrouve dans l'échantillon témoin (H_2O ultrapure).

On peut donc affirmer que, dans nos conditions de PCR en point final, l'expression transcriptionnelle de la cystatine est ubiquitaire dans les tissus de l'oviducte et le foie de poule, avec des intensités d'expression semblant relativement proches d'un tissu à l'autre.
On ne note pas de différence d'intensité significative entre les deux stades auxquels les tissus ont été prélevés. On ne peut donc conclure sur les données temporelles de synthèse de cette protéine au cours de la formation de l'œuf.
La PCR n'ayant été menée que de façon semi-quantitative (PCR en point final), on ne peut aller plus avant dans cette comparaison des intensités.

III.2.3 Etude de l'expression de l'ovomucoïde

Les produits de PCR des deux couples d'amorces montrent ici encore des résultats concordants. Les échantillons correspondants au magnum et à l'isthme blanc présentent une bande de forte intensité d'environ 200 pb, correspondant aux amplicons attendus, respectivement 160 et 172 pb (Fig. III.10). Les échantillons rattachés à l'isthme rouge (à l'exception de l'échantillon RI 4.1) et à l'utérus présentent une expression plus faible de l'ovomucoïde (signal non saturant). Enfin, les échantillons de foie ne montrent pas de façon nette la bande d'amplicon, ce qui va en faveur d'une absence d'expression de l'ovomucoïde dans le foie de poule. Une telle affirmation impliquerait une spécificité de présence de l'ovomucoïde dans le blanc d'oeuf et non pas dans le jaune, puisque la majorité des constituants de ce compartiment de l'œuf sont synthétisés par le foie.
Les bandes visibles à moins de 100 pb sur les deux gels ci-contre (Figure III.10.A et B) correspondent vraisemblablement aux polymères d'amorces.
Dans nos conditions de contrôle de PCR en point final, il n'apparaît pas d'effet significatif du stade de prélèvement des tissus sur la quantité d'ARN messagers présents dans les cellules. L'échantillon RI 4.1 ne peut être pris en considération sur ce point puisqu'on ne retrouve pas cette forte intensité pour l'autre échantillon prélevé au même stade sur une autre poule (RI 6.1). Peut-être cette variation est-elle d'ordre interindividuel.
On relève donc trois niveaux d'expression transcriptionnelle différents, qui restent à préciser par PCR quantitative.

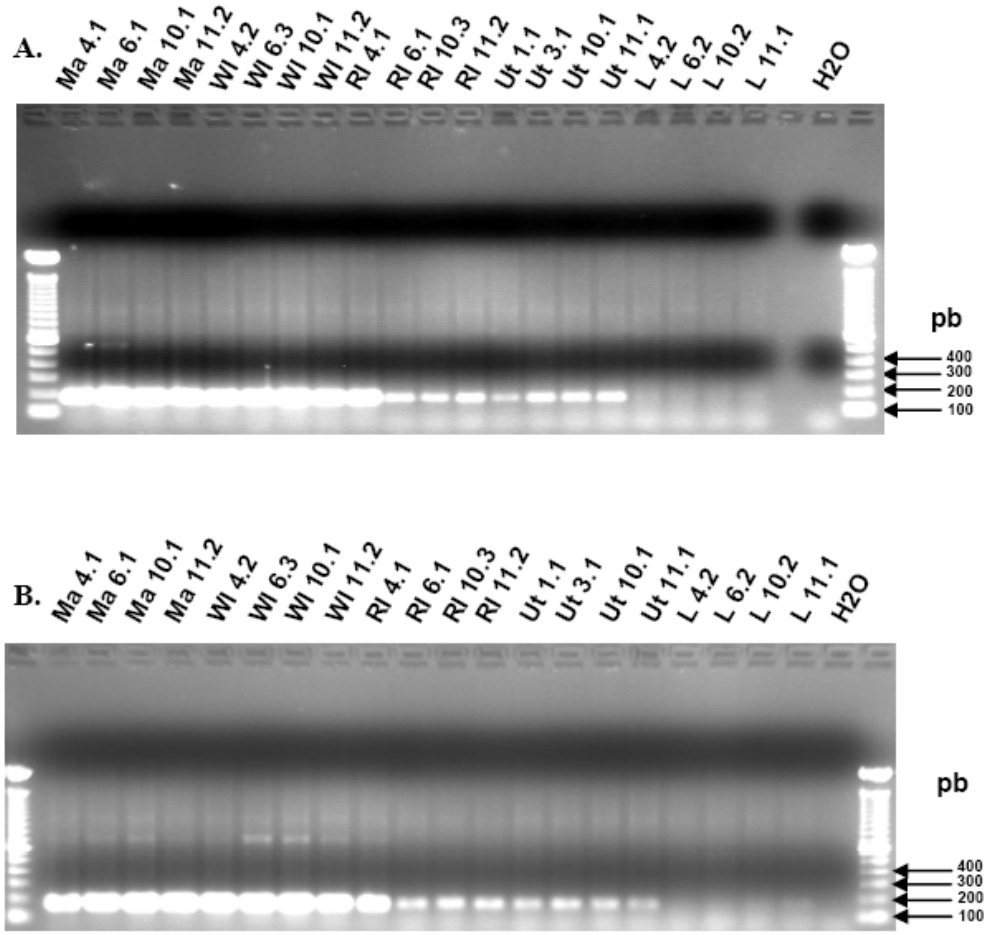


Figure III.10 : Analyse de l'expression de l'ovomucoïde de poulet par RT-PCR (gel d'agarose 1 %). A. : couple d'amorces F1/B1 ; **B.** : couple d'amorces F2/B2

Ma 4.1, 6.1, magnum 3h-post-ovulation ; Ma 11.2, 10.1, magnum 18h-post-ovulation ; WI 4.2, 6.3, isthme blanc 3h-post-ovulation ; WI 10.1, 11.2, isthme blanc 18h-post-ovulation ; RI 4.1, RI 6.1, isthme rouge 3h-post-ovulation ; R.I.10.3, 11.2, isthme rouge 18h-post-ovulation ; Ut 1.1, Ut 3.1, utérus 3h-post-ovulation ; Ut 10.1, Ut 11.1, utérus 18h-post-ovulation ; L4.2, L6.2, foie 3h-post-ovulation,; L10.2, L11.1, foie 18h-post-ovulation.

En **A.**, un puits a été laissé vide entre l'échantillon L 11.1 et le témoin H_2O de conditions de RT et de PCR.

Des marqueurs de taille ont été déposés en bordure de gel, les valeurs des bandes de plus petites tailles sont indiquées en paires de bases (pb).

III.2.4 Etude de l'expression de l'ovoinhibiteur

A l'exception des puits WI 11.2 et RI 4.1 dont le signal de fluorescence apparaît légèrement plus faible, tous les échantillons montrent, pour les deux couples d'amorces testés, une bande intense de taille correspondant à celle des amplicons attendus (soit 119 et 142 pb, respectivement), outre la faible bande de polymères d'amorces (Fig. III.11).
Ces résultats vont dans le sens d'une expression transcriptionnelle ubiquitaire de l'ovoinhibiteur, sans modification qualitativement notable de la synthèse d'ARN messagers du stade 3h-post-ovulation au stade 18h-post-ovulation. Ils restent toutefois à confirmer par une étude en temps réel.

III.3. Caractérisation du potentiel antisalmonellique des antiprotéases du blanc d'œuf

On cherche à étudier l'effet des antiprotéases du blanc d'oeuf sur une population de *Salmonella enterica* Enteritidis. Les antiprotéases sont supposées agir indirectement sur la prolifération bactérienne par inhibition des protéases bactériennes qui participent au pouvoir invasif des pathogènes par dégradation des protéines de l'œuf. Cependant le rôle de l'activité antiprotéasique sur l'inhibition de la prolifération des pathogènes reste à démontrer. En outre, les antiprotéases pourraient avoir un rôle antimicrobien indépendant de leurs propriétés antiprotéasiques.
Afin de tester en première approche l'effet des antiprotéases du blanc d'œuf par des expériences simples réalisables avant la fin de ce stage, nous avons d'abord étudié l'action des antiprotéases commerciales seules par des tests de diffusion radiale, en vue de tester ensuite les fractions purifiées par nous-mêmes (voir III.1).

Les tests de diffusion radiale reposent sur l'application, sur un milieu nutritif en boîte de Pétri, ensemencé préalablement par la souche bactérienne visée, de disques imbibés de la solution à tester. La diffusion du produit du disque de papier buvard au milieu environnant permet l'expression d'un éventuel effet de la substance sur la prolifération (voire la viabilité) de la population bactérienne.

Des concentrations élevées du milieu de croissance bactérienne en chlorure de sodium peuvent diminuer la sensibilité des bactéries à la substance testée pour son potentiel inhibiteur de prolifération bactérienne (Turner *et al.*, 1998). C'est pourquoi nous avons comparé, dans cette étude, les résultats obtenus sur deux types de milieux d'agar LB : un milieu préparé à 170 mM de NaCl et un milieu préparé à 50 mM de NaCl.

III.3.1 Choix du témoin positif par antibiogramme

Six antibiotiques différents ont été comparés sur les milieux LB agar à 170 mM et 50 mM de chlorure de sodium, afin d'utiliser le témoin positif le plus approprié à nos plans d'expérience, en terme de diamètre de la zone d'inhibition.
Le tableau ci-dessous justifie le choix de la rifampicine par son petit diamètre d'inhibition sur les deux milieux.

On notera que l'ampicilline est ici un contrôle de l'antibiogramme puisque la souche de *S.* Enteritidis LA 5 utilisée était connue comme sensible à cet antibiotique.

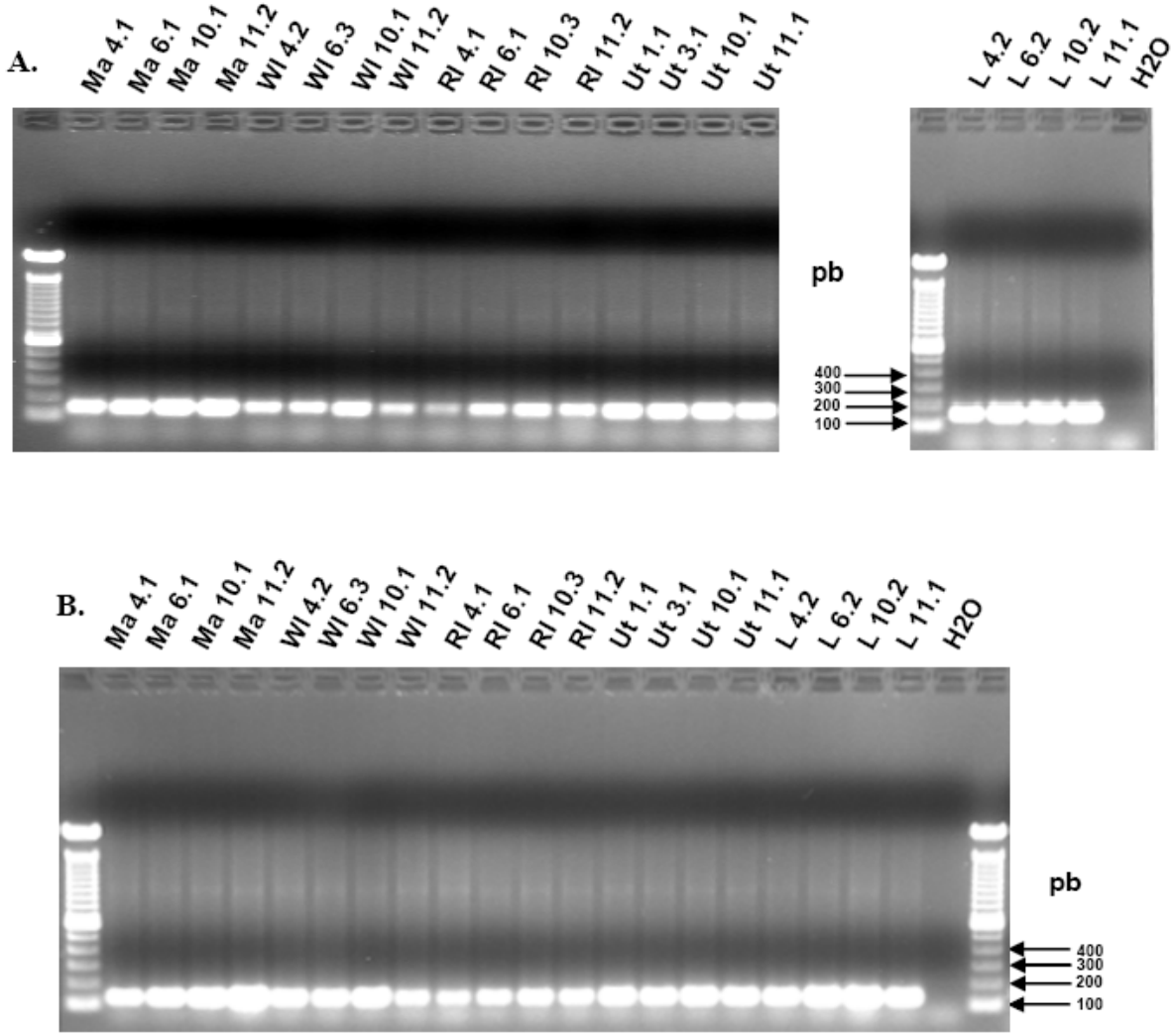


Figure III.11 : Analyse de l'expression de l'ovoinhibiteur de poulet par RT-PCR (gel d'agarose 1 %). A. : couple d'amorces F1/B1 ; **B.** : couple d'amorces F2/B2

Ma 4.1, 6.1, magnum 3h-post-ovulation ; Ma 11.2, 10.1, magnum 18h-post-ovulation ; WI 4.2, 6.3, isthme blanc 3h-post-ovulation ; WI 10.1, 11.2, isthme blanc 18h-post-ovulation ; RI 4.1, RI 6.1, isthme rouge 3h-post-ovulation ; R.I.10.3, 11.2, isthme rouge 18h-post-ovulation ; Ut 1.1, Ut 3.1, utérus 3h-post-ovulation ; Ut 10.1, Ut 11.1, utérus 18h-post-ovulation ; L4.2, L6.2, foie 3h-post-ovulation ; L10.2, L11.1, foie 18h-post-ovulation.

En **A.**, les produits de PCR des échantillons de foie (L 4.2 à L 11.1) ainsi que le témoin H2O ont été déposés sur un autre gel pour des questions de praticité mais ont migré dans les mêmes conditions. Des marqueurs de taille ont déposés en bordure de gel, les valeurs des bandes de plus petites tailles sont indiquées en paires de bases (pb).

Tableau III.4 : Résultats de l'antibiogramme

Antibiotique	Quantité par disque (µg)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
		Milieu LB agar, NaCl 170 mM	Milieu LB agar, NaCl 50 mM
Ampicilline	10	20	22
Chloramphénicol	30	25	26
Rifampicine	30	7	8,5
Spectinomycine	100	26,5	28
Streptomycine	500	30	32
Tétracycline	30 *U.I.*	19	18

III.3.2 Tests de diffusion radiale pour l'étude des activités antimicrobiennes des antiprotéases commerciales

L'antibiotique de contrôle ayant été choisi, le potentiel inhibiteur de prolifération de différentes protéines du blanc d'œuf a été testé sur *S. enterica* Enteritidis suivant le mode opératoire indiqué en II.7. A l'exception des disques de rifampicine, aucune zone d'inhibition de la souche n'apparaît autour des protéines testées, tant en ce qui concerne les antiprotéases que les contrôles positifs. Cette absence d'effet sur la prolifération bactérienne est relevée sur les deux types de milieux : LB agar à 170 mM de chlorure de sodium et LB agar à 50 mM. Par la présence sur toutes les boîtes de zones d'inhibition de 13 à 14 mm de diamètre, le témoin antibiotique garantit des conditions d'expression bactérienne de sensibilité. Il est alors étonnant que l'ovotransferrine, dont le potentiel antibactérien a été démontré (Baron *et al.*, 1997), ne présente pas ici d'effet visible sur la souche.

On peut s'interroger sur la méthode employée : les disques imprégnés durant la manipulation étaient d'un diamètre plus important que celui de l'antibiotique commercial ; la quantité de protéines apportées (40 µL à 100 mM soit 4 nmol) était-elle alors trop faible pour une diffusion du produit sur le milieu à une concentration supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI) ? L'étape de séchage des disques sur une journée a-t-elle compromis l'activité des protéines déposées ? Afin de répondre à ces questions et dans l'attente d'autres protocoles, on peut d'ores et déjà tester l'effet de la rifampicine apportée sous forme liquide sur un disque vierge (et non pas sur un disque pré-imbibé commercial comme utilisé lors de cette première manipulation). Ceci permettrait de conclure sur le mode opératoire adopté et de le modifier en conséquence. On pourrait également envisager de recourir à des solutions protéiques plus concentrées, afin d'atteindre éventuellement les CMI respectives de chaque protéine. Quoiqu'il en soit, il sera essentiel d'améliorer les tests sur les témoins positifs et sur les antiprotéases commerciales avant de tester le potentiel inhibiteur de nos fractions purifiées sur protéase-sépharose.

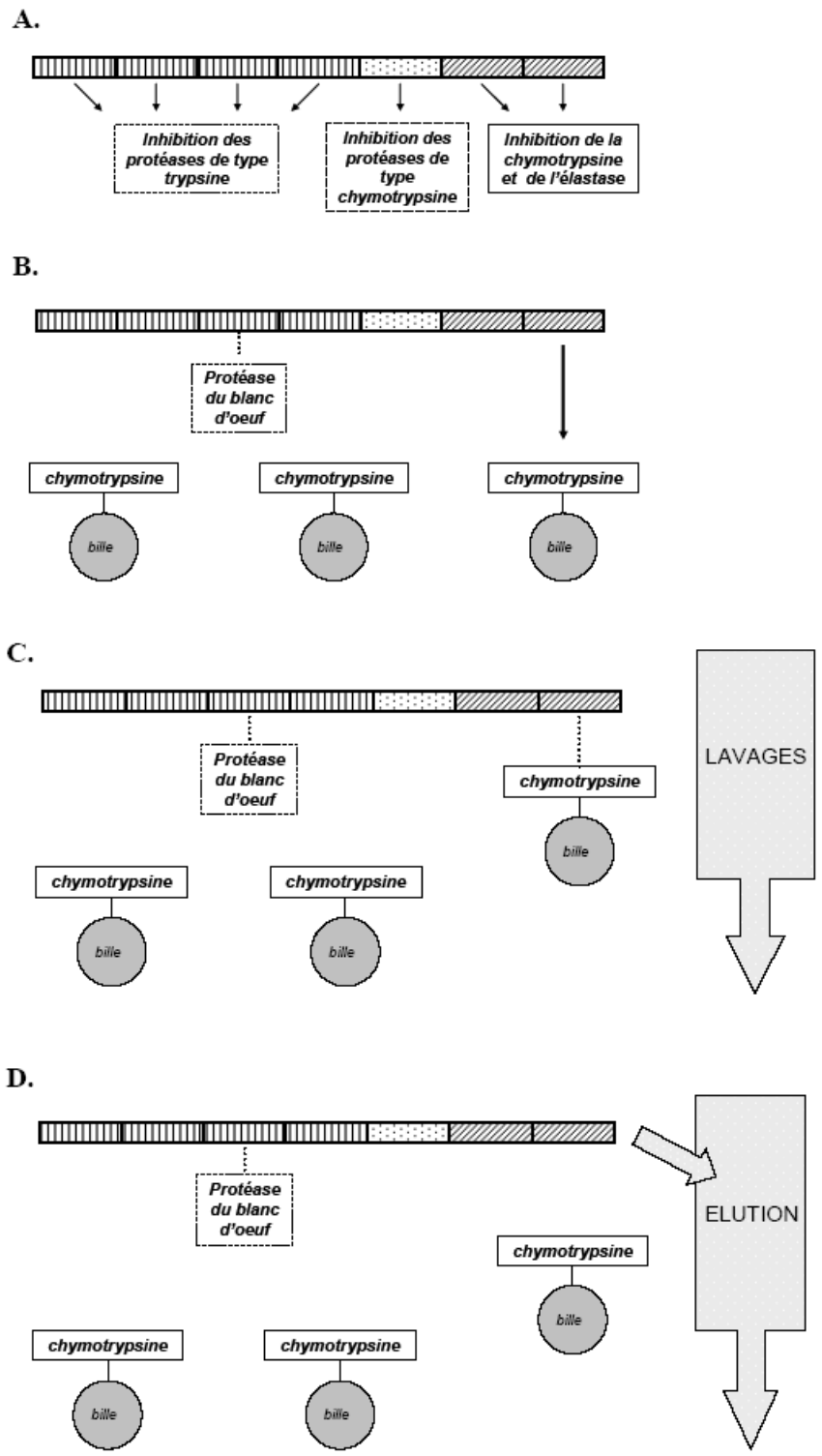


Figure IV.1 : Schéma illustrant l'hypothèse de complexe protéase(s)-antiprotéase multidomaine dans le blanc d'œuf, par l'exemple de l'ovoinhibiteur et d'une protéase endogène de spécificité enzymatique de type trypsine.
A. Spécificité des sept domaines Kazal de l'ovoinhibiteur. **B.** Incubation du blanc d'œuf avec des billes chymotrypsine-sépharose. **C.** Complexe ovoinhibiteur-protéase endogène retenu par la colonne de chromatographie. **D.** Elution de l'ovoinhibiteur et de la protéase.

Conclusion

Les purifications du blanc d'œuf menées, au cours de ce stage, par chromatographies d'affinité sur chymotrypsine-, trypsine- et papaïne-sépharose, ont permis d'isoler et de purifier partiellement des antiprotéases, parmi d'autres protéines de l'albumen. Les tests d'inhibition de protéases pratiqués ensuite sur les fractions d'élution ont mis en évidence la conservation du potentiel inhibiteur de ces antiprotéases. La présence d'antiprotéases dans les fractions d'élution a été confirmée par spectrométrie de masse : on a ainsi identifié l'ovoinhibiteur, la cystatine, l'ovomucoïde et l'ovostatine, antiprotéases connues du blanc d'œuf, parmi d'autres protéines qu'il reste à analyser. Ces résultats valident donc la stratégie de purification adoptée ; cette technique pourra être exploitée au sein du laboratoire pour la purification et l'identification d'antiprotéases à partir d'autres extraits de l'œuf tels que la coquille ou le jaune d'oeuf.

Cependant, si des antiprotéases du blanc d'œuf ont pu être purifiées partiellement par cette technique, il est apparu que nos fractions d'élutions présentaient également une activité protéasique : des tests cinétiques, effectués à des concentrations en fraction trypsine-sépharose et chymotrypsine-sépharose supérieures à celles expérimentées ici (données non publiées), ont en effet montré une hydrolyse basale du substrat en leur présence et ce, en absence de tout ajout de protéases exogènes. Ceci pousse à envisager la présence de protéases dans nos fractions pré-purifiées supposées ne contenir que des antiprotéases.

L'hypothèse que nous avons émise dans un premier temps est que ces protéases pourraient provenir des chromatographies de type protéase-sépharose ayant servi à la purification. En effet, l'élution des protéines fixées ayant été réalisée dans des conditions drastiques (pH 2 ou 11) on peut imaginer que les protéases couplées à la matrice de sépharose (la trypsine et la chymotrypsine) aient pu se décrocher des billes et se retrouver dans les fractions d'élutions. Pour tenter de répondre à cette question, nous avons analysé les fractions trypsine-sépharose et chymotrypsine-sépharose en zymographie en gel de gélatine. Nous avons pu mettre en évidence la présence de protéases capables d'hydrolyser la gélatine. Cependant, le poids moléculaire apparent de ces protéases s'avère différent de celui de la trypsine ou de la chymotrypsine, ce qui infirme l'hypothèse initiale.
Une autre explication pourrait être donnée sur la base de la structure - même des antiprotéases étudiées. Quelques antiprotéases, telles que l'ovoinhibiteur et l'ovomucoïde du blanc d'œuf, sont capables d'inhiber différentes protéases grâce à plusieurs domaines inhibiteurs spécifiques et indépendants; on parle ainsi d'inhibiteurs multidomaines. Ces domaines présentent un mécanisme d'action commun aux domaines dits de type Kazal ; il s'agit de séquences consensus comportant six cystéines conservées et impliquées dans des ponts disulfures. Une liaison peptidique (site réactif), à la surface du domaine inhibiteur, peut interagir spécifiquement avec le site actif de la protéase, et donner lieu, par son clivage, à la formation du complexe protéase-antiprotéase entière.

On peut ainsi supposer la présence, dans le blanc d'œuf brut, d'une ou de plusieurs protéases initialement complexées à une antiprotéase multidomaine (ovoinhibiteur ou ovomucoïde), affine pour les billes de protéase-sépharose (chymotrypsine-sépharose ou trypsine-sépharose respectivement) et capable de s'y fixer par ses domaines restés libres ; le complexe protéase(s)-inhibiteur aurait ainsi été retenu par la colonne de chromatographie avant d'être détaché et collecté, sous forme complexée ou non, dans les fractions d'élution (Figure IV.1). La migration électrophorétique en présence de SDS achèvera de séparer la (les) protéase(s) de l'antiprotéase multidomaine.

Le contraste entre les gels SDS-PAGE réalisés en conditions réductrices ou non pourrait être un argument en faveur de cette présence, dans les fractions chymotrypsine- et trypsine-sépharose, de protéases d'origine endogène. En effet, on a pu constater la multiplication, en passant à des conditions réductrices, du nombre de bandes séparées, sans qu'aucune d'elle ne migre au poids moléculaire apparent relevé en conditions non réductrices (voir Fig. III.2 et III.3). On sait que les conditions réductrices contribuent à la linéarisation des protéines par rupture des ponts disulfures qui les maintenaient dans leur conformation native. Or, les trois antiprotéases connues et visées dans cette étude comportent plusieurs de ces ponts : ils sont au nombre de 21 pour l'ovoinhibiteur, 9 pour l'ovomucoïde (et 2 pour la cystatine, mais son profil n'est pas modifié en conditions réductrices). Le fait que la rupture de ces ponts donne lieu, non pas à une seule bande de protéine linéaire, mais à plusieurs bandes de poids moléculaires plus faibles, suggère que les antiprotéases ont été clivées auparavant par des protéases. Il pourrait s'agir de clivage par des protéases présentes initialement dans le blanc d'œuf, comme proposé ci-dessus, ou de clivage par les protéases trypsine ou chymotrypsine couplées aux billes de sépharose. On ne pourra trancher pour l'une ou l'autre de ces explications que par une identification par spectrométrie de masse des protéases visualisées par zymographie, ou par un séquençage de chaque fragment protéique séparé sur SDS-PAGE en conditions réductrices : la comparaison de ces fragments avec la protéine entière permettra de localiser les sites de clivage et de les caractériser, d'après les résidus en positions P et P'(voir nomenclature de Schechter et Berger, Annexe 1), comme étant de type chymotrypsine, trypsine (clivage effectué par l'assemblage de chromatographie) ou autre (clivage effectué par une protéase de spécificité différente de celle de la trypsine ou de la chymotrypsine).

On notera bien que l'hypothèse de protéases présentes initialement dans le blanc d'oeuf n'est pas applicable au problème soulevé lors de l'identification par spectrométrie de masse : des bandes s'avéraient visibles en bleu de Coomassie, mais leurs fragments protéiques n'ont été rapportés, par les bases de données, qu'à la trypsine bovine (voir III.1.2). Quant à l'hypothèse, évoquée plus haut, d'un décrochement des molécules de trypsine bovine couplées à la sépharose, elle n'est pas envisageable pour les mêmes raisons données alors : on ne visualise pas, dans les fractions d'élution analysées sur les gels de zymographie, de protéines de poids moléculaire apparent correspondant à celui de la trypsine (qui est capable de dégrader la gélatine). La détection de la trypsine bovine dans les échantillons analysés par spectrométrie de masse provient donc vraisemblablement de la trypsine bovine utilisée pour la digestion avant analyse par spectrométrie. Cette conclusion est confirmée par la dernière analyse en sepctrométrie de masse utilisant l'endoprotéase Glu-C. En effet, aucun fragment de trypsine bovine n'a été relevé parmi tous les fragments générés, alors que la Glu-C a bien été identifiée.

Le changement de spécificité de l'enzyme de digestion (endoprotéase Glu-C ou V8 coupant en carboxy-terminal des résidus glutamate) n'a pas porté les fruits attendus en ce qui concerne les bandes de protéines non encore identifiées par spectrométrie de masse. On pourrait envisager de recourir encore à d'autres endoprotéases (l'élastase bovine, la thermolysine à haute température - (Bark *et al.*, 2001), ou la pepsine), bien que ces enzymes risquent elles aussi d'être inhibées par certaines antiprotéases du blanc d'œuf. Mais on peut encore songer à utiliser un autre mode de digestion, tel que le clivage chimique ; celui-ci peut être effectué par bromure de cyanogène (clivage en carboxy-terminal des résidus méthionine, relativement abondants dans nos antiprotéases), par acide formique (clivage en carboxy-terminal des résidus aspartyl en présence de proline, acide aminé plus rare – (Li *et al.*, 2001)), par hydrazine à haute température (Abakori *et al.*, 1952, cité par Miyatake *et al.*, 1994) ou par hydrolyse acide en phase vapeur en présence d'acide pentafluoropropionique (PFPA) (clivage

en carboxy- et amino-terminal des résidus Aspartate, Sérine, Thréonine et Glycine, *(Gobom et al.*, 1999)) ; on notera cependant que cette dernière technique effectue différents clivages et aboutit donc à des spectres relativement complexes.

La technique de purification d'antiprotéases par chromatographie d'affinité reste valide mais doit être poussée plus avant, afin d'isoler chacun de ses constituants. Ceci permettra à terme de réaliser des tests d'activité inhibitrice propres à chaque protéine, et de caractériser individuellement leur potentiel antibactérien. On espère ainsi mieux connaître la fonction physiologique de telles antiprotéases dans le blanc d'œuf de poule.
Dans cette perspective, une première stratégie a été envisagée : l'électroélution (extraction par migration électrophorétique) de la bande de gel SDS-PAGE correspondant au poids moléculaire attendu de chaque antiprotéase recherchée. Cette technique présente néanmoins l'inconvénient non négligeable de charger l'échantillon final en SDS, présent dans le tampon de migration. Or ce détergent anionique risque d'interférer fortement avec les tests d'activité inhibitrice ou les tests antimicrobiens que l'on cherche à réaliser par la suite. La concentration de l'échantillon par lyophilisation n'a pas permis pas d'éliminer ces sels dénaturants, malgré des dialyses extensives ; et le passage de l'échantillon sur colonne de dessalage (PD-10) nous a fait perdre la protéine voulue. A l'avenir, nous envisageons donc davantage de poursuivre la purification par chromatographie liquide haute performance sur colonne de type DEAE, anionique (échangeuse d'ions).

D'autre part, nous avons réalisé une étude de l'expression transcriptionnelle des gènes des antiprotéases du blanc d'œuf ; cette étude devait initialement s'appliquer aux antiprotéases nouvellement identifiées grâce à la stratégie de purification, et ainsi permettre une première appréhension, très globale, des différences d'expression entre tissus. Aucune antiprotéase jusqu'ici inconnue n'ayant été trouvée, l'étude n'a porté que sur les trois antiprotéases de référence (ovoinhibiteur, ovomucoïde et cystatine) dont l'expression est déjà caractérisée. Cependant, notre étude apporte des précisions quant aux régions de l'oviducte impliquées dans cette expression ; nous avons notamment pu révéler que l'expression de l'ovomucoïde était majoritaire dans les tissus tels que le magnum ou l'isthme blanc, très faible dans l'isthme rouge et l'utérus, et inexistante dans le foie.
Cette étude a, par ailleurs, confirmé les connaissances déjà acquises sur les gènes d'ovoinhibiteur, d'ovomucoïde et de cystatine. Il serait néanmoins plus intéressant d'affiner l'étude de l'expression transcriptionnelle des gènes des trois antiprotéases (et antiprotéases nouvellement identifiées) en réalisant une PCR en temps réel. Cette approche permettra, en effet, de comparer quantitativement les niveaux d'expression et de détecter plus finement les éventuelles différences entre tissus de l'oviducte, ou entre les deux stades.

Ce type d'étude pourra également être élargi à d'autres tissus, notamment ceux où ces antiprotéases ont été identifiées : bourse de Fabricius, poumons, cœur, cerveau, tissus du tractus digestif, afin de caractériser la spécificité d'expression de ces trois gènes.

Nous avons enfin pu initier, au cours de ce stage, l'étude du potentiel antimicrobien d'antiprotéases du blanc d'œuf de source commerciale vis-à-vis du pathogène *Salmonella enterica* Enteritidis, en utilisant une souche LA 5 en milieu LB agar. Les premières manipulations n'ayant pas permis de mettre en évidence ce potentiel, le protocole utilisé (imbibition de disques vierges) est à modifier.

Il faudra ensuite vérifier la reproduction d'un même effet sur l'agent pathogène avec les fractions purifiées supposées antiprotéasiques. Néanmoins l'interprétation d'un éventuel effet

des fractions sera plus complexe encore que pour les antiprotéases commerciales. En effet, nous avons évoqué plus haut la présence inopportune de protéases dans les fractions purifiées. Le potentiel antibactérien des fractions, s'il est avéré, pourra donc être portée au crédit des antiprotéases ou des protéases de la fraction, sans qu'il soit alors possible de trancher sur le responsable majeur. Il sera donc essentiel de mettre au point un protocole permettant de distinguer ces deux effets ; on peut notamment penser à l'usage, au cours des tests, d'inhibiteurs spécifiques des protéases présentes dans la fraction, une fois que celles-ci auront été identifiées avec certitude par les moyens proposés plus haut.

Références bibliographiques

Anastasi, A., Brown, M.A., Kembhavi, A.A., Nicklin, M.J., Sayers, C.A., Sunter, D.C., and Barrett, A.J. (1983) Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. Improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum. *Biochem J* **211**: 129-138.

Axén, R., Porath, J., and Ernback, S. (1967) Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature* **214**: 1302-1304.

Bark, S.J., Muster, N., Yates, J.R., and Siuzdak, G. (2001) High-temperature protein mass mapping using a thermophilic protease. *Journal of the American Chemical Society* **123**: 1774-1775.

Baron, F., Gautier, M., and Brule, G. (1997) Factors involved in the inhibition of growth of Salmonella enteritidis in liquid egg white. *J. Food. Prot* **60**: 1318-1323.

Benarafa, C., and Remold-O'Donnell, E. (2005) The ovalbumin serpins revisited: perspective from the chicken genome of clade B serpin evolution in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11367-11372.

Birk, Y., Khalef, S., and Jibson, M.D. (1983) Purification and properties of protease F, a bacterial enzyme with chymotrypsin and elastase specificities. *Arch Biochem Biophys* **225**: 451-457.

Bjorck, L. (1990) Proteinase inhibition, immunoglobulin-binding proteins and a novel antimicrobial principle. *Mol Microbiol* **4**: 1439-1442.

Bjork, I., and Ylinenjarvi, K. (1990) Interaction between chicken cystatin and the cysteine proteinases actinidin, chymopapain A, and ficin. *Biochemistry* **29**: 1770-1776.

Blankenvoorde, M.F., Henskens, Y.M., van't Hof, W., Veerman, E.C., and Nieuw Amerongen, A.V. (1996) Inhibition of the growth and cysteine proteinase activity of Porphyromonas gingivalis by human salivary cystatin S and chicken cystatin. *Biol Chem* **377**: 847-850.

Blankenvoorde, M.F., van't Hof, W., Walgreen-Weterings, E., van Steenbergen, T.J., Brand, H.S., Veerman, E.C., and Nieuw Amerongen, A.V. (1998) Cystatin and cystatin-derived peptides have antibacterial activity against the pathogen Porphyromonas gingivalis. *Biol Chem* **379**: 1371-1375.

Bosgiraud, C., and AEMIP (2003) Microbiologie générale et santé - Association des Enseignants de Microbiologie et d'Immunologie des Facultés de Pharmacie. *Editions ESKA*: 304.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159.

Colella, R., and Bird, J.W. (1993) Isolation and characterization of the chicken cystatin-encoding gene: mapping transcription start point and polyadenylation sites. *Gene* **130**: 175-181.

Colella, R., Sakaguchi, Y., Nagase, H., and Bird, J.W. (1989) Chicken egg white cystatin. Molecular cloning, nucleotide sequence, and tissue distribution. *J Biol Chem* **264**: 17164-17169.

Compere, S.J., McKnight, G.S., and Palmiter, R.D. (1981) Androgens regulate ovomucoid and ovalbumin gene expression independently of estrogen. *J Biol Chem* **256**: 6341-6347.

Davis, J.G., Zahnley, J.C., and Donovan, J.W. (1969) Separation and characterization of the ovoinhibitors from chicken egg white. *Biochemistry* **8**: 2044-2053.

Davis, J.G., Mapes, C.J., and Donovan, J.W. (1971) Batch purification of ovomucoid and characterization of the purified product. *Biochemistry* **10**: 39-42.

Delmas, G., Le Querrec, F., Weill, F.-X., Gallay, A., Espié, E., Haerghebaert, S., and Vaillant, V. (2004) Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001-2003. *Rapport InVS, DGAL, Centre National de Référence Salmonella « Maladies d'origine alimentaire, Surveillance nationale des maladies infectieuses, 2001-2003 »*.

Dougherty, W.G., and Semler, B.L. (1993) Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiol Rev* **57**: 781-822.

Ebina, T., and Tsukada, K. (1991) Protease inhibitors prevent the development of human rotavirus-induced diarrhea in suckling mice. *Microbiol Immunol* **35**: 583-588.

Feeney, R.E., Stevens, F.C., and Osuga, D.T. (1963) The specificities of chicken ovomucoid and ovoinhibitor. *J Biol Chem* **238**: 1415-1418.

Feinstein, G., and Gertler, A. (1973) Isolation of alkaline proteinases from Aspergillus oryzae by one-step affinity chromatography on ovoinhibitor-sepharose column. *Biochim Biophys Acta* **309**: 196-202.

Fossum, K., and Whitaker, J.R. (1968) Ficin and papain inhibitor from chicken egg white. *Arch Biochem Biophys* **125**: 367-375.

Fredericq, E., and Deutsch, H.F. (1949) Studies on ovomucoid. *J Biol Chem* **181**: 499-510.

Gautron, J. (1994) Minéralisation de la coquille de l'oeuf dans l'utérus : mise en évidence du rôle de la matière organique. *Mémoire d'ingénieur C.N.A.M. en biochimie industrielle et agro-alimentaire*.

Gerhartz, B., Engh, R.A., Mentele, R., Eckerskorn, C., Torquato, R., Wittmann, J. et al. (1997) Quail cystatin: isolation and characterisation of a new member of the cystatin family and its hypothetical interaction with cathepsin B. *FEBS Lett* **412**: 551-558.

Gobom, J., Mirgorodskaya, E., Nordhoff, E., Hojrup, P., and Roepstorff, P. (1999) Use of vapor-phase acid hydrolysis for mass spectrometric peptide mapping and protein identification. *Anal Chem* **71**: 919-927.
Haynes, R., and Feeney, R.E. (1967) Fractionation and properties of trypsin and chymotrypsin inhibitors from lima beans. *J Biol Chem* **242**: 5378-5385.
Huang, K., Lu, W., Anderson, S., Laskowski, M., Jr., and James, M.N. (1995) Water molecules participate in proteinase-inhibitor interactions: crystal structures of Leu18, Ala18, and Gly18 variants of turkey ovomucoid inhibitor third domain complexed with Streptomyces griseus proteinase B. *Protein Sci* **4**: 1985-1997.
Kato, I., Schrode, J., Kohr, W.J., and Laskowski, M., Jr. (1987) Chicken ovomucoid: determination of its amino acid sequence, determination of the trypsin reactive site, and preparation of all three of its domains. *Biochemistry* **26**: 193-201.
Korant, B., Towatari, T., Kelley, M., Brzin, J., Lenarcic, B., and Turk, V. (1988) Interactions between a viral protease and cystatins. *Biol Chem Hoppe Seyler* **369 Suppl**: 281-286.
Korant, B.D., Brzin, J., and Turk, V. (1985) Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteases alters viral protein cleavages in infected human cells. *Biochem Biophys Res Commun* **127**: 1072-1076.
Laber, B., Krieglstein, K., Henschen, A., Kos, J., Turk, V., Huber, R., and Bode, W. (1989) The cysteine proteinase inhibitor chicken cystatin is a phosphoprotein. *FEBS Lett* **248**: 162-168.
Li, A., Sowder, R.C., Henderson, L.E., Moore, S.P., Garfinkel, D.J., and Fisher, R.J. (2001) Chemical cleavage at aspartyl residues for protein identification. *Anal Chem* **73**: 5395-5402.
Lindahl, P., Alriksson, E., Jornvall, H., and Bjork, I. (1988) Interaction of the cysteine proteinase inhibitor chicken cystatin with papain. *Biochemistry* **27**: 5074-5082.
Lineweaver, H., and Murray, C.H. (1947) Identification of the trypsin inhibitor of egg white with ovomucoid. *J Biol Chem* **171**: 565-581.
Matrosovich, M., Zhou, N., Kawaoka, Y., and Webster, R. (1999) The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol* **73**: 1146-1155.
Melamed, M.D. (1967) Electrophoretic properties of ovomucoid. *Biochem J* **103**: 805-810.
Miyake, M., Utsuno, E., and Noda, M. (2000) Binding of avian ovomucoid to shiga-like toxin type 1 and its utilization for receptor analog affinity chromatography. *Anal Biochem* **281**: 202-208.
Miyatake, N., Satake, K., Kamo, M., and Tsugita, A. (1994) Specific Chemical Cleavage of Asparaginyl and Glycyl-Glycine Bonds in Peptides and Proteins by Anhydrous Hydrazine Vapor. *Journal of Biochemistry* **115**: 208-212.
Moore, R.W., Hargis, B.M., Porter, T.E., Caldwell, D.Y., Oubre, C.M., Vandesande, F., and Berghman, L.R. (2004) Ovoinhibitor in the chicken bursa of Fabricius: identification, isolation, and localization. *Cell Tissue Res* **317**: 247-251.
Moreau, T. (1999) Inhibiteurs protéiques et zymogènes : les deux armes essentielles du contrôle de la protéolyse. *Regard sur la Biochimie* **4**: 43-59.
Nys, Y., and Sauveur, B. (2004) Valeur nutritionnelle des oeufs. *Prod. Anim.* **17**: 385-393.
Palmiter, R.D. (1972a) Regulation of protein synthesis in chick oviduct. I. Independent regulation of ovalbumin, conalbumin, ovomucoid, and lysozyme induction. *J Biol Chem* **247**: 6450-6461.
Palmiter, R.D. (1972b) Regulation of protein synthesis in chick oviduct. II. Modulation of polypeptide elongation and initiation rates by estrogen and progesterone. *J Biol Chem* **247**: 6770-6780.
Read, R.J., Fujinaga, M., Sielecki, A.R., and James, M.N. (1983) Structure of the complex of Streptomyces griseus protease B and the third domain of the turkey ovomucoid inhibitor at 1.8-A resolution. *Biochemistry* **22**: 4420-4433.
Rhodes, M., Bennett, N., and Feeney, R.E. (1960) The trypsin and chymotrypsin inhibitors from avian egg whites. *J. Biol. Chem* **235**: 1686-1693.
Sauveur, B. (1988) Reproduction des volailles et production d'oeufs. *Collection INRA.*
Saxena, I., and Tayyab, S. (1997) Protein proteinase inhibitors from avian egg whites. *Cell Mol Life Sci* **53**: 13-23.
Schechter, I., and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **27**: 157-162.
Scott, M.J., Huckaby, C.S., Kato, I., Kohr, W.J., Laskowski, M., Jr., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1987) Ovoinhibitor introns specify functional domains as in the related and linked ovomucoid gene. *J Biol Chem* **262**: 5899-5907.
Thapon, J., and Bourgeois, C. (1994) L'Oeuf et les Ovoproduits. *Collection Sciences et Techniques Agro-alimentaires*.
Tsuge, Y., Shimoyamada, M., and Watanabe, K. (1996) Binding of egg white proteins to viruses. *Biosci Biotechnol Biochem* **60**: 1503-1504.
Turk, V., Brzin, J., Longer, M., Ritonja, A., Eropkin, M., Borchart, U., and Machleidt, W. (1983) Protein inhibitors of cysteine proteinases. III. Amino-acid sequence of cystatin from chicken egg white. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **364**: 1487-1496.

Turner, J., Cho, Y., Dinh, N.N., Waring, A.J., and Lehrer, R.I. (1998) Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 2206-2214.
Yolken, R.H., Willoughby, R., Wee, S.B., Miskuff, R., and Vonderfecht, S. (1987) Sialic acid glycoproteins inhibit in vitro and in vivo replication of rotaviruses. *J Clin Invest* **79**: 148-154.
Zhu, Y., Wang, M., Lin, H., Li, Z., and Luo, J. (2001) Identification of estrogen-responsive genes in chick liver. *Cell Tissue Res* **305**: 357-363.

Directive 1999/74/CE du Conseil de l'Union Européenne du 19 juillet 1999 établissant les normes minimales relatives à la protection des poules pondeuses. *Journal officiel n° L 203 du 03/08/1999 p. 0053 – 0057*

Sites internet :

http://www.bio.espci.fr
http://www.invs.sante.fr
http://www.itavi.asso.fr
http://www.tours.inra.fr

Annexes

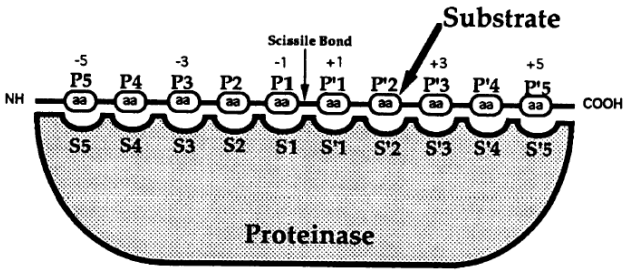


FIG. 1. Schematic representation of a proteinase and substrate. The nomenclature of Schechter and Berger (301) is used. A peptide substrate is presented at the top of the figure and is composed of 10 amino acids (aa). The peptide bond to be cleaved is indicated. Amino acids on the N-terminal side of the scissile bond are labeled P1 through P5; amino acids on the C-terminal side of the scissile bond are labeled P′1 through P′5. Individual domains (S and S′) of the proteinase which collectively make up the substrate-binding pocket are presented. S1 through S5 bind the P1 through P5 amino acids of the substrate, and S′1 through S′5 bind P′1 through P′5 of the substrate. Substrate specificity is determined by the complexity of the substrate-binding pocket and may consist of only S1 or may be quite complex as depicted in the figure, interacting with a number of substrate amino acids.

Annexe 1 : Schéma illustrant l'interaction entre un substrat peptidique et une protéase, selon la nomenclature de Schechter et Berger (Dougherty and Semler, 1993).

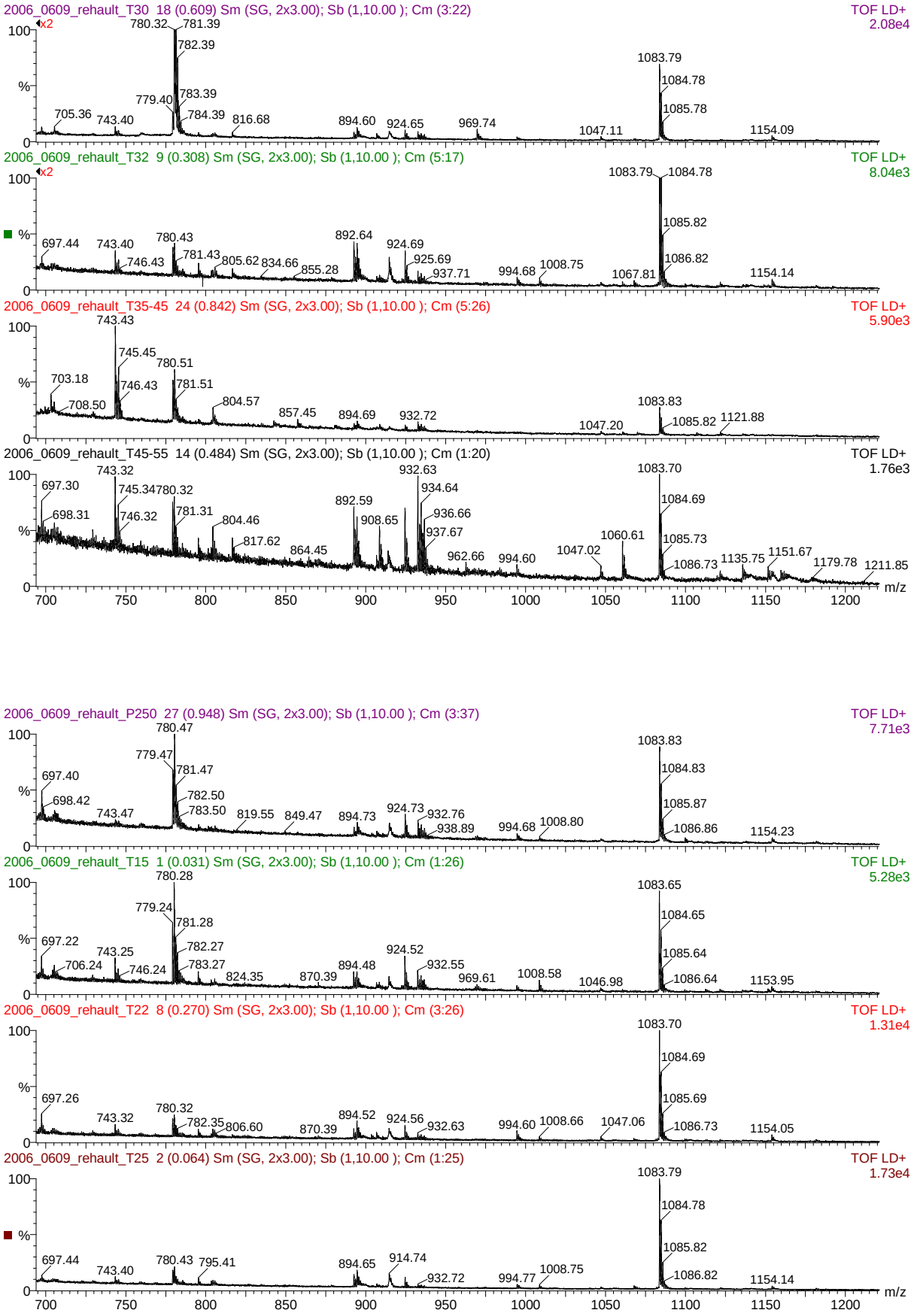
Le substrat peptidique est représenté en haut du schéma; ses résidus situés en amino-terminal du site de clivage (scissile bond) sont notés P1 à Pn et interagissent avec les résidus ou sous-sites S1 à Sn du site actif de la protéase; les résidus du substrat situés en carboxy-terminal de ce site sont identifiés P'1 à P'n et correspondent aux sous-sites S'1 à S'n de la protéase.

Nom	Code à 1 lettre	Code à 3 lettres
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Aspartate	D	Asp
Cystéine	C	Cys
Glutamate	E	Glu
Glutamine	Q	Gln
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
Tryptophane	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Va

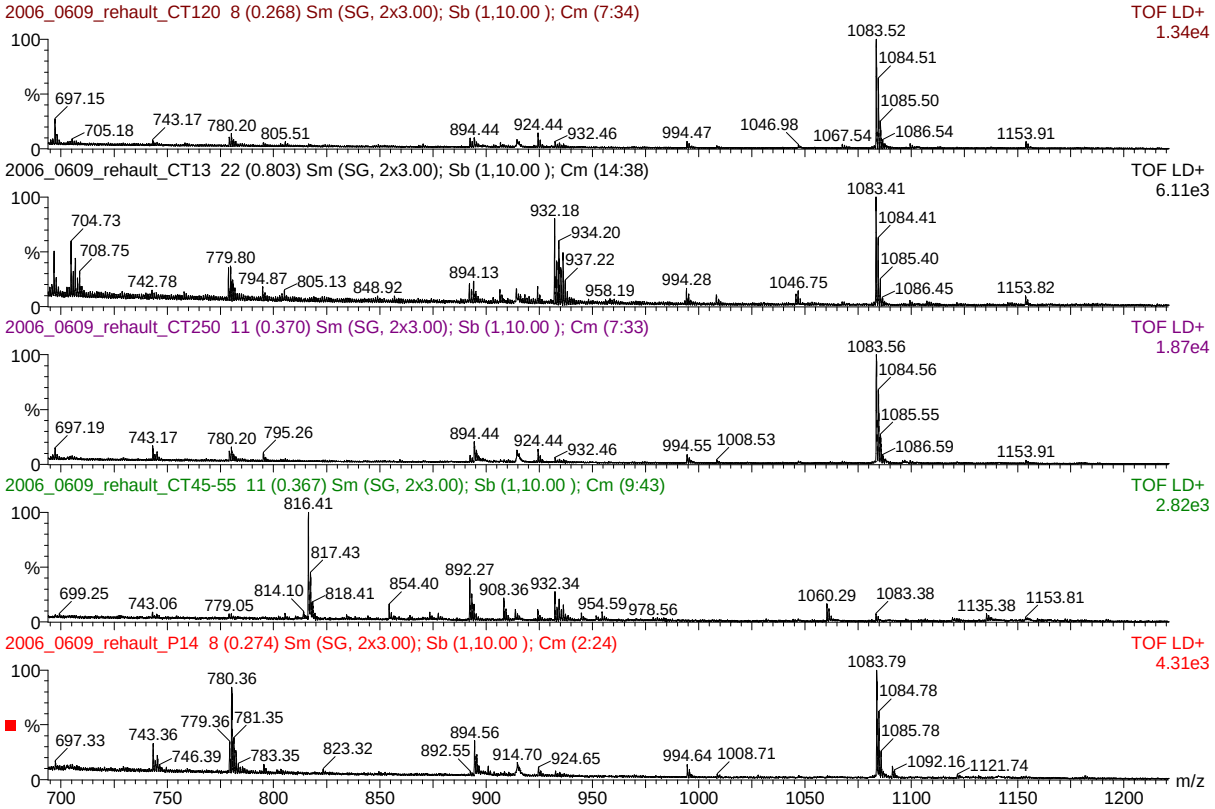
Annexe 2 : Nomenclature des acides aminés naturels

Nom	Nom Fichier	N°accession NCBI	Nom protéine	PM théo	score	Nbre peptides	% couverture	Séquences
P14	2006_0509_REHAULT_P14_Q1181	gi|45382805	cystatin C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage) [Gallus gallus]	15277	127	3	20	R.ALQFAMAEYNR.A R.ALQFAMAEYNR.A+Oxidation (M) R.LLGAPVPVDENDEGLQR.A
T30	2006_0509_REHAULT_T30_Q1177		rien					
CT50/55	Pas de pkl		rien					
P250	Pas de pkl		rien					
CT250	Pas de pkl		rien					
CT120	2006_0509_REHAULT_CT120_Q1173		rien					
CT13	2006_0509_REHAULT_CT13_Q1171	gi|67408	lysozyme (EC 3.2.1.17) c precursor	16156	73	1	10	R.NTDGSTDYGILQINSR.W
T45-55	2006_0509_REHAULT_CT45-55_Q1172	gi|71895337	similar to ovoinhibitor precursor [validated] - chicken [Gallus gallus]	51885	412	10	33	R.CREEVPELDCSKYK.T + 2 Carbamidomethyl (C) R.QEIPEIDCDQYPTRK.T + Carbamidomethyl (C) K.CRQEIPEIDCDQYPTR.K + 2 Carbamidomethyl (C) K.LEIGSVDCSKYPSTVSKDGR.T + Carbamidomethyl (C) K.CRQEIPEIDCDQYPTRK.T + 2 Carbamidomethyl (C) K.VSPICTMEYVPHCGSDGVTYSNR.C + 2 Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) R.NLKPVCGTDGSTYSNECGICLYNR.E + 3 Carbamidomethyl (C) R.ILSPVCGTDGFTYDNECGICAHNAEQR.T + 3 Carbamidomethyl (C) R.ILLPVCGTDGFTYDNECGICAHNAQHGTEVK.K + 3 Carbamidomethyl (C) R.ILLPVCGTDGFTYDNECGICAHNAQHGTEVKK.S + 3 Carbamidomethyl (C)
T35-45	2006_0509_REHAULT_T35-45_Q1179		rien					
T32	2006_0509_REHAULT_T32_Q1178		rien					
T22	Pas de pkl		rien					
T15	2006_0509_REHAULT_T15_Q1183		rien					

Annexe 3 : Tableau de résultats de la première analyse par spectromètre tandem Q-TOF



Annexe 4 : Spectrogrammes de l'analyse par MALDI-TOF menée en confirmation de la première analyse Q-TOF



Annexe 4-bis : Suite des Spectrogrammes de l'analyse par MALDI-TOF menée en confirmation de la première analyse Q-TOF

CT12	SR1		Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
		1	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				6,45E+01	30,20	18,50	25408,4	P00760	3 (3 0 0 0 0)	
			4939	K.LQGIVSWGSGC*AQK.N	1490,74	2	3,98E+01	2,30	0,51	262,0	1	10/26	
			5111	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	2,89E+01	1,93	0,36	266,8	3	11/20	
			5445	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	6,45E+01	3,95	0,47	718,3	1	21/38	
		2	IOV7_CHICK (P10184) Ovoinhibitor precursor				3,84E+01	20,11	7,80	51885,2	P10184	2 (2 0 0 0 0)	
			3898	R.C*REEVPELDC*SKYK.T	1812,83	3	1,34E+01	2,11	0,20	181,8	25	13/52	
			5151	K.VSPIC*TMEYVPHC*GSDGVTYSNR.C	2629,15	3	3,84E+01	1,37	0,36	53,3	1	11/88	
CT14	SR2		Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
		1	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				7,29E+01	40,24	24,70	25408,4	P00760	4 (4 0 0 0 0)	
			4798	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	3,39E+01	2,27	0,28	315,2	4	12/20	
			5208	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	7,29E+01	4,74	0,44	979,2	1	22/38	
			5244	K.VC*NYVSWIK.Q	1168,58	2	3,90E+01	1,85	0,32	535,3	1	11/16	2
			5572	K.SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK.L	2273,16	2	4,08E+01	2,58	0,35	431,3	1	18/38	
		2	IOV7_CHICK (P10184) Ovoinhibitor precursor				7,14E+01	40,19	9,50	51885,2	P10184	4 (4 0 0 0 0)	
			4396	R.TLNLVSM#AAC*	1095,52	2	1,95E+01	1,86	0,50	204,9	1	10/18	
			4540	K.VSPIC*TM#EYVPHC*GSDGVTYSNR.C	2645,14	3	7,14E+01	1,86	0,47	113,9	1	16/88	
			4806	R.C*FFC*NAYVQSNR.T	1565,66	2	3,46E+01	3,72	0,43	855,2	1	15/22	
			5040	K.VSPIC*TMEYVPHC*GSDGVTYSNR.C	2629,15	3	4,51E+01	1,37	0,32	89,9	1	14/88	
CT16	SR3		Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
		1	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				1,07E+02	36,18	21,80	25408,4	P00760	4 (3 0 1 0 0)	
			4354	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	2,24E+01	2,00	0,33	267,9	3	11/20	
			5640	K.SIVHPSYNSNTLNNDIMLIKLK.S	2514,34	3	1,07E+02	3,63	0,42	584,3	1	29/84	
			5758	K.SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK.L	2273,16	3	2,28E+01	1,92	0,03	249,8	41	18/76	
			6282	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	2,96E+01	2,11	0,37	126,9	4	10/38	
		2	IOV7_CHICK (P10184) Ovoinhibitor precursor				5,64E+01	20,08	7,00	51885,2	P10184	2 (2 0 0 0 0)	
			4226	R.TLNLVSM#AAC*	1095,52	2	1,45E+01	1,31	0,34	115,9	1	8/18	
			4858	K.VSPIC*TMEYVPHC*GSDGVTYSNR.C	2629,15	3	5,64E+01	1,70	0,39	176,6	1	19/88	
CT18	SR4		Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
		1	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				8,52E+01	40,20	26,70	25408,4	P00760	4 (4 0 0 0 0)	
			4519 - 4521	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	2,87E+01	1,92	0,30	207,2	6	11/20	
			4551	K.LQGIVSWGSGC*AQK.N	1490,74	2	2,17E+01	1,30	0,27	79,7	1	5/26	
			4965	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	8,52E+01	4,09	0,44	842,0	1	22/38	
			5315	K.SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK.L	2273,16	2	4,55E+01	2,30	0,40	190,6	1	14/38	
		2	IOV7_CHICK (P10184) Ovoinhibitor precursor				3,87E+01	40,15	9,50	51885,2	P10184	4 (4 0 0 0 0)	
			4177	R.TLNLVSM#AAC*	1095,52	2	1,74E+01	1,31	0,33	99,6	2	7/18	
			4259	K.VSPIC*TM#EYVPHC*GSDGVTYSNR.C	2645,14	3	3,83E+01	0,69	0,10	26,2	44	9/88	
			4553	R.C*FFC*NAYVQSNR.T	1565,66	2	3,87E+01	3,07	0,42	676,0	1	13/22	
			4759	K.VSPIC*TMEYVPHC*GSDGVTYSNR.C	2629,15	3	3,05E+01	1,58	0,45	67,2	1	11/88	
CT20	SR5		Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
		1	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				6,73E+01	40,21	24,70	25408,4	P00760	4 (4 0 0 0 0)	
			4148	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	3,53E+01	1,65	0,41	205,4	3	11/20	
			4898	K.VC*NYVSWIK.Q	1168,58	2	2,09E+01	1,71	0,20	427,7	1	10/16	2
			4948	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	6,73E+01	3,18	0,38	430,4	2	17/38	
			5060	K.SIVHPSYNSNTLNNDIM#LIK.L	2289,15	3	4,27E+00	2,61	0,13	656,5	1	28/76	
CT30/35	SR6		Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
		1	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				5,72E+01	20,20	16,50	25408,4	P00760	2 (2 0 0 0 0)	
			4070	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	5,72E+01	4,05	0,34	695,3	1	19/38	
			4560	K.SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK.L	2273,16	2	5,02E+01	2,40	0,46	216,7	1	15/38	
		2	IOV7_CHICK (P10184) Ovoinhibitor precursor				4,22E+01	30,13	9,10	51885,2	P10184	3 (3 0 0 0 0)	
			3298	K.C*RQEIPEIDC*DQYPTR.K	2079,92	3	4,22E+01	2,54	0,38	408,5	1	19/60	
			3418	R.QEIPEIDC*DQYPTR.K	1763,79	2	3,80E+01	2,23	0,37	379,1	1	13/26	
			4336	R.ILSPVC*GTDGFTYDNECGICAHNAEQR.T	2970,28	3	8,68E+00	1,18	0,09	51,7	5	10/104	
CT37/45	SR7		Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
		1	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				8,16E+01	50,16	27,60	25408,4	P00760	5 (5 0 0 0 0)	
			3728	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	1,08E+01	1,32	0,23	77,6	31	6/20	
			4332 - 4334	K.LQGIVSWGSGC*AQK.N	1490,74	2	8,16E+01	3,27	0,64	773,7	1	17/26	
			5210	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	5,72E+01	3,28	0,51	424,6	1	16/38	
			5358	K.SIVHPSYNSNTLNNDIMLIKLK.S	2514,34	3	6,01E+01	1,66	0,42	114,6	2	15/84	
			6170	K.SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK.L	2273,16	3	2,00E+01	2,35	0,12	207,1	24	17/76	
		2	IOV7_CHICK (P10184) Ovoinhibitor precursor				4,14E+01	34,14	12,10	51885,2	P10184	4 (3 0 0 1 0)	
			3496	R.C*REEVPELDC*SKYK.T	1812,83	3	2,08E+01	2,85	0,35	351,3	9	18/52	
			3986	K.C*RQEIPEIDC*DQYPTR.K	2079,92	3	1,41E+01	1,49	0,19	101,4	8	10/60	
			4062	R.QEIPEIDC*DQYPTR.K	1763,79	2	4,14E+01	2,23	0,36	363,7	1	12/26	
			4610	R.ILSPVC*GTDGFTYDNEC*GIC*AHNAEQR.T	3084,32	3	4,08E+01	1,14	0,16	78,9	2	13/104	

Annexe 5 : Tableau de résultats de la deuxième phase d'analyse (spectromètre tandem *ion trap*)

			Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
CT50	SR8	1	IOV7_CHICK (P10184) Ovoinhibitor precursor				4,63E+01	30,20	6,60	51885,2	P10184	3 (3 0 0 0 0)	
			3146	R.C*REEVPELDC*SKYK.T	1812,83	3	3,02E+01	3,71	0,29	798,3	1	23/52	
			3436	K.C*RQEIPEIDC*DQYPTRK.T	2208,02	3	4,63E+01	3,91	0,39	1302,3	1	28/64	
			3774	R.QEIPEIDC*DQYPTR.K	1763,79	2	2,78E+01	2,00	0,41	294,5	1	12/26	
			Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
T12	SR9	1	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				1,08E+02	50,16	27,60	25408,4	P00760	6 (4 0 1 1 0)	
			2738	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	3,20E+01	2,03	0,42	214,8	18	11/20	
			3304	K.LQGIVSWGSGC*AQK.N	1490,74	2	5,98E+01	3,25	0,55	490,8	1	14/26	
			3836 - 3838	K.SIVHPSYNSNTLNNDIM#LIK.L	2289,15	3	3,13E+00	2,66	0,09	297,2	20	21/76	
			4236	K.SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK.L	2273,16	3	5,06E+00	1,96	0,15	472,6	9	22/76	
			4316	K.SIVHPSYNSNTLNNDIMLIKLK.S	2514,34	3	1,08E+02	3,17	0,40	304,1	1	22/84	
			5750	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	1,84E+01	1,76	0,22	82,9	14	7/38	
		2	IOV7_CHICK (P10184) Ovoinhibitor precursor				3,59E+01	20,11	5,10	51885,2	P10184	2 (2 0 0 0 0)	
			2546	K.DGTSWVAC*PR.N	1148,52	2	1,80E+01	2,15	0,33	763,4	2	11/18	
			2998	R.QEIPEIDC*DQYPTR.K	1763,79	2	3,59E+01	2,19	0,38	294,7	1	11/26	
			Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
T12b	SR10	1	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				4,88E+01	30,20	16,50	25408,4	P00760	3 (3 0 0 0 0)	
			4968 - 4970	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	3,28E+01	1,85	0,41	238,4	14	10/20	
			5440	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	4,88E+01	2,76	0,44	276,1	3	13/38	
			5444	K.VC*NYVSWIK.Q	1168,58	2	3,61E+01	1,96	0,29	528,8	1	11/16	2
			Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
T14	SR11	1	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				6,03E+01	30,15	18,50	25408,4	P00760	3 (3 0 0 0 0)	
			4332	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	3,53E+01	1,74	0,39	246,5	2	11/20	
			4537	K.LQGIVSWGSGC*AQK.N	1490,74	2	6,03E+01	2,93	0,59	452,7	1	13/26	
			5007	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	5,57E+01	2,74	0,46	298,0	2	13/38	
			Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
T14b	SR12	1	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				6,47E+01	38,17	26,70	25408,4	P00760	4 (3 1 0 0 0)	
			5238	K.LQGIVSWGSGC*AQK.N	1490,74	2	6,47E+01	3,22	0,55	622,3	1	15/26	
			5511	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	2,69E+01	1,57	0,35	154,9	19	9/20	
			5671	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	4,44E+01	3,35	0,36	364,8	3	15/38	
			5991	K.SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK.L	2273,16	3	9,42E+00	2,31	0,11	523,5	5	22/76	
			Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
T17	SR13	1	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				6,24E+01	30,24	18,50	25408,4	P00760	14 (14 0 0 0 0)	
			4278	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	1,15E+01	1,88	0,11	465,5	1	13/20	
			4581	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	3,19E+01	2,26	0,35	372,1	1	13/20	
			4663	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	2,99E+01	2,23	0,33	314,2	2	12/20	
			4748	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	3,23E+01	1,98	0,41	291,5	2	12/20	
			4839	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	3,21E+01	1,69	0,41	248,6	4	11/20	
			4929	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	3,16E+01	1,86	0,40	289,4	3	12/20	
			4947	K.LQGIVSWGSGC*AQK.N	1490,74	2	4,34E+01	2,94	0,58	462,8	1	13/26	
			5019	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	3,39E+01	1,73	0,31	219,2	2	11/20	
			5260	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	3,57E+01	1,39	0,29	199,6	5	10/20	
			5324	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	3	6,24E+01	4,79	0,35	2616,8	1	37/76	
			5396	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	5,50E+01	2,93	0,48	333,2	2	14/38	
			5478	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	2,86E+01	1,71	0,33	133,8	25	9/20	
			5482	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	1,61E+01	1,64	0,17	79,6	14	7/38	
			5600	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	3,78E+01	1,48	0,25	94,6	41	8/20	
		2	IOV7_CHICK (P10184) Ovoinhibitor precursor				3,05E+01	10,08	3,00	51885,2	P10184	1 (1 0 0 0 0)	
			4633	R.QEIPEIDC*DQYPTR.K	1763,79	2	3,05E+01	1,51	0,37	135,1	1	8/26	
			Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
T20/26	SR14	1	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				4,54E+01	54,14	27,60	25408,4	P00760	6 (4 1 1 0 0)	
			3753	K.SIVHPSYNSNTLNNDIMLIKLK.S	2514,34	3	1,09E+01	1,75	0,25	131,2	21	14/84	
			4329	K.LQGIVSWGSGC*AQK.N	1490,74	2	3,99E+01	2,77	0,54	349,6	1	12/26	
			4387	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	2,73E+01	1,87	0,35	205,7	3	11/20	
			5301	K.SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK.L	2273,16	3	1,72E+01	2,20	0,03	383,1	22	20/76	
			5365 - 5367	K.SIVHPSYNSNTLNNDIM#LIK.L	2289,15	3	8,39E+00	1,45	0,01	93,5	22	13/76	
			5929	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	4,54E+01	2,59	0,47	244,2	2	13/38	
			Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
T27/37	SR15	1	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				6,85E+01	46,23	26,70	25408,4	P00760	5 (4 0 1 0 0)	
			2885	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	2,11E+01	1,96	0,12	404,3	2	13/20	
			3367	K.LQGIVSWGSGC*AQK.N	1490,74	2	6,85E+01	4,09	0,61	1689,9	1	22/26	
			3901	K.SIVHPSYNSNTLNNDIM#LIK.L	2289,15	2	2,00E+01	3,14	0,21	498,3	1	21/38	
			4107	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	6,20E+01	4,63	0,58	882,6	1	22/38	
			4259	K.SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK.L	2273,16	2	4,90E+01	2,12	0,41	184,8	1	14/38	

Annexe 5-bis : Suite du tableau résultats de la deuxième phase d'analyse (spectromètre *ion trap*)

CT>300	SR16		Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
		1	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				6,47E+01	30,24	18,50	25408,4	P00760	3 (3 0 0 0 0)	
			2782	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	2,80E+01	2,10	0,34	254,5	3	12/20	
			2840	K.LQGIVSWGSGC*AQK.N	1490,74	2	3,76E+01	2,52	0,55	313,0	1	11/26	
			3194	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	6,47E+01	4,83	0,48	786,7	1	20/38	
		2	OVOS_CHICK (P20740) Ovostatin precursor (Ovomacroglobulin)				3,92E+01	20,14	1,40	166247,9	P20740	2 (2 0 0 0 0)	
			2652	K.TIGYLVSGYQK.Q	1228,66	2	3,92E+01	2,81	0,50	544,7	1	13/20	
			2790	R.ALLVEPEGIR.R	1096,64	2	1,70E+01	1,93	0,35	410,7	2	9/18	
T20/26b	SR17		Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
		1	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				9,60E+01	30,18	21,80	25408,4	P00760	3 (3 0 0 0 0)	
			3039	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	2,74E+01	2,24	0,27	242,0	24	11/20	
			4229	K.SIVHPSYNSNTLNNDIMLIKLK.S	2514,34	3	9,60E+01	3,50	0,41	512,4	1	27/84	
			5635	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	3,01E+01	2,17	0,34	141,1	4	10/38	
P22	SR18		Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
		1	CYT_CHICK (P01038) Cystatin precursor (Egg-white cystatin)				9,53E+01	20,15	20,10	15276,8	P01038	2 (2 0 0 0 0)	
			4826	R.ALQFAM#AEYNR.A	1329,63	2	6,03E+01	2,43	0,53	655,5	1	12/20	
			4870	R.LLGAPVPVDENDEGLQR.A	1821,93	2	9,53E+01	3,02	0,36	612,1	1	21/32	
		2	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				6,39E+01	30,17	21,00	25408,4	P00760	3 (3 0 0 0 0)	
			4614	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	2,43E+01	2,26	0,28	300,8	4	12/20	
			5296	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	3	4,16E+01	3,44	0,28	781,4	1	24/76	
			5494 - 5496	K.SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK.L	2273,16	2	6,39E+01	1,70	0,24	158,5	1	14/38	
T17b	SR19		Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
		1	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				5,37E+01	40,19	26,70	25408,4	P00760	4 (4 0 0 0 0)	
			4398	K.LQGIVSWGSGC*AQK.N	1490,74	2	1,59E+01	1,56	0,36	106,2	1	6/26	
			4610	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	2,81E+01	1,93	0,32	259,8	5	11/20	
			4796	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	5,37E+01	3,78	0,46	746,0	1	21/38	
			4906	K.SIVHPSYNSNTLNNDIM#LIK.L	2289,15	2	1,41E+01	1,74	0,05	73,4	8	10/38	
Possible contamination de P22		2	CYT_CHICK (P01038) Cystatin precursor (Egg-white cystatin)				3,76E+01	10,05	12,20	15276,8	P01038	1 (1 0 0 0 0)	
			4380	R.LLGAPVPVDENDEGLQR.A	1821,93	2	3,76E+01	1,04	0,17	46,8	16	6/32	
		3	IOV7_CHICK (P10184) Ovoinhibitor precursor				3,34E+01	20,11	9,30	51885,2	P10184	2 (2 0 0 0 0)	
			3645	K.C*RQEIPEIDC*DQYPTRK.T	2208,02	3	3,34E+01	2,25	0,26	127,8	7	12/64	
			4594	R.ILSPVC*GTDGFTYDNEC*GIC*AHNAEQR.T	3084,32	3	3,30E+01	1,04	0,16	60,2	11	11/104	
T27/37b	SR20		Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
		1	IOVO_PTEPE (P67943) Ovomucoid (Fragment)				4,48E+01	8,11	40,70	5847,6	P67943	1 (0 1 0 0 0)	
			4965 - 4967	K.C*DFC*NAVVESNGTLTLSHFGKC*	2516,10	3	4,48E+01	2,24	0,32	524,4	1	23/84	1
		2	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				3,89E+01	30,11	18,50	25408,4	P00760	3 (3 0 0 0 0)	
			4141	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	2,64E+01	2,18	0,29	304,1	4	12/20	
			4273	K.LQGIVSWGSGC*AQK.N	1490,74	2	3,89E+01	1,98	0,55	182,1	1	8/26	
			5989	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	2,10E+01	2,08	0,32	120,9	6	9/38	
P14	SR21		Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
		1	CYT_CHICK (P01038) Cystatin precursor (Egg-white cystatin)				9,96E+01	60,19	34,50	15276,8	P01038	6 (6 0 0 0 0)	
			3133	K.SSGDLQSC*EFHDEPEM#AK.Y	2082,84	3	1,96E+01	2,03	0,21	295,3	1	16/68	
			3471	K.SSGDLQSC*EFHDEPEMAK.Y	2066,84	3	1,44E+01	1,23	0,02	79,8	37	8/68	
			4433	R.SRLLGAPVPVDENDEGLQR.A	2065,07	3	5,06E+01	2,55	0,50	369,9	1	22/72	
			4577	R.ALQFAMAEYNR.A	1313,63	2	4,59E+01	2,36	0,47	717,5	1	12/20	
			4961	R.ALQFAM#AEYNR.A	1329,63	2	5,82E+01	3,08	0,54	1281,4	1	16/20	
			5121	R.LLGAPVPVDENDEGLQR.A	1821,93	2	9,96E+01	3,12	0,42	492,5	1	19/32	
		2	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				5,36E+01	20,18	12,80	25408,4	P00760	2 (2 0 0 0 0)	
			3889	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	2,87E+01	1,85	0,35	254,6	6	11/20	
			4587	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	5,36E+01	3,61	0,45	556,9	1	19/38	
P30	SR22		Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
		1	CYT_CHICK (P01038) Cystatin precursor (Egg-white cystatin)				5,22E+01	20,09	20,10	15276,8	P01038	2 (2 0 0 0 0)	
			4676	R.ALQFAM#AEYNR.A	1329,63	2	4,46E+01	1,28	0,23	199,5	2	7/20	
			5281	R.LLGAPVPVDENDEGLQR.A	1821,93	2	5,22E+01	1,77	0,41	161,5	1	12/32	
		2	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				5,15E+01	30,14	18,50	25408,4	P00760	3 (3 0 0 0 0)	
			5114	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	3,31E+01	1,67	0,39	223,8	3	11/20	
			5206	K.LQGIVSWGSGC*AQK.N	1490,74	2	5,15E+01	2,74	0,58	365,8	1	12/26	
			5764	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	2,38E+01	1,92	0,29	121,3	6	9/38	
P>300	SR23		Reference				P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)	
			Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	Ions	Count
		1	TRY1_BOVIN (P00760) Cationic trypsin precursor (EC 3.4.21.4) (Beta-trypsin) (Fragment)				4,10E+01	30,14	18,50	25408,4	P00760	3 (3 0 0 0 0)	
			2268	K.SSGTSYPDVLK.C	1153,57	2	2,26E+01	2,53	0,35	350,1	2	12/20	
			2858	K.LQGIVSWGSGC*AQK.N	1490,74	2	2,55E+01	1,59	0,43	133,0	1	7/26	
			3193	R.LGEDNINVVEGNEQFISASK.S	2163,06	2	4,10E+01	2,72	0,47	267,0	3	13/38	

Annexe 5-ter : fin du tableau de résultats de la deuxième phase d'analyse (spectromètre *ion trap*)

Nom	Nom Fichier	N°accession NCBI	Nom protéine	PM théo	score	Nbre peptides	% couverture	Séquences
	SR1		Trypsine					
	SR2	gi|71895337	similar to ovoinhibitor precursor [validated] - chicken [Gallus gallus]	51885	95	2	4	R.TLNLVSMAAC.- + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) R.CFFCNAYVQSNR.T + 2 Carbamidomethyl (C)
	SR3	gi|71895337	similar to ovoinhibitor precursor [validated] - chicken [Gallus gallus]	51885	37	2	6	R.TLNLVSMAAC.- + Carbamidomethyl (C) K.VSPICTMEYVPHCGSDGVTYSNR.C + 2 Carbamidomethyl (C)
	SR4	gi|71895337	similar to ovoinhibitor precursor [validated] - chicken [Gallus gallus]	51885	100	2	4	R.TLNLVSMAAC.- + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) R.CFFCNAYVQSNR.T + 2 Carbamidomethyl (C)
	SR 5		trypsine					
	SR6	gi|71895337	similar to ovoinhibitor precursor [validated] - chicken [Gallus gallus]	51885	316	7	9	K.DGTSWVACPR.N + Carbamidomethyl (C) R.QEIPEIDCDQYPTR.K + Carbamidomethyl (C) K.LEIGSVDCSKYPSTVSK.D + Carbamidomethyl (C) R.QEIPEIDCDQYPTRK.T + Carbamidomethyl (C) K.CRQEIPEIDCDQYPTR.K + 2 Carbamidomethyl (C) K.LEIGSVDCSKYPSTVSKDGR.T + Carbamidomethyl (C) K.CRQEIPEIDCDQYPTRK.T + 2 Carbamidomethyl (C)
	SR7 et SR7b Pkl divisé en 2	gi|71895337	similar to ovoinhibitor precursor [validated] - chicken [Gallus gallus]	51885	109 196	9		R.QEIPEIDCDQYPTR.K + Carbamidomethyl (C) R.CREEVPELDCSKYK.T + 2 Carbamidomethyl (C) R.QEIPEIDCDQYPTRK.T + Carbamidomethyl (C) K.CRQEIPEIDCDQYPTRK.T + 2 Carbamidomethyl (C) K.LEIGSVDCSKYPSTVSK.D + Carbamidomethyl (C) K.LEIGSVDCSKYPSTVSKDGR.T + Carbamidomethyl (C) R.NLKPVCGTDGSTYSNECGICLYNR.E + 3 Carbamidomethyl (C) R.ILSPVCGTDGFTYDNECGICAHNAEQR.T + 3 Carbamidomethyl (C) R.ILLPVCGTDGFTYDNECGICAHNAQHGTEVK.K + 3 Carbamidomethyl (C)
	SR11		trypsine					
	SR 12		trypsine					
	SR 8 à 10, 13 à 19		Problèmes techniques ayant entraînés la perte des données					
	SR 20		trypsine					
	SR 21	gi|45382805	cystatin C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage) [Gallus gallus]	15277	218	5	34	R.ALQFAMAEYNR.A R.ALQFAMAEYNR.A + Oxidation (M) R.LLGAPVPVDENDEGLQR.A R.SRLLGAPVPVDENDEGLQR.A K.SSGDLQSCEFHDEPEMAK.Y + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M)
	SR22	gi|45382467	clusterin [Gallus gallus]	51316	36	1	1	R.TPPFGGFR.E (A confirmer car spectre MSMS avec faible intensité)
	SR 23		trypsine					

Annexe 6 : Tableau de résultats de la deuxième analyse par spectromètre tandem Q-TOF

Nom	Nom Fichier	N°accession NCBI	Nom protéine	PM théo	score	Nbre peptides	% couverture	Séquences
CT12			Endoprotéinase Glu-C					
CT 14		gi|71895337	similar to ovoinhibitor precursor [validated] - chicken [Gallus gallus]	51885	52	2	2	**E.FQKVSPICTME.Y + Carbamidomethyl (C)** **E.FQKVSPICTME.Y + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M)**
			Endoprotéinase Glu-C					
CT 16		gi|71895337	similar to ovoinhibitor precursor [validated] - chicken [Gallus gallus]	51885	44	1	1	**E.CTLCAHNLE.Q + 2 Carbamidomethyl (C)**
			Endoprotéinase Glu-C					
CT 18		gi|71895337	similar to ovoinhibitor precursor [validated] - chicken [Gallus gallus]	51885	62	2	7	**E.FQKVSPICTME.Y + Carbamidomethyl (C)** **D.GRTLVACPRILSPVCGTDGFTYDNE.C + 2 Carbamidomethyl (C)**
			Endoprotéinase Glu-C					
CT 20		gi|71895337	similar to ovoinhibitor precursor [validated] - chicken [Gallus gallus]	51885	109	2	6	**E.FQKVSPICTME.Y + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M)** **E.VCGTDGVTYSNDCSLCAHNIE.L + 3 Carbamidomethyl (C)**
			Endoprotéinase Glu-C					
CT 25			Endoprotéinase Glu-C					
CT 36		gi|71895337	similar to ovoinhibitor precursor [validated] - chicken [Gallus gallus]	51885	71	1	4	**E.VCGTDGVTYSNDCSLCAHNIE.L + 3 Carbamidomethyl (C)**
			Endoprotéinase Glu-C					
CT80			Endoprotéinase Glu-C					
CT 300			Endoprotéinase Glu-C					
T11			Endoprotéinase Glu-C					
T14			Endoprotéinase Glu-C					
T15		gi|71895337	similar to ovoinhibitor precursor [validated] - chicken [Gallus gallus]	51885	136	2	8	**E.RSTPLDCTQYLSNTQNGE.A + Carbamidomethyl (C)** **E.VCGTDGVTYSNDCSLCAHNIE.L + 3 Carbamidomethyl (C)**
T 17			Endoprotéinase Glu-C					
T20			Endoprotéinase Glu-C					
T 27		gi|124757	Ovomucoid precursor (Allergen Gal d 1) (Gal d I)	22576		3	22	E.CLLCAHKVE.Q + 2 Carbamidomethyl (C) D.LRPICGTDGVTYTND.C + Carbamidomethyl (C) E.DGKVMVLCNRAFNPVCGTDGVTYD.N + 2 Carbamidomethyl (C)
			Endoprotéinase Glu-C					

Annexe 7 : Tableau de résultats de la troisième analyse par spectromètre tandem Q-TOF après digestion par l'endoprotéase Glu-C

Dans un souci de bien-être animal, les cages conventionnelles pour l'élevage de poules pondeuses seront interdites en 2012 dans l'Union Européenne, au profit de cages aménagées, d'un élevage au sol ou en volière. La présence, dans tous ces systèmes alternatifs, d'une litière, milieu favorable au développement des microorganismes, impliquera dès lors un risque plus élevé de contamination des œufs de consommation par des agents pathogènes comme *Salmonella enterica* Enteritidis. L'une des stratégies envisagées pour limiter la recrudescence probable de toxi-infections alimentaires associée à ces nouvelles directives, consiste à améliorer les défenses naturelles des œufs que sont la coquille (défense physique) et les protéines antibactériennes (défense chimique) concentrées principalement dans le blanc d'oeuf. Les antiprotéases du blanc d'œuf seraient des acteurs notables du volet chimique de ces défenses, de par leur activité inhibitrice vis-à-vis des protéases microbiennes essentielles à la prolifération des pathogènes. Cependant il n'existe pas de données concernant leur effet vis-à-vis des Salmonelles. Nous avons dans un premier temps cherché à compléter la liste d'antiprotéases identifiées à ce jour dans le blanc d'œuf, en mettant au point une technique de chromatographie d'affinité de type protéase-sépharose. Les antiprotéases ainsi purifiées ont été analysées par spectrométrie de masse et caractérisées pour leur activité inhibitrice de protéases. Si aucune nouvelle antiprotéase n'a pu être identifiée, cette technique a néanmoins permis une première purification de protéines d'intérêt, ce qui permettra par la suite d'étudier leur potentiel inhibiteur propre vis-à-vis des Salmonelles. Parallèlement, nous avons réalisé une étude générale de l'expression transcriptionnelle des gènes de trois antiprotéases du blanc d'œuf, par RT-PCR, dont les résultats ont permis d'apporter des précisions quant à leur spécificité d'expression.
L'identification de nouvelles protéines d'intérêt, l'étude de leur variabilité génétique et environnementale permettront, à terme, de proposer des schémas de sélection de poules dont les œufs présenteront des systèmes de défense renforcés.

To satisfy consumer's expectations concerning animal welfare, the European Union will prohibit, by 2012, conventional cage system for laying hens in favour of other breeding systems that all contain a litter which promotes bacterial growth and dissemination. In such alternative settings, the bacterial load on eggs will therefore increase and cause higher risk of food borne diseases, such as salmonellosis. To limit this impact, one of the considered strategies consists of improving natural defences of the egg including the eggshell (physical defence) and the antibacterial proteins (chemical defence) which are mainly concentrated in the egg white. Among those, some antiproteases have already been identified and shown to inhibit bacterial proteinases but there is no report about the potential effects of these molecules on *Salmonella enterica* Enteritidis. In order to complete the list of egg white antiproteases, we have set up an affinity chromatography technique that implies sepharose beads bound to proteinases. The eluted proteins were analysed by mass spectrometry for identification and assessed for their inhibitory activity using kinetic assays. Although no novel antiprotease could be discovered, this protein purification technique was validated and allowed for the specific purification of antiproteases. A high performance liquid chromatography will next be conducted in order to further purify antiproteases, so as to test their inhibitory potential towards *Salmonella.* In parallel, we conducted a general study of the transcript expression by RT-PCR of three egg white antiproteases, in hen oviduct and liver. The results were in agreement with former publications and brought additional information about the specificity of their expression.
The identification of new egg proteins, the study of their environmental and genetic variability will help for proposing programs of genetic selection to enrich populations of hens laying reinforced eggs.