



UNIVERSITÉ FRANÇOIS RABELAIS - TOURS

Master "Sciences, Technologies, Santé"
Mention: Biologie - Santé

Spécialité Recherche: M2R "PHYSIOPATHOLOGIES"

Mémoire présenté par Stéphane BEAUCLERCQ

**CARACTÉRISATION DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DE
PEPTIDES DÉRIVÉS DE PROTÉINES ANTIMICROBIENNES DE
L'ŒUF**

Travail réalisé dans l'équipe Fonction Régulation des Protéines de l'œuf, UR83 Recherches Avicoles. Centre INRA Val de Loire, 37380 Nouzilly

Directeur du Stage:

Joël GAUTRON (HDR)

Co-encadrants :

Nicolas GUYOT et Sophie RÉHAULT-GODBERT

Année Universitaire 2012-2013

Remerciements

Je tiens à remercier Joël Gautron de m'avoir accueilli au sein de son équipe « Fonction et Régulation des Protéines de l'œuf » ainsi que Michel Duclos pour l'accueil dans l'Unité de Recherches Avicoles.

Je souhaite également remercier Sophie Réhault-Godbert et Nicolas Guyot de m'avoir encadré, conseillé tout au long de mon stage ainsi que pour la confiance qu'ils m'ont accordée.

Je remercie Maryse Mills pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée durant mon stage et pour sa présence durant les longues journées dédiées aux tests antimicrobiens.

Enfin, je remercie Jean-Claude Poirier, Magali Berges-Chessé et Aurélien Brionne pour leur aide technique et les nombreuses conversations qui ont fait avancer mon projet ainsi que tous les autres membres de l'équipe (Yves Nys, Pauline Marie, Aurélien Roche, Cédric Cabau, Angélique Travel), sans oublier nos voisins de l'équipe « Reproduction », pour leur bonne humeur et les bons moments que nous avons passés ensemble.

Et pour finir, je tiens à remercier Catherine Schouler et les membres de son équipe d'ISP 213 pour leur accueil chaleureux lors des tests antimicrobiens.

Sommaire

I. <u>Introduction</u>	1
II. <u>Matériel et méthodes</u>	4
II.1 Identification des sites consensus de liaison à l'héparine.....	4
II.2 Modélisation 3D des protéines	4
II.3 « Docking » (amarrage moléculaire) d'héparine sur les protéines	5
II.4 Prédiction <i>in silico</i> des peptides antimicrobiens.....	6
II.5 Test de l'affinité pour l'héparine (ligand blot)	7
II.6 Test d'activité antimicrobienne (méthode de Lehrer)	8
III. <u>Résultats</u>	9
III.1 Recherche <i>in silico</i> des sites de liaison à l'héparine	9
- <i>La VMO-1</i>	10
- <i>L'OVAX</i>	10
- <i>La pléiotrophine</i>	11
III.2 Conception des peptides dérivés par analyse <i>in silico</i> de leur potentiel antimicrobien	13
III.3 Analyse de l'affinité des peptides dérivés pour l'héparine	14
III.4 Potentiel antimicrobien des molécules natives et des peptides dérivés.....	15
IV. <u>Discussion</u>	18
IV.1 Lien entre l'affinité pour l'héparine et le potentiel antimicrobien des peptides prédits	18
IV.2 Activité antimicrobienne des protéines natives et peptides dérivés.....	19
V. <u>Conclusion</u>	22
VI. <u>Bibliographie</u>	23

I. Introduction

L'œuf de poule est une enceinte close naturelle autosuffisante et stérile qui renferme l'intégralité des éléments nécessaires au développement et à la protection d'un embryon. L'œuf est donc une réserve de nutriments et une mine de molécules aux activités biologiques diverses potentiellement valorisables en santé humaine ou animales telles que le lysozyme. C'est en outre pour l'homme, un aliment essentiel (248 œufs consommés par an et par personne en France), de haute valeur nutritive du fait de la diversité et de l'équilibre de ses constituants facilement assimilables et qui doit, par conséquent, être garant d'une qualité sanitaire irréprochable. L'objectif de l'équipe FRPO est de caractériser les acteurs moléculaires de la défense de l'œuf, qu'elle soit physique (barrière assurée par la coquille) ou chimique (molécules antimicrobiennes) afin d'étudier leur variabilité génétique ou leur modulation en fonction de divers paramètres tels que le système d'élevage des poules, les conditions de stockage des œufs ou au cours du développement embryonnaire. L'essentiel des molécules antimicrobiennes actives de l'œuf est concentré au sein du blanc d'œuf et de la membrane vitelline (Figure 1), à l'instar des composés antimicrobiens majeurs comme l'ovotransferrine ou le lysozyme qui représentent respectivement 13% et 3,5% de l'ensemble des protéines du blanc. Plusieurs autres protéines du blanc d'œuf et de la membrane vitelline ont été récemment isolées au laboratoire et caractérisées pour la première fois comme agents antimicrobiens.

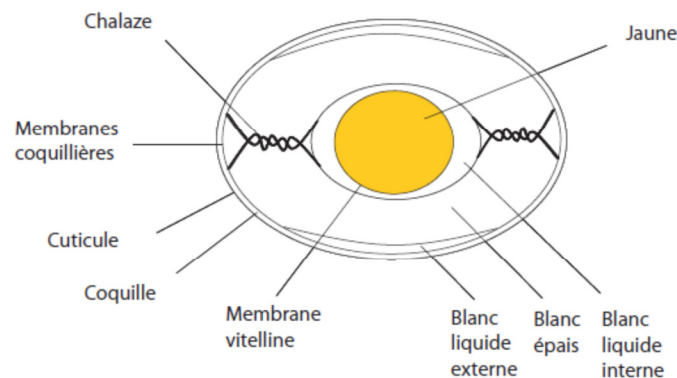


Figure 1: Structure d'un œuf de poule.

L'isolement des candidats antimicrobiens à partir du blanc et de la membrane vitelline de l'œuf, a été réalisé par chromatographie d'affinité de type héparine-sépharose dans le cadre de deux contrats coordonnés par l'équipe (STREP RESCAPE, 2006-2009 et ANR Ovoming, 2009-2012). Le choix de cette stratégie est lié au fait que le pouvoir antimicrobien de certaines protéines et peptides ferait intervenir des caractéristiques (cationicité, régions consensus) que l'on peut retrouver chez les molécules ayant une affinité pour l'héparine, un glycosaminoglycane chargé négativement (Figure 2) (Andersson *et al.*, 2004).

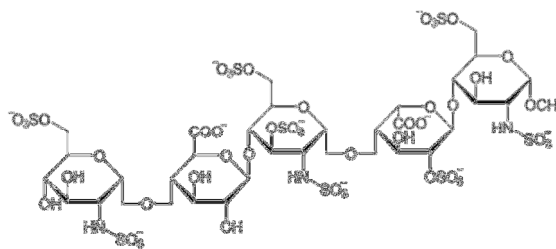


Figure 2: Structure chimique d'un pentamère d'héparine, glycosaminoglycane fortement chargé négativement.

Cette méthode a permis d'isoler une fraction possédant une activité antimicrobienne dans laquelle plusieurs candidats antimicrobiens ont été identifiés (Figure 3) : La bêta-défensine 11 aviaire (Hervé-Grépinet *et al.*, 2010), la Vitelline Membrane Outer layer protein 1 (VMO-1), la pléiotrophine ou encore l'ovalbumine related X (OVAX), la protéine majeure de cette fraction avec un effet anti-*Listeria* et anti-*Salmonella* (Réhault-Godbert *et al.*, 2013). Ces deux effets antibactériens sont également observés pour la pléiotrophine ; en revanche, la VMO-1 possède une activité contre *Listeria* mais pas contre *Salmonella* (données non publiées).

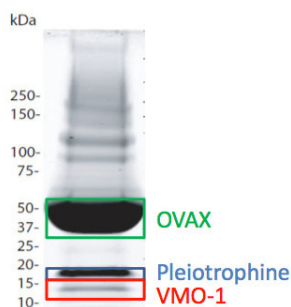


Figure 3: SDS-PAGE de la fraction du blanc d'œuf liant l'héparine.

Le travail sur l'OVAX a été valorisé par un dépôt de brevet (EP2576608 A1, 2011) couvrant l'utilisation de la molécule et des peptides dérivés comme agents antimicrobiens. Ces peptides pourraient nous aider à étudier le mécanisme d'action des molécules ou encore être valorisés comme agents thérapeutiques car présentant l'avantage d'être moins immunogènes et synthétisables *ex vivo* par rapport aux protéines.

Mon travail fait donc suite à ce dépôt de brevet et au besoin de caractériser l'activité antimicrobienne de peptides dérivés de l'OVAX, de la VMO-1 et de la pléiotrophine. En effet, il a été montré que des peptides dérivés de molécules affines pour l'héparine et contenant le site de liaison à l'héparine peuvent posséder des activités antimicrobiennes (Andersson *et al.*, 2004). Cette stratégie implique la connaissance des résidus impliqués dans la liaison à l'héparine. La première partie du travail a donc consisté à rechercher les sites de liaison potentiels à l'héparine par l'analyse bioinformatique des séquences protéiques pour l'identification de sites consensus (sites de liaison linéaires), et par l'étude de la structure tridimensionnelle des protéines pour l'étude de la répartition des charges en surface (sites de liaison conformationnels). Dans un deuxième temps, nous avons choisi d'utiliser des méthodes basées sur la recherche de peptides dérivés potentiellement

antimicrobiens en utilisant les serveurs de prédictions *in silico* disponibles, à partir des séquences protéiques des trois candidats. Suite à ces prédictions nous avons fait synthétiser les peptides obtenant les meilleurs scores cumulés et contenant les résidus identifiés comme impliqués dans la liaison à l'héparine. Nous avons testé/vérifié leur affinité pour l'héparine ainsi que leur activité antibactérienne sur *Listeria monocytogenes* (Gram +) et *Salmonella enterica* Enteritidis (Gram -) en vue de comparer l'activité antimicrobienne des peptides dérivés et également de vérifier l'hypothèse d'Andersson *et al.* (2004) stipulant que les peptides liants l'héparine ont une activité antimicrobienne. Le choix de ces deux souches bactériennes a été dicté par le fait qu'elles sont responsables de toxi-infections alimentaires liées à la consommation de préparations culinaires utilisant des œufs crus, d'ovoproduits ou d'une manière générale de produits animaux.

II. Matériel et méthodes

Nous avons choisi de travailler sur trois protéines issues de l'œuf. L'OVAX (uniprot P01013 (fragment), séquence complète en annexe), la VMO-1 (uniprot P41366) et la pléiotrophine (uniprot F1NJW9). L'OVAX a été purifiée à partir du blanc d'œuf (Réhault-Godbert *et al.*, 2013) et constitue la protéine majeure de la fraction de blanc d'œuf liant l'héparine. La VMO-1 et la pléiotrophine ont été extraites de la membrane vitelline par chromatographie d'affinité à l'héparine (méthode non publiée). L'ovalbumine (uniprot P01012) a été utilisée comme molécule témoin ne liant pas l'héparine.

II.1 Identification des sites consensus de liaison à l'héparine

Deux motifs de liaison à l'héparine XBBBXXBX ou XBBXBX (avec X qui représente un acide aminé quelconque et de préférence hydrophobique ou non chargé, et B un résidu basique) ont été proposés (Cardin *et al.*, 1989). Par la suite, une troisième séquence consensus a été identifiée, XBBBXXBBBXXBBX (Sobel *et al.*, 1992). La présence de résidus basiques chargés positivement est essentielle car ces derniers interagissent directement avec les charges négatives de l'héparine pour stabiliser le complexe. Toutefois, il faut noter que des peptides/protéines ne contenant pas ces séquences consensus, peuvent tout de même lier l'héparine (séquences de fixation non consensus, sites de liaison conformationnels).

Les séquences en acides aminés de l'OVAX, la VMO-1, la pléiotrophine et de l'ovalbumine ont été scannées avec *Prosite* (<http://prosite.expasy.org>) en utilisant comme motifs les trois séquences consensus de liaison à l'héparine décrites.

II.2 Modélisation 3D des protéines

Les structures 3D des protéines résolues par diffraction aux rayons X, RMN sont disponibles sous forme de fichiers PDB dans la base de données « Protein DataBase ». Seule la structure de la VMO-1 est résolue (1VMO). Pour les autres protéines nous avons réalisé des prédictions de structure tridimensionnelle grâce au serveur *I-TASSER* (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Zhang, 2008 ; Roy *et al.*, 2010) et au serveur *Quark* (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/>) (Xu *et al.*, 2012). *I-TASSER* réalise des prédictions de structure 3D par « threading » (méthode par reconnaissance de repliements) et *ab initio* pour les régions non prédictible par « threading ». Les méthodes par « threading » se basent sur la reconnaissance du repliement protéique par enfilage de la séquence en acides aminés sur des structures modèles contenues dans la PDB tandis que les méthodes *ab initio* prédisent la structure tertiaire par rapport aux caractéristiques physico-chimiques des acides aminés composant la séquence primaire de la protéine (Figure 4). *I-TASSER* a été classée comme meilleure méthode lors de la dixième CASP (community-wide Critical Assessment of Structure Prediction) (2012).

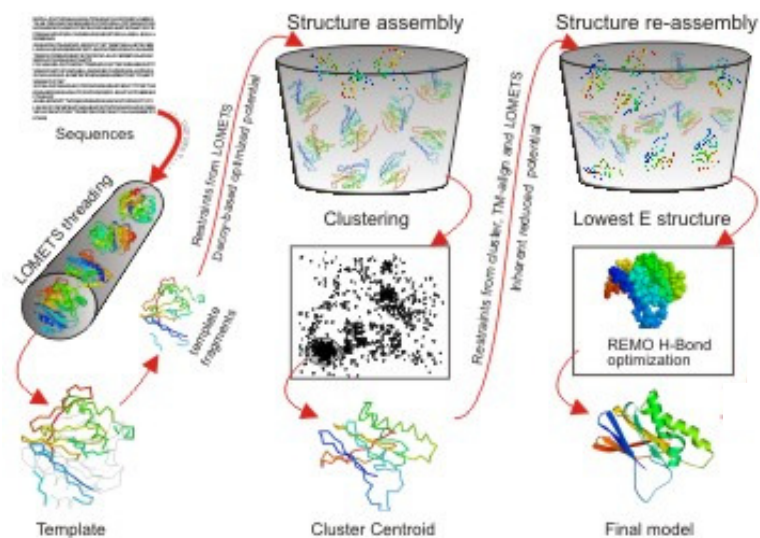


Figure 4: Protocole de I-TASSER pour la prédiction de structure des protéines. Après soumission d'une séquence en acides aminés, le serveur essaie premièrement de trouver des matrices de repliement similaires dans la PDB par une méthode de « threading » (*LOMETS*). En seconde étape, les fragments issus des matrices de la PDB et les séquences non alignées sur le threading, construites par modélisation *ab initio*, sont assemblés afin d'obtenir un modèle complet. Les modèles avec l'énergie libre la plus basse sont identifiés par « clustering » (*SPICKER*). Dans un troisième temps, la simulation d'assemblage des fragments est recommencée à partir du Cluster Centroid (pré-modèle) en utilisant les matrices générées par *LOMETS* et les matrices de la PDB. Les modèles 3D de la protéine avec les énergies les plus basses sont sélectionnés et les réseaux de liaisons hydrogènes sont optimisés par *REMO* ce qui donne les modèles 3D prédits finaux.¹

Quark quant à lui génère des modèles intégralement par *ab initio* ce qui permet de modéliser des protéines ne possédant pas de structure avec un pourcentage d'identité suffisant dans la PDB. Il a été classé deuxième lors de la 10^{ème} CASP.

Les résultats des prédictions, sous forme de fichier PDB, sont visualisés et analysés sur *PyMOL Molecular Graphics System, v. 1.6.0.a2* (Schrödinger, LLC, Portland, OR).

II.3 « Docking » (amarrage moléculaire) d'héparine sur les protéines

Les hypothèses concernant les sites de liaison à l'héparine développées grâce aux séquences consensus et aux clusters d'acides aminés positifs ont été testées par « docking » de quadrimères d'héparine sur les modèles 3D des protéines. Pour ce faire, nous avons utilisé les outils basés sur *AutoDock 4* (Huey, 2007) proposés par *DockingServer* (<http://www.dockingserver.com/>) (Bikadi *et al.*, 2009). Un modèle d'héparine comportant 4 sucres (n=4) a été « docké » via *DockingServer* au niveau des séquences consensus de liaison à l'héparine et des clusters chargés positivement déterminés précédemment ainsi que sur des régions aléatoires des molécules. Le serveur indique pour chaque « docking » possible une estimation de l'énergie libre de liaison tenant compte de l'énergie des forces de van der Waals, des liaisons hydrogènes, de la désolvatation, des liaisons électrostatiques et des interactions de surface. Nous avons considéré comme probables les « dockings » avec une énergie de liaison au-dessous de +1 kcal/mol.

¹ <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/about.html>

II.4 Prédiction *in silico* des peptides antimicrobiens

Quatre outils de prédiction de peptides antimicrobiens ont été utilisés :

- *AntiBP* (<http://www.imtech.res.in/raghava/antibp/>) (Lata *et al.*, 2007)
- *AntiBP2* (<http://www.imtech.res.in/raghava/antibp2/>) (Lata *et al.*, 2009)
- *CAMP* (<http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial/>) (Thomas *et al.*, 2010)
- *AMPA* (<http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa/do>) (Torrent *et al.*, 2009)

Les *AntiBP* sont basés sur des algorithmes de types « réseaux de neurones » et le « dataset » est construit sur base de 391 peptides antimicrobiens (*AntiBP1*) de plus de 15 résidus issus de la *Antimicrobial Peptide Data Bank* (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Le « dataset » négatif a été construit en sélectionnant le même nombre de peptides de même nombre de résidus de façon aléatoire. Sur cette base un score est attribué aux peptides ainsi générés.

CAMP est basé sur les mêmes algorithmes que *AntiBP* mais le « data sets » est construit sur la base des peptides antimicrobiens présents dans la banque *Collection of Anti-Microbial Peptides (CAMP)*. *AMPA* quant à lui fait partie de la suite d'outils bioinformatiques *tcoffee*. L'outil de prédiction utilise un algorithme basé sur une échelle de potentiel antimicrobien construit sur la base de la bactenecin 2A, un peptide antimicrobien de 12 résidus pour lequel l'IC50 (concentration inhibitrice médiane) a été déterminée pour chaque substitution d'acides aminés à chaque position. Sur la base du potentiel antimicrobien des peptides issus de la modification de chaque résidu, un score est donné.

En tenant compte des limitations (taille des séquences protéiques d'entrée) de chaque outil de prédiction, un protocole de prédiction de peptides antimicrobiens a été développé à partir des séquences de la VMO-1, l'OVAX et la pléiotrophine (Figure 5).

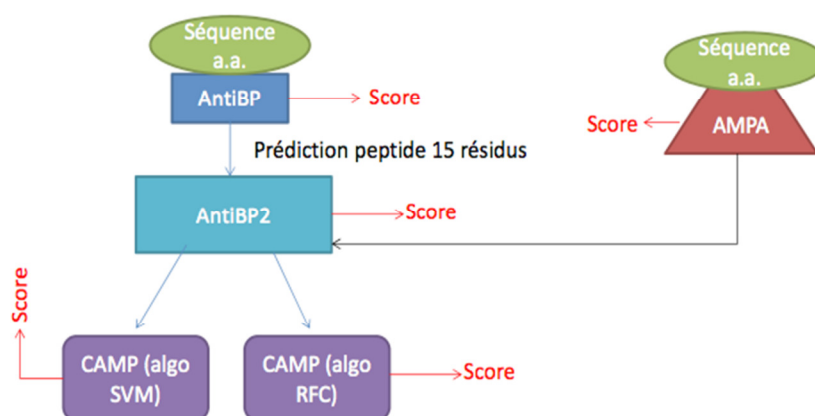


Figure 5: Protocole de prédiction des peptides antimicrobiens. La séquence en acides aminés (a.a.) des protéines est introduite dans *AntiBP* et *AMPA* en parallèle. *AntiBP* génère des peptides de 15 a.a. avec des scores positifs ou négatifs selon la présence ou l'absence de potentiel antimicrobien prédit. *AMPA* génère directement des peptides scorés de longueur variable présentant le meilleur potentiel antimicrobien prédit. Les peptides obtenus par *AntiBP* ayant un score supérieur à 0,661 sont introduits dans *AntiBP2* et ensuite dans *CAMP* en utilisant les deux algorithmes (SVM et Random Forest (RFC)). L'ensemble des scores obtenus est ensuite comparé.

Ce protocole a été testé sur les séquences peptidiques identifiées comme antimicrobiennes par Andersson *et al.* (2004) avec un résultat de 100% de prédictions « antimicrobien » correctes pour les peptides les plus actifs et de 100% de prédictions « non antimicrobien » pour les peptides décrits comme non actifs.

Les scores ont été comparés et les peptides ayant les meilleurs scores cumulés ont été synthétisés par Protéogenix (Schiltigheim, France). Deux peptides contrôles issus de la publication d'Andersson *et al.* (2004) ont également été synthétisés. L'un est présenté comme positif pour la liaison à l'héparine et antimicrobien, l'autre est négatif pour les deux.

La structure 3D des peptides a été modélisée par la méthode *ab initio* de *PEP-Fold* (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/PEP-FOLD/>) (Thévenet *et al.*, 2012).

II.5 Test de l'affinité pour l'héparine (ligand blot)

Les protéines purifiées (VMO-1, OVAX), les peptides synthétisés, un contrôle positif (fibronectine, Sigma-Aldrich) et deux contrôles négatifs (l'ovalbumine et l'ovotransferrine, Sigma-Aldrich) ont été déposés sur une membrane de nitrocellulose (Hybond ECL, Amersham). Ces dépôts ont été réalisés en utilisant l'appareil à dot-blot (Bio-Dot, Bio-Rad). La membrane pré-incubée dans du PBS (Phosphate Buffered saline) est déposée sur du papier Whatman épais dans l'appareil à dot-blot. 100µl de PBS contenant 0,1nmol de protéine ou 1nmol de peptide sont déposés dans les puits de l'appareil. Le PBS est absorbé par le papier buvard et les protéines adsorbent sur la membrane. Les puits du Bio-Dot sont rincés avec 200µl de PBS pour s'assurer d'une fixation totale sur la nitrocellulose. La membrane est retirée de l'appareil et saturée toute la nuit dans une solution PBS-BSA 1% à 4°C sous agitation en vue d'éviter les interactions non spécifiques. Elle est ensuite incubée 1 heure à température ambiante avec une solution d'héparine biotinylée à 10µg/ml (Calbiochem-Millipore) dans du PBS-BSA 1%. L'héparine se fixe sur les protéines ou peptides affins. Cette étape est suivie d'une incubation d'une heure avec de la streptavidine conjuguée à l'Alexa Fluor® 680 (Invitrogen) (solution à 2mg/ml diluée au 1/3000 dans du PBS-BSA 1%) qui se fixe sur la biotine couplée à l'héparine, elle-même fixée par les protéines/peptides. Après la saturation et les incubations de la membrane, 3 rinçages de 10 minutes dans du PBS sont réalisés. La visualisation de la fluorescence émise par l'Alexa Fluor®, correspondant à la fixation d'héparine, est réalisée par un scanning de la membrane dans l'infrarouge (Odyssey scanner, Li-Cor).

II.6 Test d'activité antimicrobienne (méthode de Lehrer)

Les tests ont été réalisés sur deux souches bactériennes : *Listeria monocytogenes* (souche EGD fournie par Philippe Velge et stockée au CIRM BP, INRA Nouzilly) et *Salmonella enterica* Enteritidis ATCC 13076 (CIRM BP, INRA Nouzilly). Ces manipulations ont été réalisées dans un laboratoire habilité pour le travail avec des souches bactériennes de classe 2 (ISP 213, INRA Nouzilly).

L'activité antimicrobienne des protéines ou des peptides purifiés est mesurée par un test en diffusion radiale (Hervé-Grépinet *et al.*, 2010) adapté de la méthode développée par Lehrer *et al.* (1991). Brièvement, cette méthode consiste d'abord à couler dans une boîte de pétri une gélose pauvre en nutriments (« underlay »), contenant des bactéries en phase semi-exponentielle. Des puits sont ensuite creusés dans la gélose et les protéines ou peptides sont déposés dans ces derniers où ils diffusent pendant plusieurs heures (ici 3h à 37°C). Une gélose riche en nutriments (« overlay »), est coulée au-dessus de l'« underlay » pour apporter les nutriments nécessaires à la croissance des bactéries. Si les protéines ou les peptides sont antimicrobiens, un disque d'inhibition de la croissance bactérienne peut être observé et mesuré. La taille du disque d'inhibition varie en fonction des concentrations testées. Les peptides synthétisés ont été testés à une concentration de 100µM, 50µM, 25µM, 10µM sur *Listeria monocytogenes* et à 100µM, 50µM, 10µM, 1µM sur *Salmonella* Enteritidis. On a également testé pour les deux souches bactériennes 100µM de peptides en présence de 10mM de DiThioThrétiol (DTT), un agent réducteur permettant de réduire les ponts disulfures intermoléculaires voire intramoléculaires pour les peptides contenant des cystéines, et 100µM de peptide en présence de 100µg/ml d'héparine (Sigma-Aldrich). En effet, il a été montré que l'héparine pouvait abolir l'activité antimicrobienne de protéines liant l'héparine (Réhault-Godbert *et al.*, 2013). L'OVAX, la VMO-1, la pléiotrophine et l'AvBD11 (témoin positif) ont été testés à 25µM avec ou sans DTT 10mM. Les échantillons avec DTT ont été incubés 1h à 37°C. Les protéines dénaturées par la chaleur ont également été testées (10mM DTT suivi d'une incubation à 100°C durant 5 minutes). Nos résultats sont exprimés en Unités de Diffusion Radiale (UDR) qui correspondent à : $[\text{Ø d'inhibition (mm)} - \text{Ø du puits (2,5mm)}] \times 10$ (Andersson *et al.*, 2004).

III. Résultats

Dans ce travail, notre but était de générer des peptides antimicrobiens dérivés de protéines antimicrobiennes de l'œuf (OVAX, VMO-1, pléiotrophine) affines pour l'héparine. Compte-tenu du lien existant entre les propriétés de liaison à l'héparine et l'activité antimicrobienne (Andersson et al., 2004), nous avons cherché dans un premier temps à identifier les résidus des protéines impliqués dans ces liaisons à l'héparine par des méthodes d'analyse bioinformatique des séquences pour identifier les sites de liaison consensus, et des structures pour localiser les sites de liaison conformationnels. Cette stratégie de recherche des sites de liaison à l'héparine a été combinée à l'utilisation d'outils de prédiction de potentiels antimicrobiens permettant d'identifier *in silico*, à partir d'une séquence protéique, les régions peptidiques potentiellement antimicrobiennes. Les peptides synthétiques correspondants ont été évalués *in vitro* pour leur affinité à l'héparine (ligand-blot) et testés pour leurs activités antimicrobiennes vis-à-vis de deux bactéries pathogènes, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella Enteritidis*, responsables de toxi-infections alimentaires.

III.1 Recherche *in silico* des sites de liaison à l'héparine

Dans un premier temps, nous avons recherché la présence de motifs consensus de liaison à l'héparine dans les séquences protéiques des candidats étudiés.

Le scan des séquences de la VMO-1, l'OVAX, la pléiotrophine et l'ovalbumine pour les motifs XBBBXXBX, XBBXBX et XBBBXXBBBXXBBX (B représentant un résidu chargé positivement et X n'importe quel acide aminé avec une préférence pour un acide aminé hydrophobe ou non chargé) par *Prosite* nous a permis de mettre en évidence la présence de différentes séquences consensus (Tableau I).

Tableau I: Séquences consensus de liaison à l'héparine présentes dans l'OVAX, la VMO-1, la pléiotrophine et l'ovalbumine. Les régions consensus sont indiquées en gras sur la séquence.

Protéine	Motif	
VMO-1	XBBXBX	<u>126</u> <u>141</u> ...FGPWS KRCKIC GLQTK...
OVAX	XBBXBX	<u>285</u> <u>300</u> ...PNTME KRRVKV YLPQM...
Pléiotrophine	XBBXBXXBBXBX	<u>25</u> <u>44</u> ...VSTTEAG KKEKPEKKA KKSD...
	XBBXBX	<u>145</u> <u>162</u> ...PKPQES KKKK EGKKQEK...
Ovalbumine	XBBXBX	<u>272</u> <u>287</u> ...NVMEER KIKV YLPRMK...

Il est à noter que la présence de ces séquences consensus n'est pas une condition suffisante pour avoir une interaction ou pas avec l'héparine. L'ovalbumine, par exemple, possède une de ces séquences (Tableau I) et pourtant ne lie pas l'héparine.

C'est pourquoi, dans un deuxième temps, nous avons examiné la répartition des charges positives (résidus Lysine, Arginine et Histidine) à la surface des protéines puisque des sites conformationnels de liaison à l'héparine ont été également décrits. Pour ce faire, nous avons étudié les structures tridimensionnelles de ces protéines.

- *La VMO-1*

La VMO-1 est une protéine majeure de la membrane vitelline, de 18kDa contenant quatre ponts disulfures. Bien que sa structure 3D soit connue depuis 20 ans, son rôle dans l'œuf demeure à ce jour inconnu.

Nous avons cherché à localiser dans la structure 3D de la VMO-1 la séquence consensus identifiée précédemment ainsi qu'à mettre en évidence les acides aminés chargés positivement et négativement.

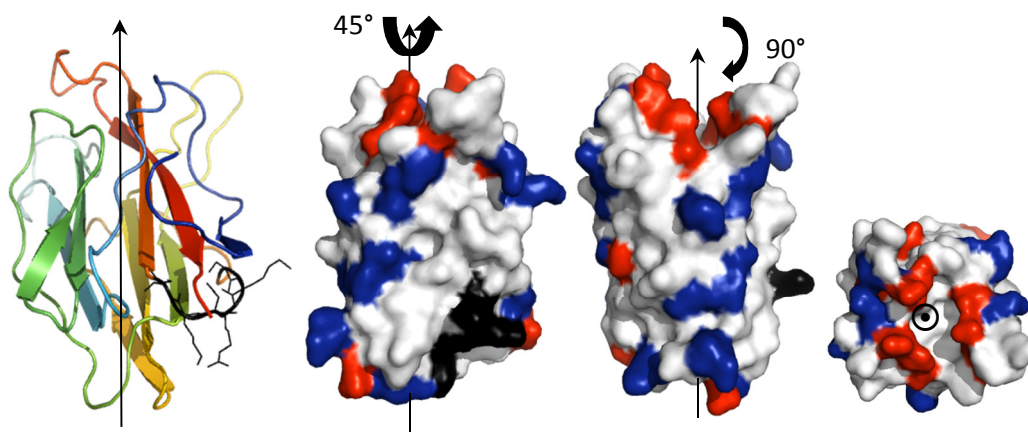


Figure 6: Modélisation 3D de la VMO-1. Représentation en mode « cartoon » et « surface ». La séquence consensus de liaison à l'héparine a été représentée en noir, les résidus chargés positifs en bleu et les négatifs en rouge. Un axe ainsi qu'une indication des rotations exécutées sur le modèle ont été rajoutés pour en faciliter la visualisation. (Fichier PDB 1VMO visualisé avec le logiciel pymol)

On note la structure en feuillets β de la VMO-1 organisés en β -prisme, structure décrite par Shimizu et Morikawa (1996). Le sommet de la VMO-1 est composé de trois clusters négatifs, éléments également observés dans le lysozyme. Pour ce qui est des clusters positifs, la structure en est parsemée. Les deux représentations faciales de la molécule en figure 6 permettent de s'en faire une idée. Ces clusters de résidus positifs sont autant de sites de liaison potentiels à l'héparine. Le site de liaison consensus est inclus dans un de ces clusters.

- *L'OVAX*

L'OVAX (45 kDa) est la protéine majeure du blanc d'œuf qui lie l'héparine. Elle appartient à la famille des serpinines (SERine Protease INhibitor), comme l'ovalbumine, avec un site de clivage prédit, Lys367-His368. Cependant, à ce jour aucun élément n'a permis de démontrer qu'elle possède une activité inhibitrice de protéase (Réhault-Godbert *et al.*, 2013). Elle possède en

revanche des activités antibactériennes. La structure tridimensionnelle de l'OVAX reste inconnue. Nous avons utilisé *I-TASSER*, un serveur de prédiction de structures 3D des protéines et comme protéine modèle, l'ovalbumine (PDB 1OVA). L'ovalbumine et l'OVAX sont deux protéines homologues (59% d'identité de séquence) résultant probablement d'une duplication d'un gène ancestral commun (Heilig, 1980, 1982). Parmi les modèles générés, nous avons choisi celui avec un score élevé de 0.02 (le scoring d'*I-TASSER* varie de -5 à 2, plus le score est haut plus la confiance dans le modèle est importante). Ce choix est validé par le travail bioinformatique sur l'OVAX réalisé en parallèle au Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans et publié récemment (Réhault-Godbert *et al.*, 2013). La répartition des charges a été mise en évidence sur le modèle (Figure 7).

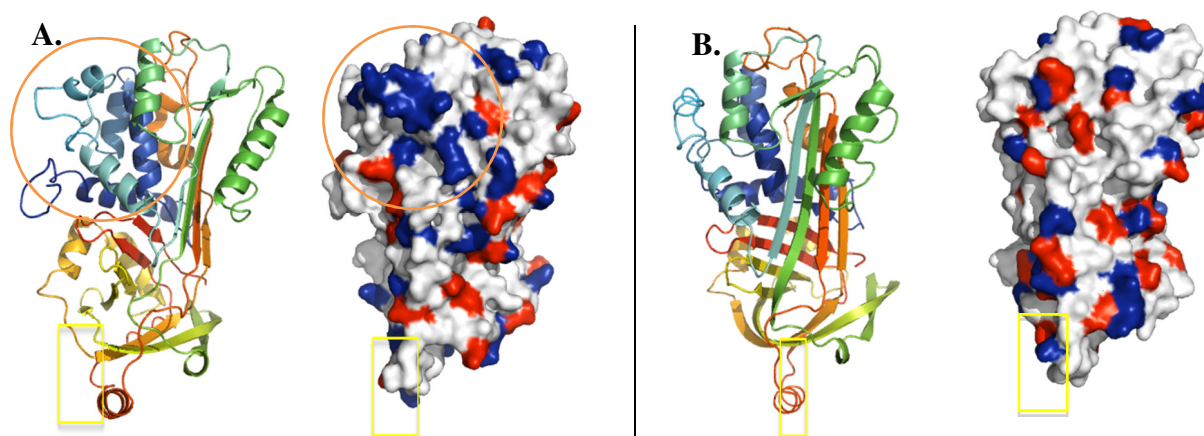


Figure 7: Modélisation 3D et répartition des charges sur le modèle de l'OVAX (A.) et l'ovalbumine (B.). Représentation en « cartoon » et représentation en « surface ». Les résidus chargés positivement sont représentés en bleu, ceux chargés négativement sont en rouge. Encerclé en orange : important cluster de charges positives, site conformationnel de liaison à l'héparine prédit. Encadré en jaune : séquence consensus de liaison à l'héparine. Toutes les représentations ont la même orientation.

On peut noter un important cluster de charges positives au sommet de l'OVAX (Figure 7) qui pourrait être impliqué dans des interactions avec des molécules chargées négativement telles que l'héparine. Ce cluster n'est en revanche pas présent dans l'ovalbumine (ne lie pas l'héparine). La séquence de ce cluster est STQTKV**QKPK**CCKSVNIHLLFKELLSDITASKANYSLRIANRL YAEKSRPILPIYLKCVKK avec la boucle VQKPK. Mis à part ce cluster, les charges sont réparties assez uniformément sur la molécule.

- La pléiotrophine

La pléiotrophine aviaire est une protéine de 18kDa qui lie l'héparine et qui possède cinq ponts disulfures prédits par homologie avec la pléiotrophine humaine et bovine. Cette protéine est effectivement présente chez les mammifères où elle a été identifiée comme facteur de croissance sécrété possédant une forte affinité pour l'héparine.

Comme pour l'OVAX, la structure 3D de la pléiotrophine n'a pas été résolue. Nous avons essayé de la modéliser avec *I-TASSER* mais nous obtenons des modèles avec des scores de confiance faibles bien que la PDB contienne deux fragments synthétiques de la midkine (mknA et mkcA) qui ont un

taux d'identité maximum de 50% avec la pléiotrophine et en couvre 57% (BlastP sur la PDB). Nous avons donc choisi de ne pas utiliser ces modèles. Nous avons tenté la prédiction *ab initio* à l'aide de *QUARK* qui nous a fourni d'autres modèles différents de ceux obtenus par *I-TASSER* (Figure 8). Devant l'impossibilité de dégager un modèle consensus, nous avons abandonné l'idée de modéliser cette molécule. La structure devra dans le futur être déterminée par diffraction aux rayons X.

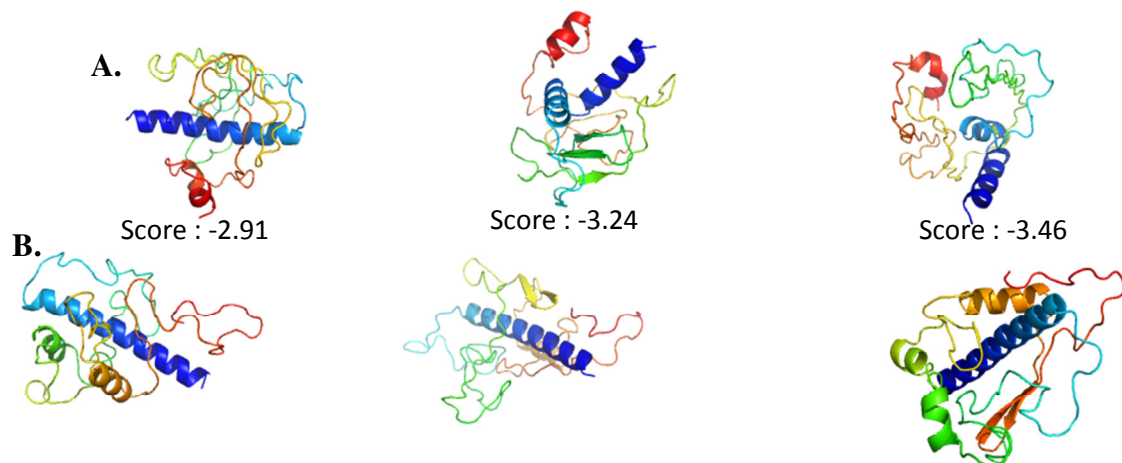


Figure 8: Modélisation de la pléiotrophine. Ligne **A.** : par la méthode reconnaissance de fold / *ab initio* de *I-TASSER* avec les scores correspondants. Ligne **B.** : par la méthode *ab initio* de *QUARK*.

Nous avons continué le travail de prédiction des sites de liaisons à l'héparine par du docking sur l'OVAX et la VMO-1, molécules pour lesquelles nous disposons de la structure 3D ou d'un modèle 3D fiable. La VMO-1 présente de nombreux clusters positifs susceptibles d'interagir avec l'héparine (Figure 9A.), par des interactions relativement faibles (Tableau II). Son site consensus ne semble pas être le site qui a le plus de chance d'interagir avec l'héparine vu son énergie libre de liaison plus élevée. L'OVAX ne présente qu'un seul cluster de résidus positifs (Figure 7A) liant l'héparine avec une énergie plus faible que pour la VMO-1 (Figure 9B), ce qui suggère une meilleure fixation de l'héparine sur ce cluster.

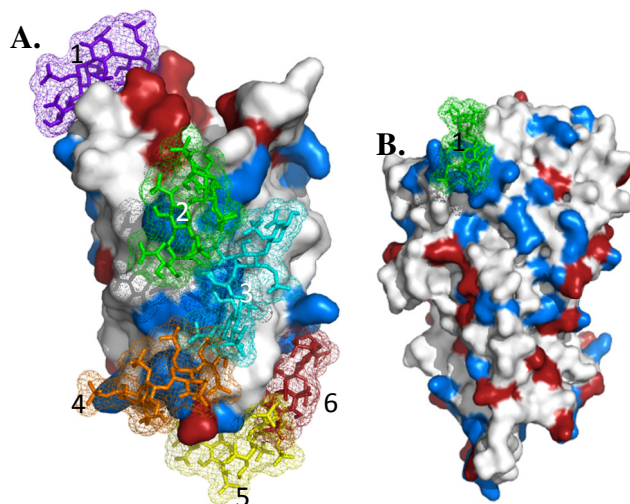


Figure 9: Docking d' héparine n=4 sur la VMO-1 et l'OVAX via *DockingServer*. A. VMO-1. B. OVAX. Les résidus chargés positivement sont en bleu et les négatifs en rouge.

Tableau II: Estimation des énergies d'interaction pour le docking de quadrimère d'héparine sur différents sites de la VMO-1 et de l'OVAX. L'ovalbumine a été utilisée comme molécule contrôle qui ne fixe pas l'héparine. Le docking de biotine sur la streptavidine a servi de témoin pour déterminer l'énergie d'une interaction « forte ».

	Site docking héparine	Estimation énergies interactions (kcal/mol)
VMO-1	1	-0,68
	2	-0,79
	3	+0,58
	4	-2,25
	5	-2,23
	6 (consensus séquence)	+2,04
OVAX	1	-4,32
Ov albumine		/
----- Streptavidine - Biotine		-5,64

III.2 Conception des peptides dérivés par analyse *in silico* de leur potentiel antimicrobien

Suite à ce travail de localisation des résidus impliqués dans la liaison à l'héparine, nous avons dans un deuxième temps recherché des peptides dérivés des protéines qui pourraient avoir une activité antimicrobienne. Grâce à l'utilisation d'outils d'analyse bioinformatique, nous avons obtenu une liste de peptides générés sans à priori par quatre outils différents (voir Matériel et méthodes). Nous avons considéré tous les peptides avec un score supérieur à 0,661 pour *AntiBP* (choix arbitraire) et poursuivi les prédictions sur les autres serveurs avec ceux-ci. Le choix des peptides à synthétiser (Tableau III) a été réalisé en fonction des scores obtenus mais également en fonction de la présence du/des sites de liaison à l'héparine identifiés précédemment (III.1). Comme déjà précisé, un témoin positif (affinité pour l'héparine et activité antimicrobienne) et un négatif (pas d'affinité pour l'héparine et pas d'activité antimicrobienne) provenant de la publication d'Andersson *et al.* (2004) ont également été synthétisés, évalués pour leur potentiel antimicrobien par les différentes outils, afin d'obtenir des valeurs de référence à comparer avec celles des peptides générés. Ainsi, nous avons retenu deux peptides différents pour l'OVAX, un pour la VMO-I et deux pour la pleiotrophine (Tableau III).

Tableau III : Peptides sélectionnés en vue des tests antimicrobiens. Le tableau reprend la séquence des peptides (site prédit d'interaction avec l'héparine en orange), la charge globale des peptides, les scores des prédictions par les différents outils. Les témoins ont une affinité pour l'héparine et une activité antimicrobienne (témoin positif) ou aucun des deux (témoin négatif).

Nom	Séquence	Charge	Score <i>AntiBP</i>	Score <i>AntiBP2</i>	CAMP Proba (SVM)	CAMP Proba (RFC)	AMPA*
Témoin Positif							
AKK15	AKKQRFRRHRNRKGYR	+9	1.203	0.107	0.953	0.652	
Témoin Négatif							
KNN15	KNNQKSEPLIGRKKT	+4	-0.433	-0.773	0	0	
OVAX							
KVQ17	KVQ KPK CGKSVNIHLL F	+4		0,484	0,929	0,932	8%
YLK13	YLKCVKKLYRAGL	+4			0,778	0,976	5%
VMO-1							
GPW15	GPW SKRCK ICGLQTK	+4	1,067	0,949	1,106	0,842	5%
Pléiotrophine							
TTK19	TTKTQKCKIPCNWKKQ FGA	+5		0,167	0,924	0,642	4%
VTI13	VTISKPCGKLTGP	+3			0,828	0,612	12%

* Probabilité non antimicrobienne

III.3 Analyse de l'affinité des peptides dérivés pour l'héparine

L'affinité pour l'héparine des protéines et de leurs peptides dérivés a été déterminée expérimentalement par ligand blot (Figure 10). L'OVAX et la VMO-1, purifiées par chromatographie d'affinité à l'héparine, interagissent donc avec l'héparine. La pléiotrophine lie aussi l'héparine (donnée non présentée). C'est également le cas des deux peptides KVQ17, YLK13 issus du cluster positif de l'OVAX décrit précédemment. Le peptide TTK19 dérivant de la pléiotrophine lie également l'héparine. Les peptides GPW15 issus de la VMO-1 et VTI13 dérivé de la pléiotrophine ont un signal comparable à ceux des témoins négatifs (ovalbumine, ovotransferrine, KNN15). Nous en déduisons donc qu'ils n'interagissent pas ou peu avec l'héparine. Nous avons utilisé comme contrôles positifs pour la liaison à l'héparine la fibronectine et le peptide AKK15 issu de la vitronectine (Andersson *et al*, 2004). Nous n'avons pas réussi à montrer la liaison de ce peptide à l'héparine. Nous avons confirmé la spécificité de notre ligand blot en réalisant une étude de l'effet « dose réponse » (données non présentées).

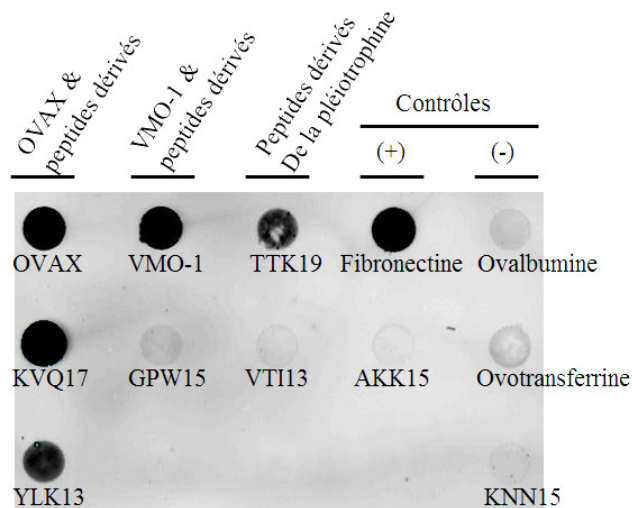


Figure 10: Affinité pour l'héparine des protéines et de leurs peptides dérivés synthétiques. 0,1nmol de protéines ou 1nmol de peptides ont été déposés sur une membrane de nitrocellulose. Cette membrane a été saturée par du PBS-BSA 1% et incubée 1h avec une solution d'héparine biotinylée dans du PBS-BSA 1%. L'héparine fixée par les protéines et les peptides a été révélée avec de la streptavidine couplée à l'Alexa Fluor® 680. La fibronectine et le peptide AKK15 ont été utilisés comme témoins positif d'interaction avec l'héparine. L'ovalbumine, l'ovotransferrine et KNN15 sont les témoins négatifs.

III.4 Potentiel antimicrobien des molécules natives et des peptides dérivés

Les peptides dérivés de l'OVAX, de la VMO-1 et de la pléiotrophine ainsi que les protéines natives (témoins d'activités) ont été testées pour leur pouvoir antibactérien vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* (Gram +) et *Salmonella enterica* Enteritidis (Gram -) (Exemple pour le peptide KVQ17, Figure 11). L'activité a été déterminée par la mesure des diamètres d'inhibition. Il en ressort que les peptides KVQ17 et YLK13 (issus de l'OVAX), pour lesquels on a observé précédemment une affinité pour l'héparine, sont les plus actifs sur les deux souches testées (Tableau IV et V). Leur concentration minimale inhibitrice (CMI) est estimée entre 1 et 10 μ M sur *Salmonella* et entre 10 et 25 μ M pour *Listeria*. Leurs activités semblent égales ou supérieures au peptide AKK15, contrôle positif issu de la publication d'Andersson *et al.* (2004). Ce dernier possède une activité antibactérienne en dépit du fait qu'il ne lie pas l'héparine dans nos conditions expérimentales (Figure 10). GPW15 (VMO-1) et TTK19 (pléiotrophine) ont une activité plus faible et plutôt inhibitrice de croissance que bactéricide. En effet, GPW15 et TTK19 n'inhibent pas complètement la croissance bactérienne: des colonies dispersées sont visibles dans le cercle d'inhibition dont les contours apparaissent flous (activités indiquées par les valeurs soulignées dans les tableaux IV et V). Nous ne considérerons donc pas ces peptides comme réellement bactéricides. Un seul des peptides synthétisés, VTI13 (pléiotrophine), n'a aucune activité sur les deux souches tout comme le témoin négatif KNN15 proposé par Andersson *et al.* (2004). Comme montré en III.3, ces derniers n'ont pas ou peu d'affinité pour l'héparine (Figure 10).

Tous les peptides dérivés de l'OVAX, de la VMO-I et de la pléiotrophine possèdent une ou plusieurs cystéines susceptibles de former des ponts disulfures intramoléculaires ou

intermoléculaires (Tableau III) pouvant impacter sur leurs activités. Nous avons montré que l'incubation avec du DTT 10mM (agent réducteur) induit une augmentation de l'activité du peptide KVQ17 (OVAX) pour les deux souches (Tableau IV, V, Figure 11).

A l'inverse, l'héparine supprime ou diminue l'activité de KVQ17, YLK13, GPW15, TTK19 et dans une moindre mesure pour AKK15. L'activité des peptides, excepté pour AKK15, pourrait donc être due, au moins en partie au(x) domaine(s) de liaison à l'héparine, celle-ci intervenant comme compétiteur de la liaison des peptides au pathogène.

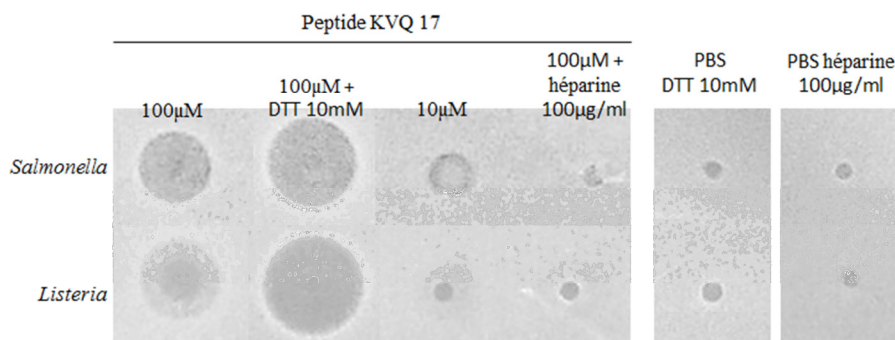


Figure 11: Test d'inhibition de la croissance bactérienne (test de diffusion radiale) du peptide KVQ17 issu de l'OVAX sur *Salmonella enterica* Enteritidis et *Listeria monocytogenes*. Pour les deux souches, les puits de 2,5mm de diamètre sont chargés avec 5µl du peptide KVQ17 à 100µM, 10µM et à 100µM en présence de DTT 10mM ou héparine 100µg/ml avec pour contrôle PBS-DTT 10mM, PBS-héparine 100µg/ml. Les zones plus foncées correspondent aux zones d'inhibition de la croissance bactérienne et les zones claires à une prolifération bactérienne.

Tableau IV : Activités antibactériennes contre *Listeria monocytogenes* obtenue avec le test de diffusion radiale. L'activité est exprimée en unité de diffusion radiale (UDR) qui correspond à $[\varnothing \text{ d'inhibition (mm)} - \varnothing \text{ du puits (2,5mm)}] \times 10$. Pour les peptides, les concentrations de 100µM, 10µM et 100µM + 10mM de DTT, 100µM + héparine à 100µg/ml ont été testées. Pour les protéines une concentration de 25µM avec ou sans DTT 10mM ou avec DTT 10mM + traitement thermique à 100°C ont été utilisés. Les valeurs soulignées indiquent une inhibition partielle de la croissance bactérienne (présence de colonies dispersées dans le cercle, contours flous). n correspond au nombre de réplicat, si pas d'indication le test a été effectué une fois.

	100µM n=3	10µM	100µM +DTT 10mM	100µM + héparine 100µg/ml	25µM n=4	25µM + DTT 10mM	25µM +DTT 10mM + 100°C
AKK15 (positif)	85	45	85	65			
KNN15 (négatif)	0	0	0	0			
GPW15 (VMO-1)	115	0	45	0			
KVQ17 (OVAX)	85	0	115	0			
YLK13 (OVAX)	45	0	40	0			
TTK19 (pléiotrophine)	80	0	80	0			
VTI13 (pléiotrophine)	0	0	0	0			
VMO-1					40	35	0
OVAX					25	20	0
Pléiotrophine					45	40	40
AvBD11					30	15	15

Tableau V : Activités antibactériennes contre *Salmonella enterica* Enteritidis obtenue avec le test de diffusion radiale (UDR). Les peptides ont été utilisés à des concentrations de 100µM, 10µM et 100µM + 10mM de DTT, 100µM + héparine à 100µg/ml. Les protéines ont été utilisées à des concentrations de 25µM avec ou sans DTT 10mM ou avec DTT 10mM + traitement thermique à 100°C. Les valeurs soulignées indiquent une inhibition partielle de la croissance bactérienne (présence de colonies dispersées dans le cercle, contours flous). n correspond au nombre de réplicats, si pas d'indication le test a été effectué une fois.

	100µM n=4	10µM	100µM +DTT 10mM n=2	100µM + héparine 100µg/ml	25µM n=4	25µM + DTT 10mM n=2	25µM +DTT 10mM + 100°C n=2
AKK15 (positif)	70	25	75	25	VMO-1	0	0
KNN15 (négatif)	0	0	0	0	OVAX	0	0
GPW15 (VMO-1)	55	0	45	0	Pléiotrophine	30	40
KVQ17 (OVAX)	65	35	95	0	AvBD11	35	35
YLK13 (OVAX)	55	15	55	25			
TTK19 (pléiotrophine)	0	0	35	0			
VTI13 (pléiotrophine)	0	0	0	0			

Si l'on s'intéresse aux protéines natives, seule la pléiotrophine et la β-défensine 11 aviaire (AvBD11) à 25µM sont actives sur les deux souches. L'OVAX et la VMO-1 n'inhibent que la croissance de *Listeria*. Cette activité peut être annulée après un traitement thermique à 100°C pendant 5 minutes en conditions réductrices (DTT 10 mM). La pléiotrophine et l'AvBD11 semblent résister à ce traitement et conserver au moins en partie leur activité contre les deux souches. En revanche, une incubation d'une heure avec du DTT 10mM ne semble pas impacter sur l'activité des protéines sauf pour l'AvBD11 qui est une protéine de petite taille (9kDa) riche en ponts disulfures.

Il faut noter que nous ne pouvons pas faire de comparaison entre l'activité des protéines et celle des peptides sur la seule base d'une comparaison des diamètres d'inhibition, car les différences de tailles protéine/peptide impliquent une diffusion différente des molécules à travers l' « underlay ».

IV. Discussion

Dans ce travail, nous avons cherché à caractériser l'activité antimicrobienne de peptides dérivés de protéines de l'œuf liant l'héparine (OVAX, VMO-1, pléiotrophine). Pour ce faire, nous avons premièrement cherché à localiser les résidus potentiellement impliqués dans la liaison à l'héparine par des méthodes *in silico*. Suite à ces résultats nous avons, par prédiction, identifié des peptides avec une activité antimicrobienne élevée et si possible intégrant les séquences identifiées comme pouvant lier l'héparine. Dans la dernière partie du travail, nous avons vérifié expérimentalement l'affinité pour l'héparine et l'activité antimicrobienne des peptides.

IV.1 Lien entre l'affinité pour l'héparine et le potentiel antimicrobien des peptides prédits

Tous les peptides pour lesquels nous avons mis en évidence des interactions avec l'héparine par ligand blot (Figure 11) ont une activité bactéricide ou inhibitrice de la croissance bactérienne. Le cas du témoin positif AKK15 issu des travaux d'Andersson *et al.* (2004) est discutable. D'après nos observations, il a une activité antibactérienne mais pas ou peu d'affinité pour l'héparine contrairement à ce qui avait été présenté par Andersson *et al.* (2004). L'affinité de ce peptide issu de la vitronectine pour l'héparine n'a pas été testée par Andersson *et al.* (2004); en réalité, ces derniers se sont basés sur des travaux réalisés par Fromm *et al.* (1997) qui le considère comme liant l'héparine par comparaison avec un peptide analogue qui lie l'héparine.

Nos peptides issus de l'OVAX semblent plus actifs sur *Salmonella enterica* Enteritidis (Gram -) comme le suggère la présence d'un effet à 10 μ M. Toutefois ce résultat doit être confirmé par répétitions et la CMI calculée pour ces peptides. Il semble que les interactions avec l'héparine soient un facteur influençant le pouvoir antibactérien des peptides. En effet, la pré-incubation des peptides liant l'héparine à une concentration active avec de l'héparine induit systématiquement une perte d'activité ou une diminution forte de celle-ci. Bien que lors de notre étude, nous nous sommes principalement intéressés à démontrer une activité antimicrobienne liée à la propriété de liaison à l'héparine, d'autres facteurs rentrent en compte dans l'activité antibactérienne d'un peptide tels que leur structure tridimensionnelle et leur caractère amphiphile. Il est intéressant de noter que nos deux peptides les plus actifs et issus de l'OVAX (KVQ17 et YLK13) ont une structure prédite par *ab initio* respectivement en feuillet β comme les défensines α du neutrophile et en hélice α comme le peptide antimicrobien LL-37 (Figure 12). Une étude de la structure des peptides par RMN ou dichroïsme circulaire serait souhaitable pour confirmer ces résultats.

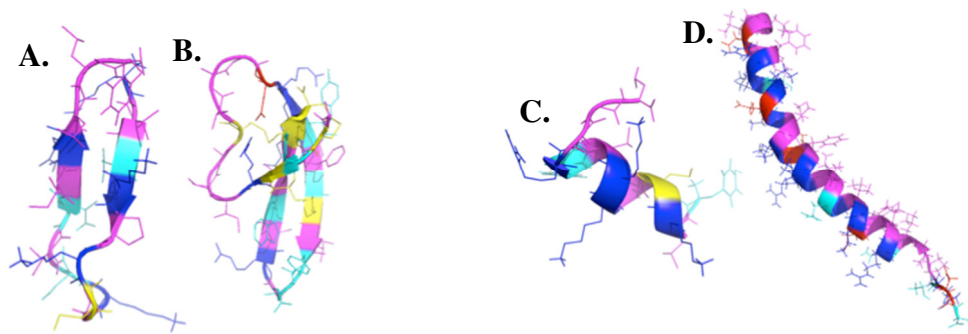


Figure 12: Comparaison entre les structures prédites par *Pep-Fold* du peptide KVQ17 (A.) et YLK13 (C.) issu de l'OVAX avec respectivement la défensine α 1 (PDB 2PM1) (B.) et le peptide LL-37 (PDB 2K6O) (D.). Les modèles sont en représentation « cartoon » avec les résidus chargés positivement en bleu, les chargés négativement en rouge, les hydrophiles en cyan et les hydrophobes en magenta. On notera que les acides aminés chargés peuvent également être considérés comme hydrophiles. Les cystéines sont représentées en jaune.

L'activité antibactérienne supérieur de KVQ17 en présence de DTT 10mM pourrait être liée à la présence d'une cystéine susceptible de former des ponts disulfures avec les autres peptides en solution. La formation de multimères pourrait réduire l'activité du peptide. Nous pouvons également envisager de modifier la séquence en acides aminés des peptides (remplacement des cystéines) et de mesurer les modifications de l'activité antibactérienne associée. Nous avons également pu montrer que les séquences consensus de liaison à l'héparine n'étaient pas une condition suffisante pour avoir une interaction forte avec celle-ci ni une activité antimicrobienne élevée. Le peptide GPW15 issu de la VMO-1 contient le motif SKRCKI mais ne lie que très faiblement l'héparine en ligand blot et a une activité inhibitrice de la croissance bactérienne faible. L'analyse des interactions des peptides avec l'héparine par Biacore pourrait apporter d'avantage d'informations (détermination des constantes d'affinité) et nous permettre de faire une corrélation plus fine entre l'activité antimicrobienne des peptides et leur affinité pour l'héparine.

IV.2 Activité antimicrobienne des protéines natives et peptides dérivés

Les protéines natives avaient été utilisées comme témoins d'activité antibactérienne. Cependant nous avons pu mettre en évidence des caractéristiques intéressantes complémentaires en étudiant les peptides dérivés.

L'activité antibactérienne de l'OVAX avait été mise en évidence contre *Listeria* et *Salmonella* (Réhault-Godbert *et al.*, 2013). Lors de notre étude nous n'avons pas pu reproduire ce résultat sur *Salmonella*. Différentes données nous indiquent que cette protéine est sensible à la dénaturation (température de fusion plus faible que pour l'ovalbumine, susceptibilité à la protéolyse, existence peu probable d'un pont disulfure (Réhault-Godbert *et al.*, 2013)) et nous pensons que l'OVAX purifiée et utilisée pour ces tests n'était plus fonctionnelle vis-à-vis de *Salmonella*. Par ailleurs, il est possible que l'OVAX acquière une forme thermostable au cours du temps pendant le stockage des œufs ou lors du développement embryonnaire, à l'instar de l'ovalbumine (alors appelée S-ovalbumine). Or, les préparations utilisées ici ont été réalisées à partir de blanc d'œufs fraîchement

pondus. Étudier les activités de l'OVAX purifiée à partir de blanc d'œuf pré-stocké en combinaison avec des études de structures nous permettra de définir si l'activité anti-Salmonelle de l'OVAX dépend ou non d'une forme spécifique de la molécule. Par contre, l'activité contre *Listeria monocytogenes* est conservée pour cette préparation ce qui suggère un mécanisme d'action différent. Par ailleurs, nous avons montré qu'après complète dénaturation (DTT 10mM, bouilli 5 minutes) l'activité de l'OVAX sur *Listeria* était perdue. La structure de la protéine et le cluster de charges positives susceptible de constituer le site de liaison à l'héparine semblent essentiels à l'activité antibactérienne (Réhault-Godbert *et al.*, 2013). Les peptides étudiés KVQ17 et YLK13, proviennent de cette région et ont également une activité antibactérienne. L'activité des peptides est probablement due à la séquence en acides aminés liant l'héparine et à leur structure 3D propice à une activité antibactérienne. En effet, la pré-incubation de ces peptides avec l'héparine abolit leur activité que ce soit contre *Listeria monocytogenes* ou *Salmonella* Enteritidis. On peut noter cependant qu'il est peu probable que la structure des peptides soit identique aux parties homologues sur la protéine vu la perte des interactions avec les régions voisines.

La VMO-1 n'est active que sur *Listeria monocytogenes* et comme pour l'OVAX, son activité est dépendante de sa structure 3D (perte d'activité après dénaturation). Cette protéine possède une multitude de clusters capables de fixer l'héparine et donc d'interagir avec les structures pariétales bactériennes. Ces clusters, plus petits que celui de l'OVAX, ont une affinité pour l'héparine potentiellement moins importante. Nous pensons que le cluster contenant la séquence consensus de liaison à l'héparine dont est issu le peptide GPW15 pourrait ne pas être responsable de l'affinité pour l'héparine de la VMO-1 vu l'affinité faible déterminée *in silico* et par ligand blot. Une autre hypothèse qui pourrait expliquer l'inactivation de la VMO-1 après dénaturation et l'activité faible du peptide est qu'elle pourrait avoir une action enzymatique. La surface supérieure de la protéine (Figure 6 à droite) présente un sillon similaire (structure, charges négatives) au site catalytique du lysozyme qui est responsable de l'hydrolyse des peptidoglycanes bactériens (Kirby, 2001). Cette hypothèse devrait être vérifiée en utilisant des inhibiteurs du lysozyme tels que l'imidazole, l'indole (Swan, 1972 ; Shinitzky *et al.*, 1966) qui respectivement se lient au site actif et induisent une distorsion ou la formation de complexes de transfert de charges.

La pléiotrophine est active contre les deux souches testées et son activité ne semble pas altérée par la dénaturation. Elle possède un nombre important de ponts disulfures, prédits par homologie avec les mammifères qui pourraient ne pas être réduits avec 10mM de DTT. Il est également possible que l'effet soit lié à la cationicité importante de la séquence linéaire de la molécule et non à sa structure 3D ou encore à la thermo-stabilité de la pléiotrophine. Toutefois, les propriétés

physicochimiques et structurales de cette protéine restent méconnues. Il nous est difficile de faire un parallèle entre son activité antimicrobienne et la faible activité ou non activité de ses peptides.

V. Conclusion

Dans ce travail nous avons démontré que la prédiction de la séquence de peptides avec une activité antibactérienne était possible à partir d'une séquence protéique. La stratégie développée en combinant les différents outils disponibles s'avère efficace. En effet, sur cinq peptides synthétisés un seul n'a aucune activité sur les deux souches bactériennes testées. Toutefois, la CMI des peptides devra être déterminée et les résultats des tests antimicrobiens confirmés par des répétitions.

Nous avons également confirmé que les caractéristiques qui permettent à un peptide ou une protéine de lier l'héparine sont corrélées à une activité antibactérienne. Toutefois, d'autres caractéristiques telles que la structure 3D des peptides/protéines doit également être prise en compte. Une étude de la structure des peptides par dichroïsme circulaire s'avère indispensable pour confirmer nos prédictions de structure.

Nous ne pouvons pas à l'heure actuelle décrire un mécanisme d'action précis pour les peptides. La visualisation par microscopie électronique de l'aspect des bactéries après incubation avec les peptides pourrait nous apporter des réponses sur leur effet. L'étude des protéines dont dérivent les peptides nous a permis de faire certaines hypothèses pour expliquer leur activité. Il est vraisemblable que le cluster d'acides aminés positifs de l'OVAX serait responsable de son activité antimicrobienne, activité conservée par les peptides dérivant de ce cluster. Pour la VMO-1, il nous faudrait déterminer précisément le site de liaison à l'héparine et si elle a une activité enzymatique, en vue de déterminer quels domaines sont responsables de son activité antimicrobienne. Il est possible que le/les sites de liaisons déterminés par l'approche *in silico* ne soient pas exacts. A l'avenir on se propose de les identifier par une approche de marquage des lysines à la biotine couplé à des analyses en spectrométrie de masse (Ori *et al.*, 2009).

Enfin, en ce qui concerne la pléiotrophine nous n'avons aucune idée de sa structure. Ces connaissances sont indispensables pour pouvoir émettre des hypothèses concernant un mécanisme d'action. L'équipe projette des études de cristallisation afin de la soumettre à une analyse aux rayons X et déterminer sa structure tridimensionnelle.

VI. Bibliographie

- Andersson, E., Rydengård, V., Sonesson, A., Mörgelin, M., Björck, L., and Schmidtchen, A. (2004) Antimicrobial activities of heparin-binding peptides. *Eur J Biochem* **271**, 1219-1226
- Bikadi, Z., and Hazai, E. (2009) Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock. *J Cheminform* **1**, 15
- Cardin, A. D., and Weintraub, H. J. (1989) Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* **9**, 21-32
- Fromm, J. R., Hileman, R. E., Caldwell, E. E., Weiler, J. M., and Linhardt, R. J. (1997) Pattern and spacing of basic amino acids in heparin binding sites. *Arch Biochem Biophys* **343**, 92-100
- Heilig, R., Muraskowsky, R., Kloepfer, C., and Mandel, J. L. (1982) The ovalbumin gene family: complete sequence and structure of the Y gene. *Nucleic Acids Res* **10**, 4363-4382
- Heilig, R., Perrin, F., Gannon, F., Mandel, J. L., and Chambon, P. (1980) The ovalbumin gene family: structure of the X gene and evolution of duplicated split genes. *Cell* **20**, 625-637
- Hervé-Grépinet, V., Réhault-Godbert, S., Labas, V., Magallon, T., Derache, C., Lavergne, M., Gautron, J., Lalmanach, A. C., and Nys, Y. (2010) Purification and characterization of avian beta-defensin 11, an antimicrobial peptide of the hen egg. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 4401-4409
- Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., and Goodsell, D. S. (2007) A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J Comput Chem* **28**, 1145-1152
- Kirby, A. J. (2001) The lysozyme mechanism sorted -- after 50 years. *Nat Struct Biol* **8**, 737-739
- Lata, S., Mishra, N. K., and Raghava, G. P. (2010) AntiBP2: improved version of antibacterial peptide prediction. *BMC Bioinformatics* **11 Suppl 1**, S19
- Lata, S., Sharma, B. K., and Raghava, G. P. (2007) Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC Bioinformatics* **8**, 263
- Lehrer, R. I., Rosenman, M., Harwig, S. S., Jackson, R., and Eisenhauer, P. (1991) Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J Immunol Methods* **137**, 167-173
- Ori, A., Free, P., Courty, J., Wilkinson, M. C., and Fernig, D. G. (2009) Identification of heparin-binding sites in proteins by selective labeling. *Mol Cell Proteomics* **8**, 2256-2265
- Réhault-Godbert, S., Labas, V., Helloin, E., Hervé-Grépinet, V., Slugocki, C., Berges, M., Bourin, M. C., Brionne, A., Poirier, J. C., Gautron, J., Coste, F., and Nys, Y. (2013) Ovalbumin-related protein X is a heparin-binding OV-serpin exhibiting antimicrobial activities. *J Biol Chem*
- Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* **5**, 725-738
- Shimizu, T., and Morikawa, K. (1996) The beta-prism: a new folding motif. *Trends Biochem Sci* **21**, 3-6

- Shinitzky, M., Katchalski, E., Grisaro, V., and Sharon, N. (1966) Inhibition of lysozyme by imidazole and indole derivatives. *Arch Biochem Biophys* **116**, 332-343
- Sobel, M., Soler, D. F., Kermode, J. C., and Harris, R. B. (1992) Localization and characterization of a heparin binding domain peptide of human von Willebrand factor. *J Biol Chem* **267**, 8857-8862
- Swan, I. D. (1972) The inhibition of hen egg-white lysozyme by imidazole and indole derivatives. *J Mol Biol* **65**, 59-62
- Thévenet, P., Shen, Y., Maupetit, J., Guyon, F., Derreumaux, P., and Tufféry, P. (2012) PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. *Nucleic Acids Res* **40**, W288-293
- Thomas, S., Karnik, S., Barai, R. S., Jayaraman, V. K., and Idicula-Thomas, S. (2010) CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res* **38**, D774-780
- Torrent, M., Nogués, V. M., and Boix, E. (2009) A theoretical approach to spot active regions in antimicrobial proteins. *BMC Bioinformatics* **10**, 373
- Xu, D., and Zhang, Y. (2012) Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. *Proteins* **80**, 1715-1735
- Zhang, Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**, 40

Séquence complète de l'OVAX

MFFYNTDFRMGSISAANAFCFDVFNELKVQHTNENILYSPLSIIVALAMVYMGARGNTEY
QMEKALHFDSIAGLGG**STQTKVQKPKCGKSVNIHLFKELLS**DITASKANYSLRIANRLY
AEKSRPILPIYLKCVKKLRYAGLETVNFKTASDQARQLINSWVEKQTEGQIKDLLVSSSTD
LDTTLVLVNAIYFKGMWKTAFAEDTREMPPFHVTKEESKPVQMMCMNNSFNVATLPAEK
MKILELPFASGDLMLVLLPDEVSGLERIEKTINFEKLEWTPNPNTMEKRRVKVYLPQMKI
EEKYNLTSVLMALGMTDLFIPSANLTGISSAESLKISQAVHGAFMELSEDGIEMAGSTGVIE
DIKHSPELEQFRADHPFLFLIKHNPTNTIVYFGRYWSP

Séquence de l'OVAX avec la séquence du cluster positif illustrée en gras et les deux peptides synthétisés surlignés en cyan.

Résumé

L'équipe a montré que l'activité antibactérienne de certaines protéines de l'œuf impliquerait leur domaine(s) de liaison à l'héparine. Dans ce projet, nous avons évalué si des peptides dérivés contenant ce domaine auraient des activités comparables. Ces peptides ont été générés *in silico* par l'analyse bioinformatique de la séquence et de la structure des protéines pour la recherche des sites de liaison à l'héparine et par prédiction de leur potentiel antibactérien. Cinq peptides synthétiques ont alors été caractérisés *in vitro* pour leur affinité à l'héparine et pour leur activité contre *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* Enteritidis, responsables de toxi-infections alimentaires. Sur 5 peptides testés, les 2 qui lient le plus fortement l'héparine ont les activités antibactériennes les plus importantes, validant ainsi le concept. Ces résultats prometteurs permettent d'envisager une valorisation en Agroalimentaire et/ou Santé.

Œuf – Peptides synthétiques – Analyse bioinformatique - Activité antibactérienne - Affinité pour l'héparine

Abstract

It was shown previously in the lab that the antibacterial activity of some egg proteins involves their heparin-binding domain(s). For this project, we investigated the antibacterial potential of derived peptides containing these heparin-binding sites. These peptides were generated *in silico* by bioinformatic analysis of protein sequence and structure to identify heparin-binding sites, combined to the prediction of their antimicrobial potential. Five synthetic peptides were characterized *in vitro* for their affinity to heparin and for their activity against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis, both involved in foodborne diseases. Results showed that the two peptides exhibiting the highest antibacterial activity were those with the strongest affinity to heparin, thus validating the concept. These results are promising and can favour the emergence of derived products of increased value for food and health industries.

Egg - Peptides – bioinformatic analysis - Antibacterial activity – Heparin affinity