

IDENTIFICATION, PURIFICATION ET CARACTERISATION DE LA BETA-DEFENSINE AVIAIRE 11 DANS L'ŒUF DE POULE

**Hervé-Grépinet Virginie¹, Réhault-Godbert Sophie¹, Labas Valérie², Magallon Thierry³,
Bourin Marie¹, Derache Chrystelle⁴, Lalmanach Anne-Christine⁴, Gautron Joël¹, Nys
Yves¹**

¹ INRA, UR83 Recherches Avicoles, 37380 NOUZILLY

² INRA, Plate-forme de Protéomique Analytique et Fonctionnelle, Laboratoire de
Spectrométrie de Masse, 37380 NOUZILLY

³ INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 NOUZILLY

⁴ INRA, IASP, 37380 NOUZILLY

RÉSUMÉ

Le blanc d'œuf possède une activité antimicrobienne naturelle qui est utilisable comme critère de sélection des poules. L'ovotransferrine et le lysozyme sont des molécules antimicrobiennes majeures du blanc d'œuf, mais il est probable que de nombreuses molécules antimicrobiennes de l'œuf restent à identifier. Les défensines sont des peptides antimicrobiens naturels de l'immunité innée décrites chez diverses espèces et possédant un large spectre d'activité antimicrobienne. Nous avons recherché la présence de bêta-défensines aviaires (AvBDs) dans l'œuf et étudié leur rôle qui est essentiel à la protection de l'embryon et contribue à une production d'œufs exempts de pathogènes. L'expression de l'ARNm codant AvBD11 a été mise en évidence dans deux régions de l'oviducte de poule, le magnum où les protéines du blanc d'œuf sont sécrétées et l'utérus où se forme la coquille. Ces résultats suggèrent la présence d'AvBD11 dans le blanc d'œuf et la coquille. La présence d'AvBD11 a été confirmée par spectrométrie de masse dans le blanc d'œuf. Ce peptide a été purifié, pour la première fois, en séparant les protéines du blanc d'œuf par chromatographie d'affinité et chromatographie liquide sous haute pression en phase inverse (C18). L'activité antisalmonellique d'AvBD11 a été testée et les premiers résultats ont montré une activité antibactérienne contre *Salmonella* sérotype Enteritidis et *S. Typhimurium*. L'AvBD11 est par conséquent un candidat intéressant qui pourrait permettre de réduire les risques de toxi-infections alimentaires. En effet, nous envisageons d'augmenter la quantité d'AvBD11 dans l'œuf de façon naturelle et ainsi renforcer les défenses antimicrobiennes innées de l'œuf.

ABSTRACT

The egg white possesses a natural antimicrobial activity which can be used as criteria for hen selection. Ovotransferrin and lysozyme are major egg antimicrobial molecules, but other antimicrobial molecules remain to be identified. Defensins are natural antimicrobial peptides of innate immunity identified in insect, plant and animals, and showing a broad spectrum of antimicrobial activities. We explored the presence of avian beta-defensins (AvBDs) in the chicken egg and studied their role which is essential for the embryonic development and contributes to a production of eggs free of pathogen. The expression of AvBD11 mRNA was first demonstrated in two regions of the hen oviduct: the magnum where the egg white proteins are secreted and the uterus where eggshell is formed. The results demonstrated that AvBD11 was present in the egg white and in the eggshell. Then, AvBD11 protein was identified in the egg white by mass spectroscopy and purified from the egg white for the first time, with an affinity chromatography and a reverse phase high pressure liquid chromatography (C18). Antisalmonellic activities of AvBD11 were tested. Preliminary results showed an antibacterial activity against *Salmonella* serovar Enteritidis and *S. Typhimurium*. AvBD11 is consequently a candidate of interest which could allow reducing the risks of foodborne outbreaks. Indeed, we plan to increase the quantity of AvBD11 in egg, in a natural way, to reinforce innate antimicrobial defences of egg.

INTRODUCTION

Le blanc d'œuf possède une activité antimicrobienne naturelle qui peut être renforcée par la sélection des poules sur ce critère dont l'hérédité (proportion de la variabilité due à des facteurs génétiques) est de 0,16 (Sellier et al., 2007). L'ovotransferrine et le lysozyme sont des molécules antimicrobiennes majeures du blanc d'œuf. Cependant elles n'expliquent pas la variabilité génétique existante (Sellier et al., 2007). Il est donc probable que d'autres molécules antimicrobiennes de l'œuf restent à identifier. Les défensines sont des peptides antimicrobiens naturels de l'immunité innée, possédant un large spectre d'activité antimicrobienne. Ces peptides sont décrits chez diverses espèces comme des composés de l'immunité innée limitant les infections microbiennes (Brogden et al., 2003). Les bêta-défensines (AvBDs) (Lynn et al., 2007) sont des peptides cationiques qui jouent un rôle de protection au niveau du système reproducteur de la poule. Cette protection est essentielle pour le développement de l'embryon et contribue à la production d'œufs, dépourvus de microorganismes pathogènes, pour le consommateur. Plusieurs AvBDs ont été identifiées dans les espèces aviaires par analyse de la séquence génomique de la poule (Lynn et al., 2004, Xiao et al., 2004). Bien que, l'expression des ARNm de ces peptides ait été mise en évidence dans plusieurs tissus chez le poulet leurs rôles et leurs activités dans les tissus reproducteurs et dans l'œuf sont encore mal connus. Cette étude décrit l'expression d'AvBD11 dans les tissus reproducteurs de la poule, son identification et sa purification à partir du blanc d'œuf ainsi qu'une caractérisation partielle de son activité antibactérienne.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Expression des ARNm par RT-PCR

Les séquences peptidiques d'AvBD11 ont été téléchargées à partir de la base de données EMBL-EBI (<http://srs.ebi.ac.uk/>) et utilisées pour générer des amorces spécifiques. L'expression des ARNm d'AvBD11 a été analysée par RT-PCR dans différentes régions de l'oviducte (le magnum, lieu de synthèse des protéines du blanc d'œuf et l'utérus, lieu de formation de la coquille), en utilisant les amorces spécifiques. Les reins ont servi de témoins positifs à la réaction de PCR.

1.2. SDS-PAGE et immunotransfert

Dans le but d'identifier l'AvBD11 dans le blanc d'œuf, nous avons produit des anticorps polyclonaux dirigés contre les extrémités N- et C-terminales d'AvBD11. Pour ce faire, les extrémités C- et N-terminales de l'AvBD11 ont été synthétisées et couplées à une protéine porteuse (KLH) avant d'être

injectées à deux lapins dont les immunisera anti-AvBD11 ont été collectés.

Du blanc d'œuf issu de poules pondeuses Isabrown a été dilué au 1/2 dans une solution de TBS (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,4), sous agitation douce pendant 30 minutes. Après centrifugation (10 min, 4°C, 3000g), le précipité gélatineux contenant des protéines telle que l'ovomucine a été éliminé et le surnageant correspondant au blanc d'œuf dépourvu d'une partie des protéines majeures a été conservé. Différentes quantités de ce blanc d'œuf (62, 125 et 250 µg), obtenues après précipitation, ont été chargées sur un gel gradient d'électrophorèse 4-20%, suivi d'un immunotransfert réalisé avec l'immunsérum anti-AvBD11, dilué au 1/1000°.

1.3. Chromatographie d'affinité et RP-HPLC

Le blanc d'œuf dépourvu d'une partie des protéines majeures est incubé avec des billes de sépharose couplées à un ligand spécifique, en présence d'un tampon Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, durant la nuit à 4°C sous agitation douce. Les billes sont lavées et chargées sur une colonne. Les molécules ayant une affinité élevée pour le ligand sont éluées avec une solution de NaCl 1M. Les protéines et les peptides contenus dans ces fractions éluées sont ensuite séparés sur une colonne X-Bridge C-18 (Waters) par chromatographie liquide sous haute pression en phase inverse. Un gradient d'acétonitrile contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) est utilisé pour la séparation. Chaque pic est collecté et analysé par spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS).

1.4. Détermination de l'activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne est déterminée à l'aide d'une technique par diffusion radiale sensible, en mesurant la zone d'inhibition (Lehrer et al., 1991). La zone d'inhibition est calculée après soustraction du diamètre du puit. Elle est exprimée en unité arbitraire (0,1 mm = 1 U). Pour l'AvBD11 purifiée : 5 µL à 2, 1, 0,5 et 0,25 µM du peptide ont été testés contre *Salmonella* sérotype Enteritidis (ATCC 13076 et LA5) et contre *S. Typhimurium* (ATCC 14028). De la même façon, 5 µL des extrémités N- et C-terminales d'AvBD11 à 0,1 mM ont été testés contre les mêmes bactéries qu'AvBD11 purifiée, mais également contre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Enterobacter cloacae* et *Klebsiella pneumoniae*.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Expression des ARNm d'AvBD11 dans l'oviducte de poule

L'ARNm codant AvBD11 est exprimé dans les reins utilisés comme témoins positifs de la réaction de PCR ainsi que dans le magnum et l'utérus (figure 1),

suggérant qu'AvBD11 pourrait être un peptide présent dans le blanc d'œuf et dans la coquille.

2.2. Présence d'AvBD11 dans le blanc d'œuf

La présence d'AvBD11 dans le blanc d'œuf a été recherchée par immunotransfert. Une bande immuno-réactive est révélée par l'immunsérum anti-AvBD11, démontrant la présence de cette protéine dans le blanc d'œuf (figure 2). De plus, une analyse nanoLC-MS/MS (LC-1D-nanoESI-Q-TOF) de la bande du gel, située entre 9 et 10 kDa, a confirmé l'identité de la defensine 11 (après digestion tryptique). Ces résultats sont en concordance avec une étude protéomique récente du blanc d'œuf (Mann, 2007).

2.3. Purification d'AvBD11 à partir du blanc d'œuf

Nous avons utilisé une spécificité d'AvBD11 pour réaliser la première étape de purification au moyen de billes de sépharose couplées à un ligand spécifique d'AvBD11. Les fractions issues de cette première étape contiennent l'AvBD11 co-purifiée avec d'autres protéines. Au cours de la seconde étape de purification à partir de ces fractions, l'AvBD11 est séparée des autres protéines par RP-HPLC sur colonne C18. Les analyses de spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS) indiquent que le pic collecté à 25 minutes contient uniquement AvBD11. Il s'agit donc de la première purification d'une beta-défensine à partir de blanc d'œuf. Les quantités obtenues, selon cette méthode se sont révélées suffisantes pour pouvoir déterminer une partie de son activité antibactérienne.

2.4. Activité antibactérienne d'AvBD11

L'activité antimicrobienne d'AvBD11 a été testée afin de déterminer son pouvoir antibactérien potentiel. Les premiers résultats obtenus pour l'AvBD11 purifiée sont récapitulés dans le tableau 1. A de faibles concentrations (1 et 0,5 μ M), AvBD11 permet d'inhiber la croissance de *Salmonella* sérotype Enteritidis (ATCC 13076) et à 2 μ M, elle peut

également inhiber la croissance de *Salmonella* sérotype Enteritidis (LA5) et *S. Typhimurium* (ATCC 14028). Les résultats reportés dans le tableau 2 montrent que pour une même molarité, les deux extrémités N- et C-terminales d'AvBD11 possèdent une activité antisalmonellique supérieure à celle obtenue pour les autres bactéries, avec de meilleurs résultats d'inhibition obtenus pour l'extrémité N-terminale d'AvBD11. Une étude plus poussée des activités antibactériennes d'AvBD11 est en cours, mais ces premiers résultats montrent une inhibition importante concernant les souches de Salmonelles. L'AvBD11 est donc un peptide d'intérêt pour réduire le risque de toxi-infections alimentaires, attribuées la plupart du temps aux Salmonelles.

CONCLUSION - PERSPECTIVES

L'AvBD11 est un nouveau peptide antimicrobien du blanc d'œuf, purifié pour la première fois à partir de ce dernier et possédant une activité antisalmonellique. Un test ELISA quantitatif de l'AvBD11 est en cours de validation afin de déterminer la concentration de l'AvBD11 dans le blanc d'œuf. Cet outil permettra de quantifier sa variabilité en fonction de divers facteurs environnementaux. A terme, cette approche permettra de renforcer les défenses antimicrobiennes naturelles de l'œuf et de réduire ainsi les risques de toxi-infections alimentaires.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent sincèrement à remercier Sébastien Lavillatte et Jean-Didier Terlot-Brysinne pour les soins apportés respectivement aux lapins et aux poules, ainsi que Maryse Mills et Aurélien Brionne pour l'aide apportée à la réalisation expérimentale de ce travail.

Les auteurs remercient également la commission européenne pour son support financier dans le cadre du « STREP RESCAPE », contrat n° 036018, 6th Framework Programme, Priority 5, Food Quality and Safety.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Brogden, K. A., Ackermann, M., McCray, P. B., Jr. and Tack, B. F. (2003) *Int J Antimicrob Agents* **22**, 465-78.
- Lehrer, R. I., Rosenman, M., Harwig, S., Jackson, R. and Eisenhauer, P. (1991) *Journal of Immunological Methods* **137**, 167-73.
- Lynn, D. J., Higgs, R., Gaines, S., Tierney, J., James, T., Lloyd, A. T., Fares, M. A., Mulcahy, G. and O'Farrelly, C. (2004) *Immunogenetics* **56**, 170-7.
- Lynn, D. J., Higgs, R., Lloyd, A. T., O'Farrelly, C., Herve-Grepinet, V., Nys, Y., Brinkman, F. S., Yu, P. L., Soulier, A., Kaiser, P., Zhang, G. and Lehrer, R. I. (2007) *Immunol Lett* **110**, 86-9.
- Mann, K. (2007) *Proteomics* **7**, 3558-68.
- Sellier, N., Vidal, M. L., Baron, F., Michel, J., Gautron, J., Protas, M., Beaumont, C., Gautier, M. and Nys, Y. (2007) *British Poultry Science* **48**, 559-66.
- Xiao, Y., Hughes, A. L., Ando, J., Matsuda, Y., Cheng, J. F., Skinner-Noble, D. and Zhang, G. (2004) *BMC Genomics* **5**, 56.

Tableaux 1 et 2. Inhibition des activités antibactériennes par AvBD11 purifiée (Tableau 1) et par ses extrémités N- et C-terminales (Tableau 2)

L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant la zone d'inhibition (0,1 mm = 1 U).

Tableau 1

	Concentrations d'AvBD 11 en μ M		
	2	1	0,5
<i>Salmonella</i> sérotype Enteritidis ATCC 13076	20	15	2,5
<i>Salmonella</i> sérotype Enteritidis LA5	5	-	-
<i>Salmonella</i> sérotype Typhimurium ATCC 14028	2,5	-	-
Zone d'inhibition exprimée en U			

Tableau 2

	Extrémités d'AvBD11	
	N-term 0,1 mM	C-term 0,1 mM
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	20
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	55	35
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	35	10
<i>Enterobacter cloacae</i>	15	2,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	10
<i>Salmonella</i> sérotype Enteritidis ATCC 13076	40	15
<i>Salmonella</i> sérotype Enteritidis LA5	20	0
<i>Salmonella</i> sérotype Typhimurium ATCC 14028	20	10
Zone d'inhibition (U)		

Figure 1. Expression des ARNm de l'AvBD 11.

Expression des ARNm d'AvBD11 analysée par RT-PCR dans les segments de l'oviducte. M, marqueur de taille; 1 et 2, utérus ; 3 et 4, magnum ; 5 et 6, témoin positif (reins); 7, contrôle négatif.

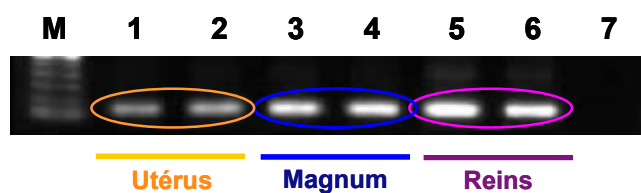


Figure 2. Immunotransfert avec un immunosérum anti-AvBD11 au 1/1000e.

M, marqueur de taille; 1, 2, et 3, 250 μ g, 125 μ g et 62,5 μ g de blanc d'œuf. Le poids moléculaire d'AvBD11 a été estimé à 9289 Daltons.

