

Sabrina Vergnaud

*Effet inhibiteur de l'ovomucoïde d'œuf de caille du japon  
sur l'activité trypsine et élastase humaine.*

## Résumé :

Le blanc d'œuf de plusieurs espèces aviaires contient une glycoprotéine, l'ovomucoïde, présentant des propriétés inhibitrices des protéases à sérine. Le blanc d'œuf de caille du japon a été utilisé comme complément alimentaire chez des patients souffrant de maladies allergiques et de phénomènes inflammatoires. Des administrations répétées par cures de plusieurs jours et à forte dose ont permis d'améliorer leur état. Nous avons voulu démontrer le potentiel inhibiteur de ce nutriment, contenant de l'ovomucoïde, sur l'activité de protéases à sérine d'origine humaine. Nous avons purifié l'ovomucoïde en 2 étapes : une précipitation en milieu acétone/acide trichloracétique suivie d'un fractionnement protéique sur matrice d'affinité (héparine agarose). La spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS a permis d'identifier la nature des protéines purifiées. Ensuite nous avons étudié l'effet inhibiteur de l'ovomucoïde purifié sur l'activité trypsine (bovine et humaine) et sur l'activité élastase (porcine et humaine). Nos résultats montrent que l'ovomucoïde purifié est un inhibiteur de l'activité trypsine tant bovine qu'humaine et présente une inhibition faible mais significative sur l'activité élastase d'origine porcine ou humaine. Les résultats obtenus suggèrent une forte spécificité de l'ovomucoïde dans ses propriétés d'inhibition de l'activité catalysée par la trypsine. Le caractère compétitif de cette inhibition justifie une administration répétée par cures et à forte dose des œufs de caille du japon à des patients en complément alimentaire et l'amélioration observée. Une forme galénique adaptée à l'utilisation de l'ovomucoïde purifié dans le traitement des patients souffrant de maladies allergiques devrait contribuer à rompre le processus inflammatoire observé.

Mots clés : Protéases à sérine, trypsine bovine, élastase porcine, blanc d'œuf, maladies allergiques.

Title : *Inhibitory effect of ovomucoid from japanese quail egg against human trypsin and elastase activity.*

Summary :

The egg white of several avian species contains a glycoprotéin, the ovomucoid, presenting inhibitory properties against serine proteases. The egg white of quail Japanese was used like food complement among patients suffering from allergic diseases and inflammatory phenomena. Administrations repeated by cures of several days and with strong amount made it possible to improve their state. We wanted to show the inhibiting potential of this nutrient, containing ovomucoid, on the activity of serine proteases of human origin. We purified the ovomucoid in 2 stages: a precipitation in acetone/trichloroacetic acid medium followed by a fractionation of protein on affinity matrix (heparin agarose). The mass spectrometry MALDI-TOF-MS made it possible to identify the nature of purified proteins. Then we studied the inhibiting effect of the ovomucoid purified on trypsin activity (bovine and human) and on élastase activity (porcine and human). Our results show that the ovomucoid purified have an inhibitory effect on trypsin activity as well bovine as human and presents a weak but significant inhibition on elastase activity of porcine or human origin. The results obtained suggest a strong specificity of the ovomucoid in its properties of inhibition of the activity catalysed by trypsin. The competitive character of this inhibition justifies an administration repeated by cures and with strong amount of quail japanese eggs of to patients in food complement and the improvement observed. A galenic form adapted to the use of the ovomucoid purified in the treatment of the patients suffering from allergic diseases should contribute to break the inflammatory process observed.

Key words : Serine proteases, bovine trypsin, porcine elastase, white egg, allergic diseases.

## 1. Introduction.

L'œuf de caille du japon est utilisé depuis des siècles comme "nutrithérapie" dans les pays où la pharmacopée est pauvre. En 1978, Truffier rapporta dix années d'observations effectuées dans sa clientèle, en particulier chez les patients souffrants de maladies allergiques et de phénomènes inflammatoires (44). Cette observation purement empirique faisait suite à des cures d'œufs de caille ; ainsi les malades consommaient 5 œufs le matin à jeun par séquences de plusieurs jours avec des périodes d'interruption. Les observations rapportées n'étaient certes pas le résultats d'études cliniques en double aveugle, mais le nombre de patients "traités", voisin de 5000, avec une amélioration dans 70 % des cas était significatif. On sait aujourd'hui que le blanc de l'œuf de caille du japon contient des inhibiteurs de protéases à sérine, comme l'ovomucoïde, capable d'inhiber l'activité de la trypsine humaine. La trypsine est une enzyme digestive produite par le pancréas exocrine dont une infime partie passe dans le sang. L'activité protéolytique de la trypsine est tellement puissante, qu'elle est normalement inhibée par l' $\alpha$ -1 antitrypsine et l' $\alpha$ -2 macroglobuline. Cette protéase à sérine agit sur les cellules immunitaires et de l'inflammation en activant des récepteurs spécifiques au niveau de la membrane plasmique (PAR2 ou Protéase Activated Receptor 2). Il s'en suit une production d'anions superoxyde, par la NADPH oxydase (27), associée à une dégranulation intra-cytoplasmiques (22). Des études récentes ont montré que la plupart des allergènes inhalés avaient une structure de type "trypsine" (23). L'organisme d'un sujet allergique ou atopique peut être envahi par une quantité énorme d'allergène de type protéases à sérine conduisant à la rupture de l'équilibre protéases/anti-protéases (40). Le conflit allergène-anticorps IgE entraîne alors la dégranulation des basophiles et des mastocytes qui libèrent dans le sang simultanément : des protéases à sérine, de l'histamine, de l'interleukine 4 et des facteurs chimiotactiques, éléments qui contribuent à l'inflammation allergique

spécifique d'un allergène donné. La réponse inflammatoire observée peut être non spécifique et endogène (trypsine pancréatique et élastase du neutrophile), ou spécifique et exogène (allergènes du type trypsine à activité protéase à sérine).

Les inhibiteurs de protéases sont bien représentés dans la nature et participent à l'équilibre de nombreuses fonctions biologiques. Depuis 1903 il est démontré que le blanc d'œuf de poulet est capable d'inhiber l'activité de la trypsine de mammifère, l'identité de cette protéine en tant qu'ovomucoïde n'étant établie que depuis 1947 (8). L'ovomucoïde est retrouvé dans le blanc d'œuf de nombreuses espèces aviaires, c'est une glycoprotéine stable et spécifique, douée d'un effet inhibiteur vis-à-vis des protéases à sérine comme la trypsine par formation d'un complexe enzyme-inhibiteur. L'ovomucoïde d'œuf de caille du Japon, une glycoprotéine de 28 kDa, est constituée de trois domaines homologues, de type Kazal, en tandem, avec chacun une séquence S1 correspondant au site actif ou réactionnel et une séquence P1 impliquée dans le contact et la reconnaissance de la protéase à sérine à inhiber (15). Les propriétés inhibitrices des ovomucoïdes diffèrent selon les espèces et au sein de chaque espèce selon la cible protéasique (2). Par une approche structurale il a été démontré une grande variabilité des résidus appartenant à la région de contact P1 et au contraire un fort degré de conservation pour les résidus stratégiques impliqués dans l'activité inhibitrice S1 (12, 15).

Le blanc d'œuf de caille du Japon est utilisé comme complément alimentaire. L'objectif de ce travail a été de démontrer le potentiel inhibiteur de ce nutriment sur l'activité de protéases à sérine d'origine humaine. Dans un premier temps, nous avons mis au point une méthode de purification de l'ovomucoïde, connu pour son activité inhibitrice sur les protéases à sérine, à partir du blanc d'œuf de caille du Japon. Dans un deuxième temps, nous avons étudié le pouvoir inhibiteur de la glycoprotéine purifiée sur l'activité de deux protéases à sérine, la trypsine et l'élastase humaines.

## 2. Matériel et méthodes.

### 2.1. Réactifs.

Héparine agarose, type I H6508 ; Trypsine de pancréas bovin, T1426 ; Trypsine de pancréas humain, T6424 ; Elastase de leucocytes humains, E8140 ; Elastase de pancréas porcin, E1250 ; BAEE (N $\alpha$ -Benzoyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride), B4500 ; N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide ; S4760, Sigma Chemical Co (St Louis, CA, USA). Coomassie stain solution, 161-0436, Bio-Rad (Richmond, CA, USA).

### 2.2. Purification de l'ovomucoïde.

L'ovomucoïde a été purifié à partir d'œufs de caille du Japon (*Coturnix coturnix beminia japonica*). A réception des œufs, les blancs sont immédiatement séparés des jaunes et congelés à -20 °C. Le blanc d'œuf est décongelé à température ambiante et dilué doucement dans 2 volumes de solution précipitante fraîchement préparée (1 volume d'acide trichloracétique 0,5 M et 2 volumes d'acétone) (2, 3, 8). Le contact est maintenu sous agitation pendant 12 heures à 4 °C. Après centrifugation à 3000 g pendant 30 minutes à 4 °C, le surnageant est dilué par 2 volumes d'acétone froid. Le précipité est récupéré par une centrifugation à 3000 g pendant 20 minutes à 4 °C et dissout dans un faible volume d'eau. La solution obtenue est dialysée contre de l'eau distillée pendant une nuit puis lyophilisée. On récupère une poudre dite "ovomucoïde brut" que l'on conserve à 4 °C. L'ovomucoïde brut (100 mg) est dissout dans 50 ml de la solution d'acide formique 5 % pH 3 pendant 2 heures sous agitation, à température ambiante. L'ensemble est centrifugé à 500 g pendant 5 minutes dans les mêmes conditions de température pour éliminer les particules non dissoutes. Le surnageant de centrifugation est alors déposé sur une colonne de chromatographie (1,6 x 20 cm) d'héparine-agarose préalablement équilibrée par la solution d'acide formique 5 % (v/v)

pH 3 et réglée à un débit de 18 ml par heure (27). Des fractions de 3 ml sont récupérées et l'absorbance à 280 nm est mesurée. Après passage du filtrat, la colonne est lavée par une solution de NaCl 0,1 M pH 7,5 jusqu'à ce que l'absorbance retrouve son niveau de base,  $A_{280} = 0$ , puis les protéines sont éluées par un gradient discontinu de NaCl 0,5 M puis 1 M, pH 7,5. Les protéines contenues dans les éluats sont fractionnées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12,5 % suivi d'une coloration au bleu de coumassie. Les fractions d'intérêt sont rassemblées, diluées dans 2 volumes d'eau distillée puis lyophilisées et conservées à 4 °C.

## *2.2. Identification des protéines par MALDI-TOF-MS.*

Les protéines, préalablement purifiées par chromatographie, ont été identifiées par la technique de MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - time of flight mass spectrometry) (28, 29). Une électrophorèse SDS-PAGE 0,75 mm d'épaisseur 10 % est réalisée en déposant 10 µl de chacune des fractions contenant les protéines à analyser. La coloration au bleu de coumassie est réalisée en fixant les protéines par 2 bains de 30 minutes minimum dans de l'acide acétique 7,5 % / éthanol 30 %, puis 60 minutes dans la solution de coloration au bleu de coumassie, suivi de plusieurs bains de décoloration dans de l'éthanol 30 % jusqu'à l'obtention d'un contraste optimum. Les protéines d'intérêt sont excisées du gel coloré au bleu de coumassie puis digérées selon la technique préalablement décrite (28). Les protéines sont extraites du morceau de gel par extraction avec une solution d'acide formique 5 % (v/v) et d'acétonitrile. Après les peptides tryptiques sont séchés et resuspendus dans une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique 0,5 %. Les échantillons sont préconcentrés (précolonne 300 µm X 5 mm PepMap C18) avant d'être injectés dans le système LC-Packings (Dionex) nanoLC. Les peptides sont élués sur une colonne C18 (75 µm X 150 mm). La séparation chromatographique est faite par un gradient de la solution A (5% acétonitrile: 95%

water: 0.1% formic acid) au solvant B (CH<sub>3</sub>CN/Water 90/10 (v/v) containing 0.1% FA) pendant 60 minutes à un débit de 200 nL/min. Le système LC est directement couplé à un QTOF Ultima mass spectrometer (Waters). Les données brutes sont traités en le logiciel "PeptideAuto software" (ProteinLynx, MassLynx 4.0). La recherche des données a été menée en utilisant le "MASCOT search engine" (intranet 2.1 version of MASCOT software) versus le "Swissprot Trembl database". Pour l'identification des protéines pour les peptides ayant un score supérieur à 40 la sequence pepetidique a été examinée manuellement. Pour l'identification des proteins ayant un score supérieur à 20 et inférieur à 40, la sequence peptidique a été examinée maanuellement et/ou interprétée manuellement pour confirmer ou annuler la suggestion du logiciel MASCOT. Les peptides restants sont identifiés manuellement en utilisant les sites des banques de données "MS-Pattern" (<http://prospector.ucsf.edu/>) et Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

#### *2.4. Dosage de l'activité trypsine.*

L'activité trypsine E.3.4.21.4, bovine ou humaine, est mesurée par une méthode spectrophotométrique en utilisant comme substrat le BAEE (Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester) (13, 14). Un milieu de pré-incubation est préparé en ajoutant à 100 µl de trypsine bovine à 0,3 mg/ml ou de trypsine humaine à 0,5 mg/ml dans HCl 1 mM, des volumes croissants de 0 à 50 µl d'ovomucoïde purifié à 2 mg/ml. Le milieu est alors complété à 1 ml avec le tampon phosphate 67 mM pH 7,6. L'ensemble est incubé à 37 °C pendant 30 minutes. Après incubation, la réaction est initiée par addition du substrat, 950 µl BAEE 0,25 mM dans le tampon phosphate 67 mM pH 7,6 que l'on ajoute à 50 µl de milieu de pré-incubation. On suit l'absorbance à 253 nm du benzoyl-L-arginine provenant de l'hydrolyse du BAEE, toutes les 30 secondes pendant 5 minutes. L'activité est exprimée en mmol de benzoyl-L-arginine/l/µg de protéine (trypsine).

### *2.5. Dosage de l'activité élastase.*

L'activité élastase E.3.4.21.36 est quantifiée par une méthode spectrophotométrique en mesurant l'absorbance à 410 nm du p-Nitroaniline provenant de l'hydrolyse du substrat de l'élastase : le SucAla<sub>3</sub> (N-Succinyl-ALA-ALA-ALA-p-Nitroanilide) (12, 17, 18, 19). Dans une cuve de spectrophotomètre on ajoute à 20 µl d'élastase à 1 mg/ml dans HCl 1 mM, des volumes de 0 à 50 µl d'ovomucoïde purifié à 2 mg/ml; le milieu est complété à 1 ml par du tampon phosphate 67 mM pH 7,6 et l'ensemble est incubé à 37 °C pendant 30 minutes. La réaction est initiée par l'addition de 40 µl de substrat, le SucAla<sub>3</sub>-p-Nitroanilide à 2 mg/ml dans le tampon phosphate 67 mM pH 7,6. On suit l'absorbance à 410 nm toutes les 30 secondes pendant 10 minutes. L'activité est exprimée en mmol SucAla<sub>3</sub>/l/µg de protéine (élastase porcine) ou en µmol SucAla<sub>3</sub>/l/µg de protéine (élastase humaine).

### *2.6. Electrophorèse en gel de polyacrylamide, SDS-PAGE.*

Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel dénaturant à 12,5 % de polyacrylamide (29). Des volumes de 50 µl sont déposés pour chaque fraction obtenue par chromatographie. Après électrophorèse, le gel est incubé pendant 30 minutes dans une solution de bleu de Coumassie R250 0,25 % dans du méthanol 50 % (v/v), et de l'acide acétique 10 % (v/v) puis décoloré dans une solution d'acide acétique 8 % (v/v), éthanol 27 % (v/v).

### 3. Résultats.

#### 3.1. Purification de l'ovomucoïde et identification.

Le blanc d'œuf de caille (*Coturnix coturnix beminia japonica*), conservé à -20 °C, provenant d'un seul œuf (environ 5,5 ml) est décongelé à température ambiante et dilué dans 2 volumes du mélange acide trichlorocétique/acétone (1v/2v) préparé extemporanément ; après 12 heures d'incubation à 4 °C et dilution dans de l'acétone glacé, le culot de centrifugation est lavé, dissout dans un faible volume d'eau distillée et lyophilisé (matériel et méthodes). Cette fraction est l'ovomucoïde brut qui sera purifié ensuite sur la matrice d'affinité héparine agarose. L'élution par un gradient discontinu de NaCl, permet d'identifier 3 fractions (Fig. 1A) : la première correspond au filtrat et renferme un mélange de protéines qui ne se fixent pas sur la matrice, l'une d'entre elles étant prépondérante avec un PM de 45 kDa (Fig. 1B). Le contenu protéique des 2 fractions d'élution par NaCl 0,5 M et NaCl 1 M est analysé par SDS-PAGE (Fig. 1B) : on observe 2 bandes à 35 kDa et 67 kDa respectivement.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS a permis d'identifier la nature du contenu de chacune de ces fractions (Tableau 1). La protéine majoritaire dans le filtrat est une protéine d'environ 45 kDa (Fig. 1B), identifiée comme étant de l'ovomucoïde. Cet ovomucoïde pourrait correspondre à un précurseur qui ne se fixe pas sur la matrice (16). La fraction d'élution par NaCl 0,5 M, contient une protéine de 35 kDa d'après le SDS-PAGE (Fig. 1B) protéine qui a été identifiée comme de l'ovomucoïde par la technique de MALDI-TOF-MS. Par contre la fraction, éluée avec la solution de NaCl 1 M, contient une protéine de 67 kDa qui n'a pas encore été identifiée mais n'est pas de l'ovomucoïde. Les fractions d'intérêt sont alors rassemblées, diluées dans 2 volumes d'eau distillée puis lyophilisées et conservées à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

### *3.2. Effet inhibiteur de l'ovomucoïde sur l'activité trypsine.*

L'effet inhibiteur de l'ovomucoïde d'œuf de caille du japon purifié sur héparine agarose, protéine de 35 kDa, a été testé sur l'activité trypsine soit d'origine bovine (Fig. 2) soit d'origine humaine (Fig. 3). Des concentrations croissantes d'ovomucoïde purifié ajoutées au milieu réactionnel contenant une quantité fixe de trypsine bovine (1,5 µg) ont un effet inhibiteur sur l'activité trypsine qui augmente avec la quantité de protéine inhibitrice ajoutée (Fig. 2A). On remarque que l'effet est maximum au cours des 2 premières minutes d'incubation, (Fig. 2B). Cet effet est inversement proportionnel au temps d'incubation (Fig. 2A) ; en effet au-delà de la 2<sup>ème</sup> minute d'incubation la capacité inhibitrice décroît (Fig. 2A). On obtient 100 % d'inhibition après incubation de 1,5 µg de trypsine bovine, pendant 5 minutes, avec 3 µg d'ovomucoïde purifié (rapport 1:2) (Fig. 2C). Les effets sont similaires sur la trypsine d'origine humaine (Fig. 3) mais la capacité inhibitrice de l'ovomucoïde aux concentrations utilisées est largement inférieure. Il faut incuber 10 µg d'ovomucoïde purifié avec 2,5 µg de trypsine humaine (rapport 1:4) pendant seulement 1 minute pour que l'inhibition soit totale (Fig. 3C) ; si l'on augmente le temps d'incubation l'activité trypsine est restaurée mais d'autant plus lentement que les concentrations d'ovomucoïde augmentent.

### *3.3. Effet inhibiteur de l'ovomucoïde sur l'activité élastase.*

L'effet inhibiteur de l'ovomucoïde d'œuf de caille du japon a été testé sur l'activité élastase dans d'origine porcine (Fig. 4) puis d'origine humaine (Fig. 5). Des concentrations croissantes d'ovomucoïde ajoutées au milieu réactionnel contenant une quantité constante d'élastase porcine (20 µg) conduisent à une inhibition faible mais qui augmente avec la quantité de protéine inhibitrice ajoutée (Fig. 4A). Ainsi on remarque que l'inhibition de l'activité de l'élastase porcine (20 µg) de l'ovomucoïde purifié est au maximum de 30 % et qu'il faut incuber 100 µg d'ovomucoïde pendant 10 minutes avec 20 µg d'élastase pour

obtenir une inhibition maximale (Fig. 2B), ce qui représente un rapport enzyme-inhibiteur de 1:5. L'effet inhibiteur de l'ovomucoïde purifié, sur l'activité de l'élastase humaine, est beaucoup plus marqué avec un optimum atteint pour 10 µg d'ovomucoïde incubé pendant 2 minutes avec 20 µg d'élastase humaine. Cet effet inhibiteur (25 %) est proportionnel au temps d'incubation. Lorsque l'on incube 20 µg d'élastase humaine avec 100 µg d'ovomucoïde purifié, rapport 1:5 pendant 10 minutes, le pourcentage d'inhibiteur obtenu est d'environ 60-70 %.

#### **4. Discussion.**

De nombreux inhibiteurs de protéases à sérine, d'origine diverses, sont actuellement connus (1, 2, 4, 6, 11). Le blanc d'œuf de plusieurs espèces aviaires contient une glycoprotéine, nommée ovomucoïde, ayant des propriétés inhibitrice vis à vis des protéases à sérine, propriétés qui varient selon l'origine de ces enzymes (3-9,11, 16). Ces propriétés inhibitrices sont plus particulièrement ciblées sur l'activité trypsine bovine, alpha-chymotrypsine bovine et subtilisine (6). Dans notre travail nous nous sommes intéressés à l'ovomucoïde provenant d'œuf de caille du japon de l'espèce *Coturnix coturnix beminia japonica*.

Nous avons purifié l'ovomucoïde en 2 étapes : une précipitation en milieu acétone/acide trichloracétique suivie d'un fractionnement protéique sur une matrice d'affinité (héparine agarose) qui fixe de préférence les glycoprotéines (27). Une seule protéine identifiée comme l'ovomucoïde a été éluée de la matrice d'héparine par une solution de NaCl 0,5 M. Son poids moléculaire, 35 kDa, diffère de celui de l'ovomucoïde de 28 kDa précédemment décrit dans les œufs de caille du japon (3,16). La nature plus ou moins glycosylée de ces 2 protéines pourrait expliquer ces différences. On peut observer d'autre part la présence dans la fraction qui contient les protéines non retenues sur la matrice d'affinité, d'une molécule de 45 kDa. Un

précurseur de l'ovomucoïde a été décrit ; il renferme 23 acides aminés supplémentaires à l'extrémité N terminale, proche de certains peptides signaux (16) : la protéine de 45 kDa pourrait correspondre à ce précurseur (Tableau 1).

Nous avons confirmé que l'ovomucoïde purifié à partir des œufs de caille du Japon est un inhibiteur de la trypsine bovine, ce qui a été précédemment décrit (2, 6) et démontré avec l'élastase porcine ou humaine une inhibition faible mais significative. On observe cependant que la capacité inhibitrice de l'ovomucoïde purifié varie selon l'origine de la trypsine : dans les mêmes conditions d'incubation et de mesure de l'activité tryptique, l'effet inhibiteur de l'ovomucoïde purifié est inférieur avec la trypsine humaine (60 %, rapport 1:4 enzyme/inhibiteur) par rapport à ce que l'on observe avec l'enzyme bovin (100 %, rapport 1:2).

Les propriétés d'inhibition de l'ovomucoïde varient selon l'origine de la trypsine et selon la nature de la protéase à sérine ciblée. L'ovomucoïde inhibe en effet très faiblement l'élastase qu'elle soit d'origine porcine ou humaine, ce qui est un argument en faveur de sa spécificité pour la trypsine (15, 3, 2, 4, 5, 6). L'ovomucoïde est un inhibiteur compétitif. Cette propriété déjà rapportée (26) est illustrée sur les figures 2A et 2B. L'ovomucoïde et le substrat se lient au site actif de l'enzyme : la compétition entre l'ovomucoïde et le substrat observée in vitro dans la réaction catalysée par la trypsine, dépend de la concentration des éléments en présence et du temps d'incubation. Le contact est donc la spécificité de reconnaissance entre l'inhibiteur (ovomucoïde) et la protéase à sérine dépendent de la nature des résidus amino-acides du site P1 de l'ovomucoïde (3, 12, 15, 25). La grande variabilité de ces résidus selon les sources de l'ovomucoïde purifié pourrait expliquer les différents taux d'inhibition rapportés dans la littérature (4, 6, 7). Dans le mécanisme de catalyse, le bon alignement des résidus stratégiques au site actif de l'enzyme (trypsine ou élastase) avec les groupements du substrat conditionnent l'activité catalysée, la vitesse de catalyse (activité) et donc la spécificité étant

liée à la nature de la séquence peptidique clivée. Dans l'inhibition observée avec l'ovomucoïde, la compétition entre l'enzyme et l'inhibiteur conduit à diminuer l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

## **5. Conclusion.**

Les résultats obtenus suggèrent une forte spécificité de l'ovomucoïde dans ses propriétés d'inhibition de l'activité catalysée par la trypsine. Le caractère compétitif de cette inhibition justifie une administration répétée par cures et à forte dose des œufs de caille du japon à des patients en complément alimentaire et l'amélioration observée. Une forme galénique adaptée à l'utilisation de l'ovomucoïde purifié dans le traitement des patients souffrant de maladies allergiques devrait contribuer à rompre le processus inflammatoire observé.

## Références.

- 1-[X] Haynes R, Feeney RE. Fractionation and properties of trypsin and chymotrypsin inhibitors from Lima Beans. *J Biol Chem* 1967 ; 242 5378-85.
- 2-[X] Feeney RE, Means GE, Bigler JC. Inhibition of human trypsin, plasmin, and thrombin by naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes. *J Biol Chem* 1969 ; 244 1957-60.
- 3-[X] Bogard Jr WC, Kato I, Laskowski Jr MA. Ser162/Gly162 polymorphism in Japanese Quail Ovomuroid. *J Biol Chem* 1980 ; 255 6569-74.
- 4-[X] Laskowski Jr M, Kato I, Ardelt W, Cook J, Denton A, Empie MW, Kohr WJ, Park SJ, Parks K, Schatzley BL, Schoenberger OL, Tashiro M, Vichot G, Whatley HE, Wieczorek A, Wieczorek M. Ovomuroid third domains from 100 avian species: Isolation, sequences, and hypervariability of enzyme-inhibitor contact residues. *Biochem* 1987 ; 26 202-21.
- 5-[X] Takahashi K, Kitao S, Tashiro M, Asao T, Kanamori M. Inhibitory specificity against various trypsin and stability of ovomucoid from Japanese quail egg white. *J Nutr Sci Vitaminol* 1994 ; 40 593-601;
- 6-[X] Liu WH, Means GE, Feeney RE. The inhibitory properties of avian ovo inhibitors against proteolytic enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1971 ; 229 176-85.
- 7-[X] Rhodes MB, Bennett N, Feeney RE. The trypsin and chymotrypsin inhibitors from avian egg whites. *J Biol Chem* 1960 ; 235 1686-93.
- 8-[X] Lineweaver H, Murray CW. Identification of the trypsin inhibitor of egg white with ovomucoid. *J Biol Chem* 1947 ; 171 565-81.
- 9-[X] Balls AK, Swenson TL. The antitrypsin of egg white. *J Biol Chem* 1934 ; 106 409-19.
- 11-[X] Feeney RE., Stevens FC., Osuga DT. The specificities of chicken ovomucoid and ovo inhibitor. *J Biol Chem* 1963 ; 238 1415-8.

- 12-[X] Empie MW, Laskowski Jr M. Thermodynamics and kinetics of single residue replacements in avian ovomucoid third domains: effect on inhibitor interactions with serine proteinases. *Biochem* 1982 ; 21 2274-84.
- 13-[X] Schwert GW, Takenaka Y. A spectrometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochim Biophys Acta* 1955 ; 16 570-5.
- 14-[X] Travis J, Roberts RC. Human trypsin. Isolation and physical-chemical characterization. *Biochem* 1969 ; 8 2284-9.
- 15-[X] Asao T, Takahashi K, Tashiro M. Interaction of second and third domains of Japanese quail ovomucoid with ten mammalian trypsins. *Biochim Biophys Acta* 1998 ; 1387 415-21.
- 16-[X] Thibodeau SN, Palmiter RD, Walsh KA. Precursor of egg white ovomucoid. *J Biol Chem* 1978 ; 253 9018-23.
- 17-[X] Virca GD, Metz G, Schinebli HP. Similarities between human and rat leukocyte elastase and cathepsin G. *Eur J Biochem* 1984 ; 144 1-9.
- 18-[X] Harper JW, Cook R R, Roberts CJ, McLaughlin BJ, Powers JC. Active site mapping of serine proteases human leukocyte elastase, cathepsin G, porcine pancreatic elastase, rat mast cell protease I and II, bovine chymotrypsin A $\alpha$ , and *Staphylococcus aureus* protease V-8 using tripeptide thiobenzyl ester substrates. *Biochem* 1984 ; 23 2995-3002.
- 19-[X] Nakajima K, Powers JC, Ashe BM, Zimmerman M. Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase. *J Bioch Chem* 1979 ; 254 4027-32.
- 22-[X] Miike S, Mc William AS, Kita H. Trypsine induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. *J Immunol* 2001 ; 167 6615-22.
- 23-[X] Widmer F, Hayes PJ, Whittaker RG, Kumar RK. Substrate preference profile of proteases released by allergenic pollens. *Clin Exp Allergy* 2000 ; 30 571-6.

- 25-[X] Kato I, Schrode J, Korh WJ, Laskowski Jr M. Chicken ovomucoid: determination of its amino acid sequence, determination of the trypsin reactive site, and preparation of all three of its domains. *Biochemistry* 1987 ; 26 193-201.
- 26-[X] Laskowski Jr M, Kato I. Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem* 1980 ; 49 593-626
- 27-[X] Batot G, Martel C, Capdeville N, Wientjes F, Morel F. Characterization of neutrophil NADPH oxidase activity reconstituted in a cell-free assay using specific monoclonal antibodies raised against cytochrome b558. *Eur J Biochem* 1995 ; 234 : 208-15.
- 28-[X] MALDI Ferro et al 2002
- 40-[X] Schmidlin F, Bunnet NW. Protease-activated receptors : how proteases signal to cells. *Current opinion in Pharmacology* 2001 ; 1 : 575-82.
- 44-[X] Truffier JC. Approche thérapeutique de la maladie allergique par ingestion d'oeufs de caille. *La clinique* 1978 ; 22 : 3-6.

**Tableau 1 : Identification des protéines purifiées à partir des œufs de caille par la technique de MALDI-TOF-MS.** Après digestion trypsique des protéines, préalablement purifiées sur colonne d'héparine agarose et migration électrophorétique, les fragments obtenus sont identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS. Pour chaque fragment, est déterminé la masse, la séquence puis une comparaison avec les banques de données permet de définir une séquence homologue connue.

Protéine	Masse	Séquence	Homologue
	601,3	KKRVSDGTLTLNHFGK	sp P52264 IOVO_PODST Ovomucoid (Fragment)
30 kDa	896,41	NNQPAHNLVQGTSVGKK	sp P01003 IOVO_COTJA Ovomucoid.
	1079,46	LEAAVSVDCSEYPMVPLR	sp P67944 IOVO_TYMCU Ovomucoid (Fragment).
	690,97	...GPADYRPVCGSDNK	sp P01003 IOVO_COTJA Ovomucoid.
45 kDa	697,3	(MLQ)GVVCPDDLRL	sp P01003 IOVO_COTJA Ovomucoid.
	889,4	..QPAHNVVQGTSVGKK	sp P01003 IOVO_COTJA Ovomucoid.
	574,01	...AAAALSHLVCGVPR	—
60 kDa	598,69	..LLLPRCRVLGGAHK	—
	613,27	..YDVTCSAAPPRL	—
	796,81	..VDCSQAHASGLSK	—

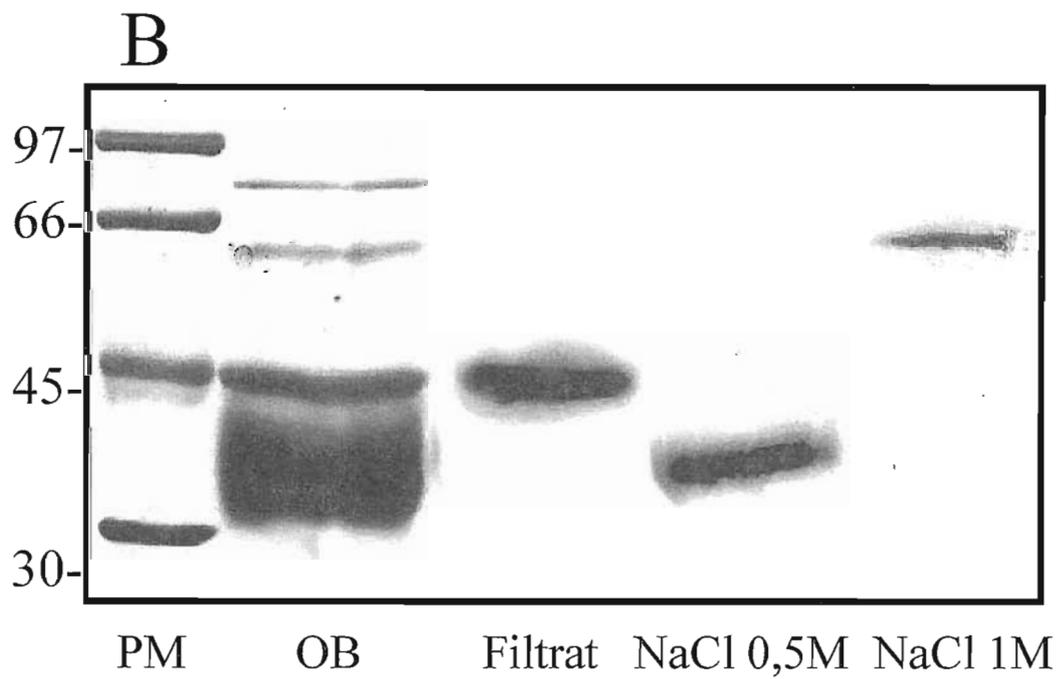
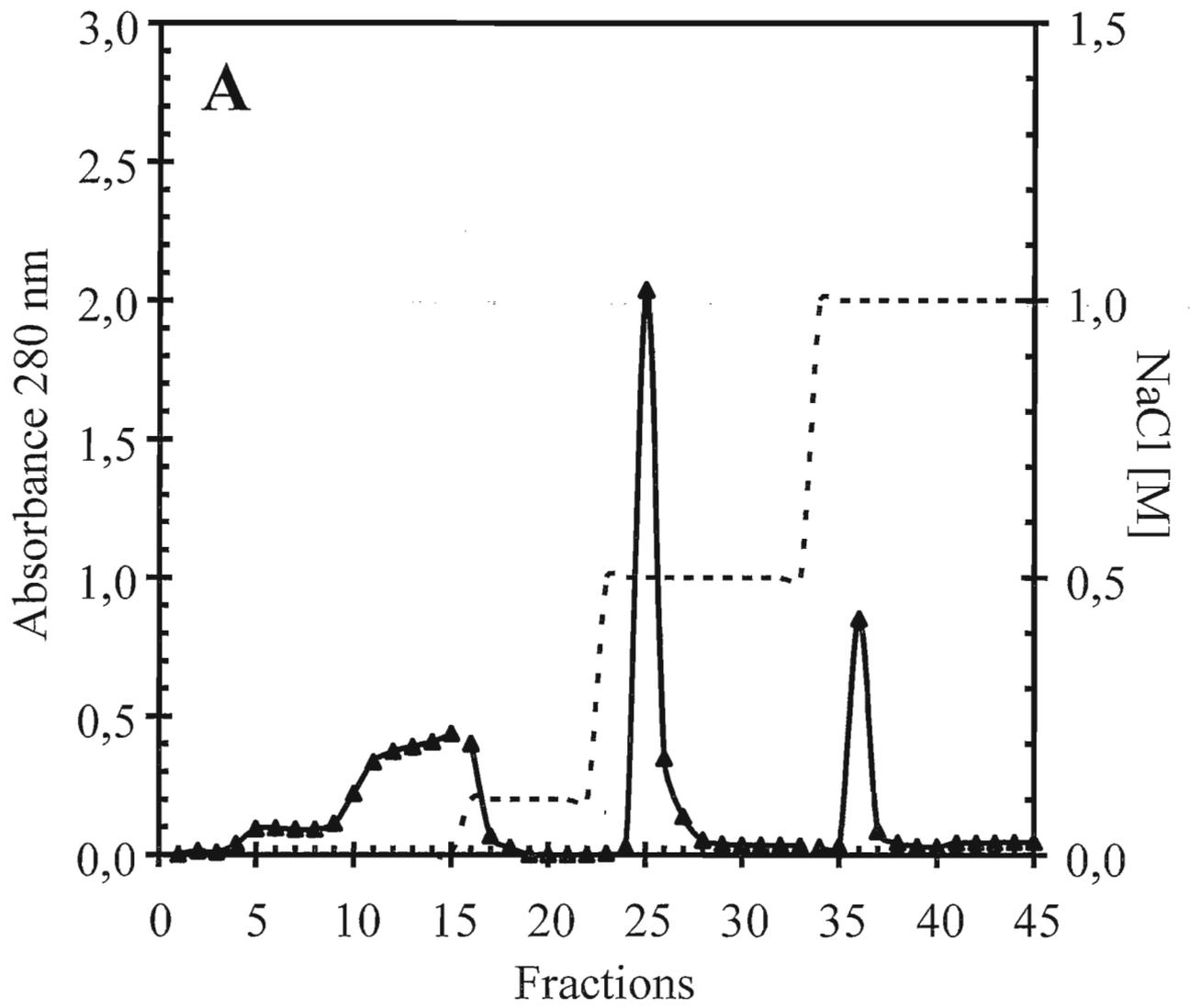
Fig. 1. Purification de l'ovomucoïde. (A) L'ovomucoïde brut (OB) est obtenu à partir du blanc d'œuf de caille après précipitation par la solution d'acide trichloracétique-acétone. Il est déposé sur une matrice d'héparine agarose, 100 mg d'ovomucoïde brut (OB). Le filtrat est récupéré (fractions 1 à 14), la colonne est lavée par du NaCl 0,1 M (fractions 15 à 23) puis les protéines fixées sur la colonne sont éluées par NaCl 0,5 M (fractions 24 à 33) puis NaCl 1 M (fractions 34 à 45). (B) Les fractions d'éluion (50 µl) sont contrôlées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (coloration au bleu de coumassie).

Fig. 2. Inhibition de l'activité trypsine bovine par l'ovomucoïde. La trypsine bovine (1,5 µg) est incubée en présence de BAEE (N-Benzoyl-Arginine-Ethyl-Ester) 0,25 mM dans un tampon phosphate 67 mM pH 7. L'activité est mesurée à 37°C toutes les 30 secondes pendant 5 minutes en suivant l'absorbance à 253 nm ; elle est exprimée en mmol BAEE/l/µg de trypsine bovine. (A-B) Effet de quantités croissantes d'ovomucoïde purifié (0 à 3 µg) sur l'activité trypsine bovine (1,5 µg) en fonction du temps (n=5). (C) Pourcentage d'inhibition de l'ovomucoïde sur l'activité trypsine bovine à différents temps d'incubation (n=5).

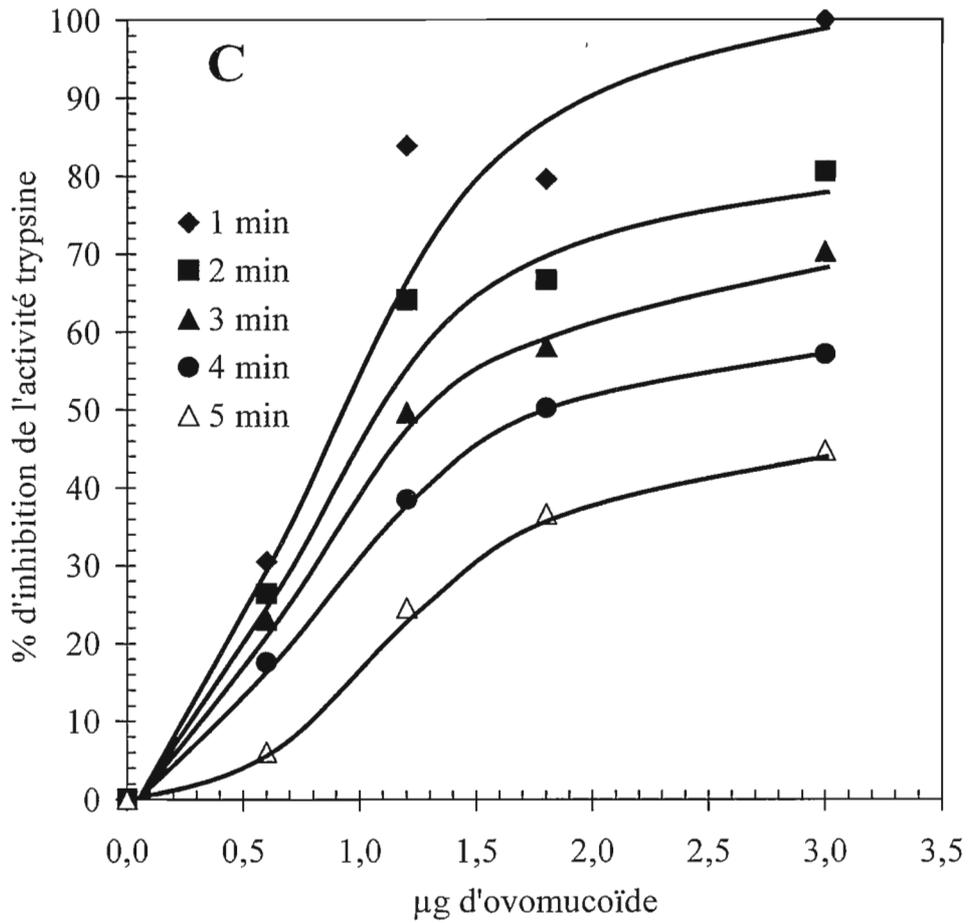
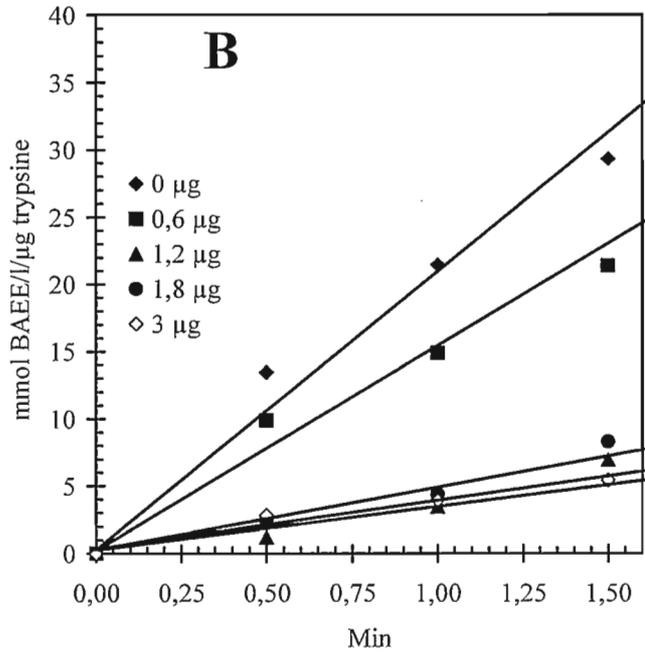
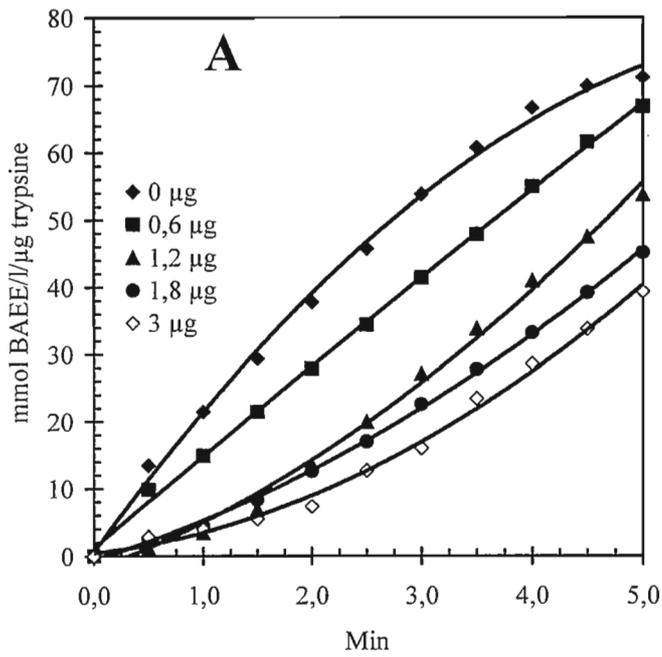
Fig. 3. Inhibition de l'activité trypsine humaine par l'ovomucoïde. La trypsine humaine (2,5 µg) est incubée en présence de BAEE (N-Benzoyl-Arginine-Ethyl-Ester) 0,25 mM dans un tampon phosphate 67 mM pH 7. L'activité est mesurée à 37°C toutes les 30 secondes pendant 5 minutes en suivant l'absorbance à 253 nm ; elle est exprimée en mmol BAEE/l/µg de trypsine humaine. (A-B) Effet de quantités croissantes d'ovomucoïde purifié (0 à 25 µg) sur l'activité trypsine humaine (2,5 µg) en fonction du temps (n=4). (C) Pourcentage d'inhibition de l'ovomucoïde sur l'activité trypsine humaine à différents temps d'incubation (n=4).

Fig. 4. Inhibition de l'activité élastase porcine par l'ovomucoïde. L'élastase porcine (20 µg) est incubée en présence de N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-Nitroanilide (80 µg) dans un tampon phosphate 67 mM pH 7,6. L'activité est mesurée à 37°C toutes les 30 secondes pendant 10 minutes en suivant l'absorbance à 410 nm ; elle est exprimée en µmol SucAla<sub>3</sub>/l/µg d'élastase porcine. (A) Effet de quantités croissantes d'ovomucoïde purifié (0 à 140 µg) sur l'activité élastase porcine (20µg) en fonction du temps (n=5). (B) Pourcentage d'inhibition de l'ovomucoïde sur l'activité élastase porcine à différents temps d'incubation (n=5).

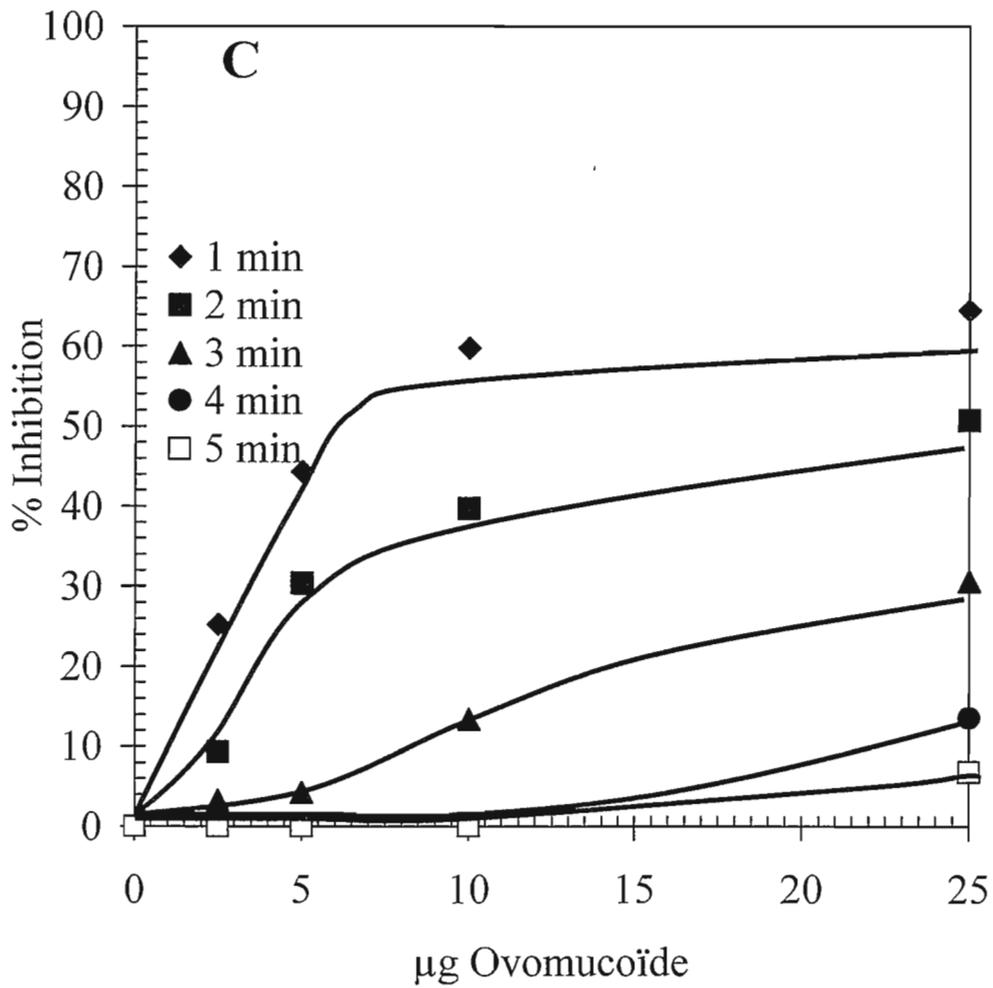
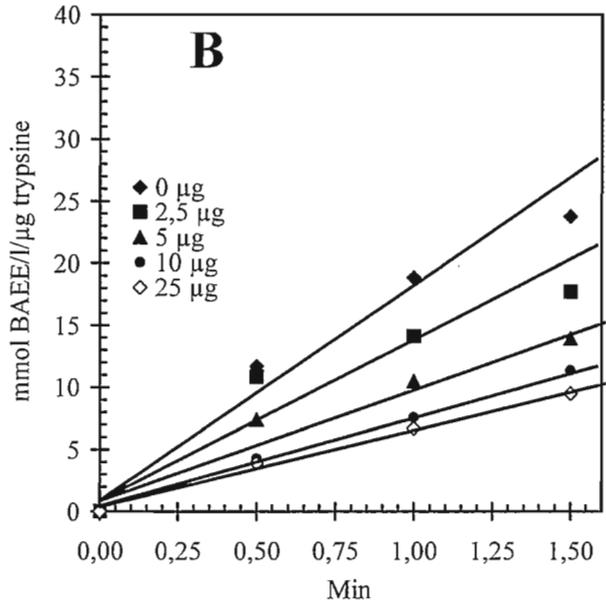
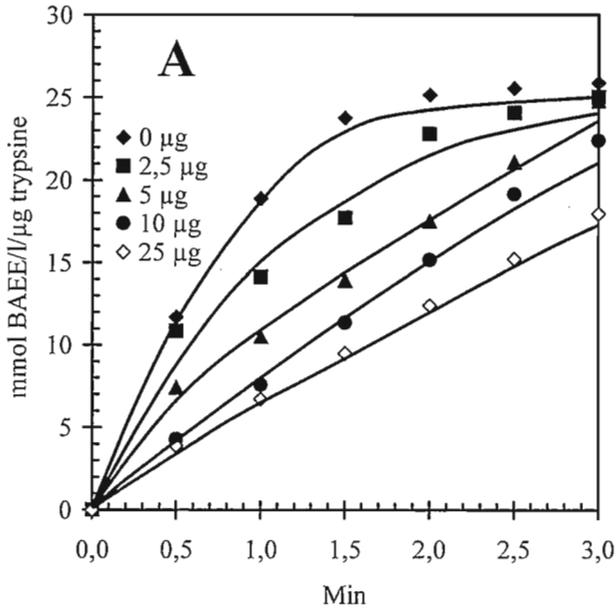
Fig. 5. Inhibition de l'activité élastase humaine par l'ovomucoïde. L'élastase humaine (20 µg) est incubée en présence de N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-Nitroanilide (80µg) dans un tampon phosphate 67 mM pH 7,6. L'activité est mesurée à 37°C toutes les 30 secondes pendant 10 minutes en suivant l'absorbance à 410 nm ; elle est exprimée en µmol SucAla<sub>3</sub>/l/µg d'élastase humaine (20µg). (A) Effet de quantités croissantes d'ovomucoïde purifié (0 à 50 µg) sur l'activité élastase humaine (20µg) en fonction du temps. (B) Pourcentage d'inhibition de l'ovomucoïde sur l'activité élastase humaine à différents temps d'incubation.



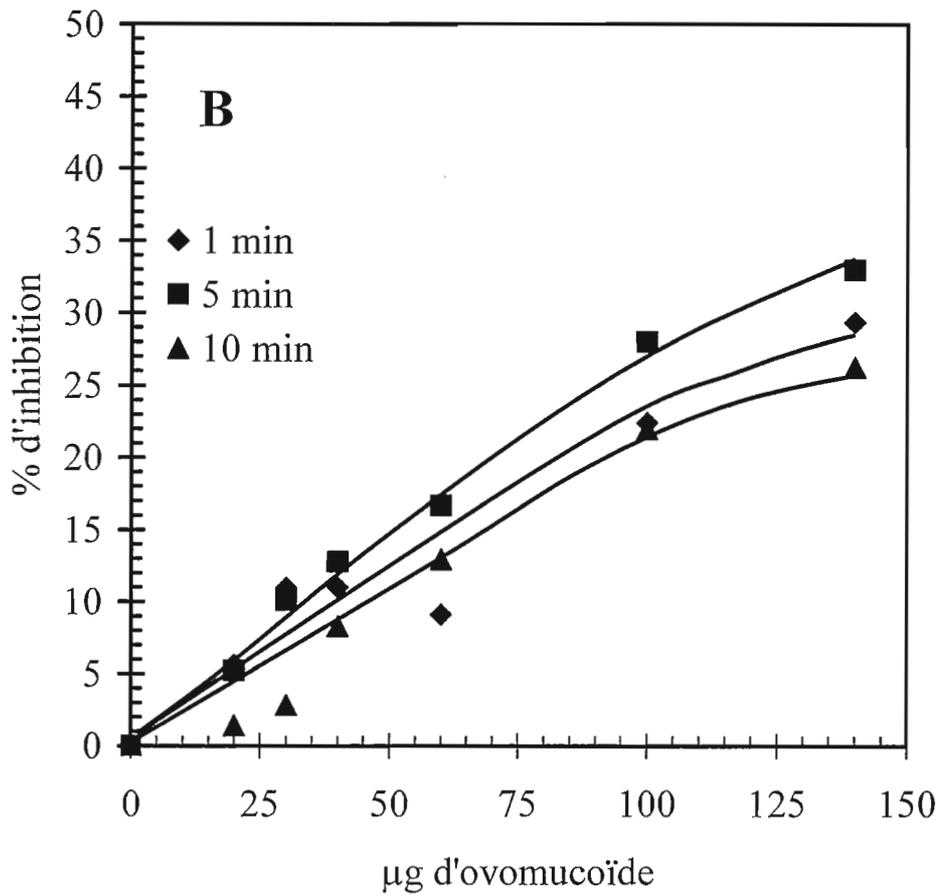
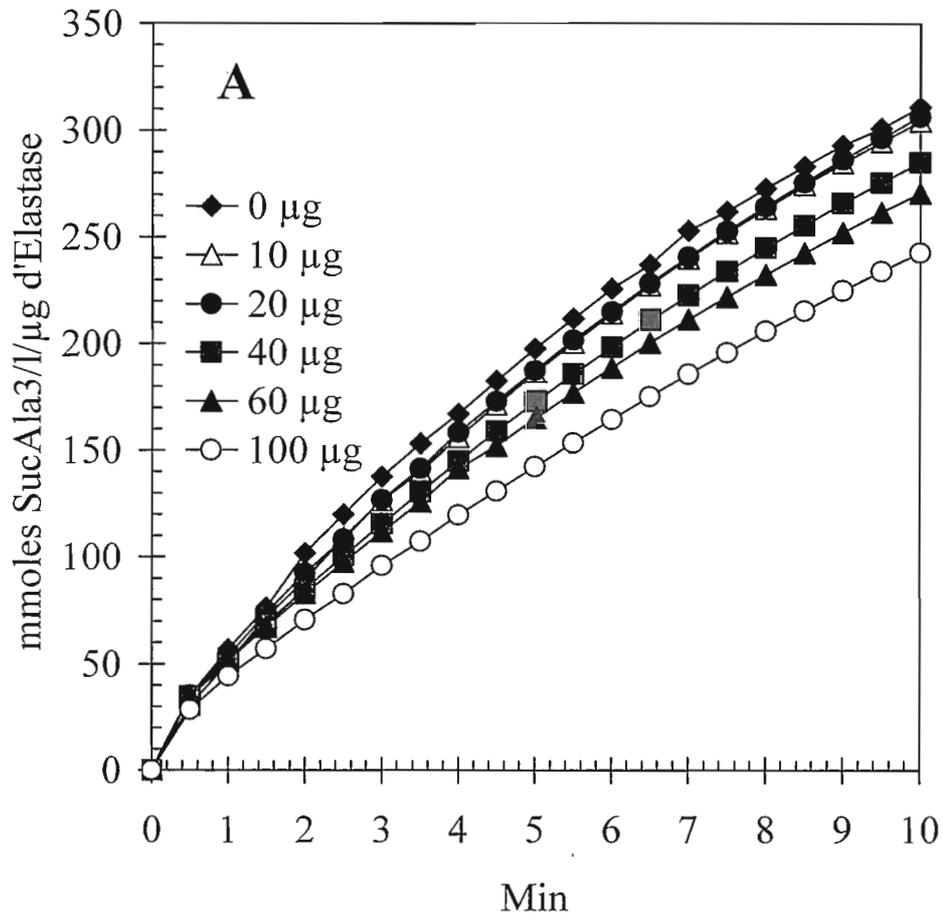
## Trypsine Bovine 1,5 µg



# Trypsine Humaine 2,5 µg



# Elastase Porcine 20 $\mu\text{g}$



# Elastase Humaine 20 $\mu\text{g}$

