

Activité antivirale de protéines lactosériques modifiées

Jean-Marc CHOBERT¹, Mahmoud SITOHY^{1,2}, Sylviane BILLAUDEL³, Michèle DALGALARRONDO¹,
Thomas HAERTLE¹

¹ Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Biopolymères, Interactions, Assemblages ; équipe Fonctions et Interactions des Protéines Laitières, B.P. 71627, 44316 Nantes, Cedex 3, France. ² Université de Zagazig, Faculté d'Agriculture, Département de Biochimie, Zagazig, Egypte. ³ Université de Nantes, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Bactériologie-Virologie, 1 rue Gaston Veil, B.P. 53508, 44035 Nantes Cedex 1, France.

chobert@nantes.inra.fr, mzsitohy@hotmail.com, sylviane.billaudel@univ-nantes.fr, dalgalar@nantes.inra.fr, haertle@nantes.inra.fr

Résumé – L'estérification est une modification simple, peu chère et dépourvue de produits secondaires nocifs. En fonction de son intensité, elle produit des protéines/peptides chargés positivement de caractère polycationique, capables d'interagir avec des substances polyanioniques. Nous avons déjà mis en évidence les interactions entre des protéines du lactosérum bovin (bêta-lactoglobuline, alpha-lactalbumine) estérifiées et transformées en polycations et (i) les molécules polyanioniques d'ADN ou (ii) des particules virales de virus attaquant des Lactocoques utilisés dans les technologies laitières. Nous avons récemment montré que de telles protéines du lactosérum estérifiées inhibaient la réplication virale de virus tels Herpes simplex, le cytomégalovirus, le virus de la poliomyélite, le virus Coxsackie. Nous pouvons donc proposer un nouveau produit renforçant les stérilisations des surfaces dans les industries agro-alimentaires et biotechnologiques menacées par les infections virales. Un tel produit pourrait être incorporé dans les détergents utilisés pour le traitement des surfaces industrielles, hospitalières, domestiques et cutanées. Ceci pourrait servir comme l'un des éléments de défense de nos capacités de production agricole et de nos moyens humains contre des actes d'infections préméditées (agro-terrorisme et bio-terrorisme) et contre des infections accidentelles.

Abstract – Esterification is a simple and cheap reaction without production of harmful secondary products. Depending on its extent, it produces proteins/peptides positively charged with a polycationic character, able to interact with polyanionic substances. Interactions between esterified milk whey proteins (beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin) transformed in polycations and (i) polyanionic molecules of DNA or (2) virus directed against Lactocoques used in dairy industry have been demonstrated previously. Recently, we have shown that such modified whey proteins can inhibit the replication of several virus such as Herpes simplex virus, cytomegalovirus, poliovirus, or Coxsackie virus. Hence, we can propose a new product enhancing surface sterilisation in food and bio-technologic industries susceptible to viral infections. Such a product should be incorporated in detergents used in the surface treatment in industry, hospitals, household and cutaneous. It should be used as one of the elements of defence of agro-production and human means against deliberate infections (agro-terrorism, bio-terrorism) and against accidental infections.

1. Introduction

La protection des hommes et des animaux contre des infections virales représente un enjeu important pour la santé publique et pour la protection de nos ressources alimentaires et humaines contre les effets néfastes des épidémies accidentelles ou déclenchées d'une façon préméditée (agro-terrorisme et bio-terrorisme). Les moyens de protection actuels sont d'une efficacité limitée et d'un coût important.

Les propriétés biologiques des composants du lait ne se limitent pas à leur rôle nutritionnel [1]. L'inactivation d'arbovirus, de rhinovirus et des virus influenza par des protéines du lait humain ou de vache a été démontrée [2]. Les charges électrostatiques et en particulier la charge

électrostatique nette d'une protéine antivirale joue un rôle crucial dans une telle inactivation [3]. Les substitutions chimiques des chaînes latérales des acides aminés polaires modifient les charges des protéines laitières, ce qui peut augmenter leurs propriétés antivirales [4]. La distribution de domaines chargés positivement et négativement le long de la molécule de lactoferrine semble être un facteur important pour son activité anti-virus d'immunodéficience humain et anti-cytomégalovirus humain [5].

Les protéines du lait sont dotées de charges positives après leur estérification par du méthanol ou de l'éthanol. Cela les rend capables d'interagir avec des macromolécules chargées négativement tels les acides nucléiques ou les protéines [6]. Par conséquent, ces protéines basifiées

interagissent avec les ADN ou ARN viraux. L'estérification non seulement augmente la charge positive nette de la protéine mais aussi son hydrophobie en greffant des groupes méthyle et éthyle hydrophobes sur les groupes carboxyles des acides aspartiques et glutamiques. Cette hydrophobie accrue peut également augmenter les interactions hydrophobes avec les sites de liaison hydrophobes formés par les protéines de la capsid virale.

Dans cette étude, les protéines du lactosérum estérifiées, présentant des propriétés cationiques et amphiphiles modifiées, ont été testées comme agents actifs potentiellement capables d'interférer sur le cycle de multiplication d'enterovirus (poliovirus de type 1, virus Cocksackie B6) connus pour être résistants aux processus d'inactivation/désinfection. Leur activité a également été testée contre le virus herpes et comparée à celles de l'acyclovir et d'un polycation (la L-polylysine).

2. Matériels et méthodes

2.1 Matériels

La bêta-lactoglobuline (BLG, Armor Protéines, Saint-Brice-en-Coglès, France) a été purifiée selon la méthode de Mailliart et Ribadeau Dumas [7]. L'alpha-lactalbumine (ALA, Armor Protéines) a été purifiée par chromatographie d'échange d'anions sur une colonne de DEAE-Sepharose Fast Flow. Les cellules Vero ATCC CCL81 (African green monkey kidney cells) étaient cultivées sur milieu Eagle's minimum essential medium (MEM, Eurobio, Courtabœuf, France) contenant 8% de sérum de fœtus de veau (FCS, Eurobio) et 1% de PCS (pénicilline 10000 U, colimycine 25000 U, streptomycine 10 mg). Les stocks de poliovirus type 1, souche Sabin et de virus Cocksackie B6 provenaient du Laboratoire de Référence des Enterovirus, Centre Hospitalo-Universitaire (Lyon, France). Le virus herpes simplex (HSV)-1, souche 17 provenait du Laboratoire de Virologie de Nantes (France).

2.2 Estérification

L'estérification des protéines du lactosérum a été réalisée selon des conditions précédemment décrites [8].

2.3 Activité anti-HSV-1, anti-Cocksackie et anti-poliovirus des protéines laitières estérifiées

Des fractions aliquotes de concentrations variées en protéines du lactosérum estérifiées, diluées dans du milieu MEM contenant 8% de FCS ont été ajoutées à des plaques de 96 puits contenant 50 µL de cellules Vero en suspension (10⁵ cellules/mL). Pour tester l'activité anti-HSV-1, 50 µL de suspension de virus ont été ajoutés aux cellules à une dose équivalente à 50 et 100% d'effet cytopathique (CPE), équivalent à une multiplicité d'infection (MOI) de l'ordre de 0,1 à 1,0 MOI/cellule, en présence de différentes concentrations de protéines du lactosérum estérifiées. L'activité antivirale de l'ALA et de la BLG a également été testée contre le poliovirus et le virus Cocksackie (0,01-1,00 MOI/cellule). Des mono couches cellulaires (50 000 cellules/puits) étaient préparées en incubant environ 30 000

cellules Vero/puits dans des micro plaques de 96 puits pendant 48 h à 37°C en présence de 5% de CO₂. Après élimination du milieu, les puits étaient rincés par 200 µL de MEM, 0% FCS, 1% PCS. 100 µL de chaque protéine estérifiée (6,25-100 µg/mL) étaient ajoutés aux puits sauf pour les contrôles viraux et cellulaires. 100 µL de suspension de virus étaient ajoutés (MOI de 0,01, 0,1 et 1,0) sauf pour les contrôles cellulaires et protéiques. Les contrôles cellulaires recevaient un volume équivalent de MEM, 8% FCS, 1% PCS (200 µL) sans autre addition. Toutes les micro plaques étaient incubées à 37°C en présence de 5% de CO₂ pendant 1, 2 ou 3 jours.

A la fin de la période d'incubation, l'activité antivirale était suivie en évaluant la viabilité des cellules par la méthode du rouge neutre [9]. La DO était directement proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Le pourcentage d'activité antivirale était calculé de la manière suivante :

Activité antivirale (%) = $[(OD_s - OD_v) / (OD_c - OD_v)] \times 100$
où OD_s est la densité optique des cellules infectées par le virus et protégées par les protéines estérifiées, OD_v est la densité optique des cellules infectées par le virus, OD_c est la densité optique des cellules contrôles (non infectées par le virus mais traitées par les protéines estérifiées).

Pour tester la toxicité, 50 µL de MEM contenant 8% de FCS ont été ajoutés aux puits ne contenant pas de virus, en présence de différentes concentrations de protéines. Des contrôles cellulaires et viraux étaient réalisés en parallèle. La cytotoxicité des substances testées était calculée en comparant la viabilité des cellules croissant en présence des protéines estérifiées à celle des cellules contrôles (en leur absence), de la manière suivante :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = [(OD_c - OD_s) / (OD_c)] \times 100$$

Le sel de sodium de l'acyclovir (ACV) était utilisé comme référence.

2.4 Influence du taux d'estérification de la BLG

L'influence du taux d'estérification sur les activités antivirales et d'anti-réplication a été mesurée par l'utilisation de BLG méthylée à 100% (100% Met-BLG) et de BLG éthylée à 70% (70% Et-BLG) en comparaison avec la protéine native. Chaque protéine testée a été ajoutée à différentes concentrations (6,25-100 µg/mL) aux cellules Vero infectées par le virus Cocksackie (1 MOI) et incubées 24 h à 37°C en présence de 5% de CO₂. Les cellules viables étaient révélées et l'ARN viral était mesuré dans le surnageant.

2.5 Influence du temps d'addition de la BLG estérifiée

La BLG estérifiée était ajoutée aux cellules Vero infectées à différents temps (0, 30, 60, 90 et 120 min) après l'infection des cellules Vero par 0,1 ou 1 MOI de virus Cocksackie B6. L'activité antivirale était déterminée après 2 jours (pour 0,1 MOI) ou 1 jour (pour 1 MOI) en mesurant le nombre de cellules viables, comme décrit précédemment. L'ARN viral était déterminé dans le surnageant.

2.6 Croissance virale

Après infection à 1 MOI de cellules Vero fixées, en absence et en présence de différentes concentrations de Met-BLG (25, 50 et 100 µg/mL), la croissance virale était mesurée par PCR en temps réel. Des fractions aliquotes étaient retirées de chaque puits après 0, 6, 12, 24 et 36 h d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂.

3. Résultats et discussion

3.1 Taux d'estérification

La BLG et l'ALA (5%, p/p) ont été estérifiées par l'éthanol et le méthanol (>99,5%) avec un rapport molaire acide/groupe carboxyle de 60, à 4°C, pendant respectivement 10 et 6 h. Le taux d'estérification de la BLG par le méthanol (100%) était significativement plus élevé que celui obtenu avec l'éthanol (73%). Ceci démontre la plus grande réactivité du méthanol. Après 6 h de réaction, le taux d'estérification de l'ALA ne dépassait pas 60%.

3.2 Activité antivirale envers HSV-1

Les résultats présentés Fig. 1 montrent l'activité anti-herpétique de 60% Met-ALA (Fig. 1A) et de son hydrolysats pepsique obtenu après 10 h d'hydrolyse (Fig. 1B) envers une souche d'HSV-1 sensible à l'ACV inoculée à des cellules Vero (50 et 100% CPE). Pour les deux échantillons l'activité est plus importante quand les quantités de virus utilisées sont plus faibles (50% CPE). Une inhibition de 50% (IC₅₀) était obtenue avec environ 20 µg/mL. Un échantillon de 100% Met-BLG (Fig. 1C) et de son hydrolysats pepsique (Fig. 1D) donnaient des résultats comparables avec des IC₅₀ respectives de 95 et 85 µg/mL.

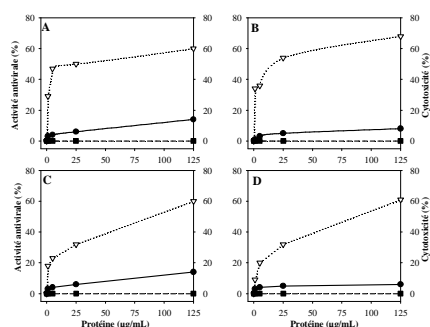


Figure 1 : Activité antivirale de 60% Met-ALA (A) et de son hydrolysats pepsique (B), 100% Met-BLG (C) et de son hydrolysats pepsique (D) contre HSV-1 [(●) 100% CPE, (▽) 50% CPE] inoculé à des cellules Vero, après 72 h d'incubation à 37°C. (■): cytotoxicité.

La plus grande activité antivirale observée avec 60% Met-ALA, en dépit de son plus faible taux d'estérification par rapport à 100% Met-BLG, peut être due à des différences dans leurs propriétés moléculaires. Les activités antivirales des protéines du lactosérum estérifiées sont principalement dues à l'augmentation de charges positives résultant de l'estérification. Ces charges positives peuvent induire des propriétés de liaison à l'ADN [10] modifiant les interactions ADN viral-protéine ou les interactions protéine virale-protéine cellulaire, affectant ainsi l'infection virale ou la réplication. Aucune des protéines natives ne présentait d'activité anti-HSV-1, confirmant le rôle joué par l'estérification et par là, de l'augmentation résultante des charges positives dans l'activité antivirale des protéines lactosériques modifiées. Dans le domaine de concentration utilisé (0-125 µg/mL), aucune toxicité cellulaire n'était observée.

Les résultats présentés Fig. 2 montrent l'activité antivirale de L-polylysines (4-15 kDa), polypeptides fortement basiques, et de l'ACV envers des cellules Vero infectées par une souche d'HSV-1 sensible à l'ACV. Les deux substances montrent une activité similaire contre les deux concentrations de virus utilisées (50 et 100% CPE)

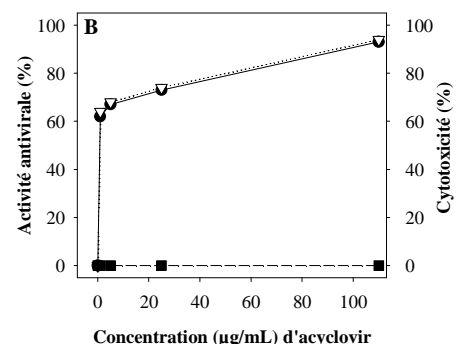
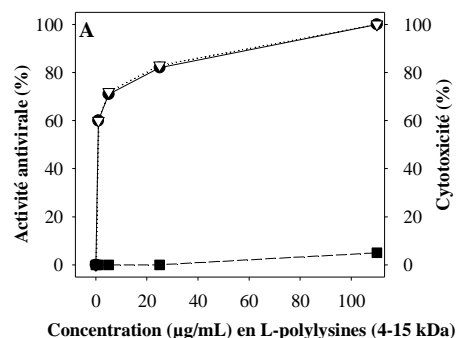


Figure 2 : Activité antivirale de (A) L-polylysines (4-15 kDa) et (B) d'acyclovir contre une souche de HSV-1 sensible à l'ACV [(●) 100% CPE, (▽) 50% CPE] inoculée à des cellules Vero, après 72 h d'incubation à 37°C. (■): cytotoxicité.

avec une IC_{50} de 0,8 $\mu\text{g/mL}$. La forte activité antivirale des L-polylysines envers les fortes concentrations de virus (100% CPE) est due à leur basicité extrêmement élevée, c'est à dire à la teneur élevée en charges positives mises en jeu dans les interactions avec l'ADN ou les protéines virales. Un mécanisme semblable peut être mis en jeu dans l'activité antivirale des protéines lactosériques estérifiées. Plus la charge de la protéine est élevée, plus son activité antivirale sera élevée.

L'entrée de HSV-1 dans la cellule hôte intervient à travers la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmatique, ce qui met en jeu de nombreuses interactions entre plusieurs protéines virales et cellulaires. La présence de protéines estérifiées au site d'interactions peut les inhiber, limitant ainsi l'entrée du virus.

Les charges positives et les groupes hydrophobes présents sur les protéines estérifiées peuvent également intervenir dans des interactions entre les protéines estérifiées et des glycoprotéines mises en jeu dans l'infection virale.

3.3 Effet anti-réplication

Après 3 jours de croissance de cellules Vero infectées par deux concentrations d'HSV-1 (50 et 100% CPE) en absence et en présence de différentes concentrations de 60% Met-ALA, la répllication virale a été mesurée par RT-PCR. La Fig. 3 montre que le nombre de cycles de PCR permettant la détection d'ADN viral amplifié augmente avec l'augmentation de la concentration en 60% Met-ALA.

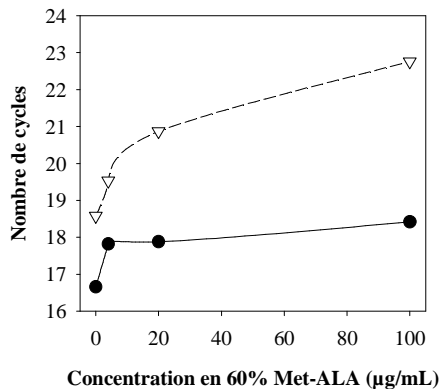


Figure 3 : Activité inhibitrice de 60% Met-ALA sur la répllication de HSV-1 [(●) 100% CPE, (▽) 50% CPE] inoculé à des cellules Vero, après 72 h d'incubation à 37°C, détectée par RT-PCR.

Ceci démontre que la quantité d'ADN viral a été réduite, puisque le nombre de cycles est inversement proportionnel à la quantité d'ADN de départ servant de patron. Ainsi, l'étendue de l'inhibition de la répllication est directement reliée à la concentration en 60% Met-ALA. L'effet protecteur des protéines estérifiées envers les cellules Vero provient bien de leur action anti-répllication envers HSV-1. Cette action des protéines estérifiées envers la répllication

virale peut intervenir via une modification des interactions protéine-protéine ou ADN-protéine. Les interactions protéine-protéine sont impliquées dans le fonctionnement de l'ADN polymérase à travers des interactions hydrophobes cruciales pour la répllication virale [11]. Leur rupture peut diminuer ou stopper la répllication. Les charges positives condensées ou les groupes esters hydrophobes répartis sur les molécules de protéines estérifiées les empêchent d'interagir avec un ou plusieurs composants protéiques, en interrompant les liaisons hydrogène.

3.4 Activité antivirale des L-polylysines et de l'ACV envers une souche HSV-1 résistante à l'ACV

La Fig. 4 montre l'activité antivirale des L-polylysines et de l'ACV envers des suspensions de cellules Vero ou des cellules Vero fixées, inoculées par HSV-1 ACV résistant. Les L-polylysines sont plus efficaces que l'ACV pour inhiber la souche d'HSV-1 ACV résistante. L' IC_{50} était de 0,9 $\mu\text{g/mL}$ pour les L-polylysines pour les deux concentrations de virus utilisées, alors qu'elle était de

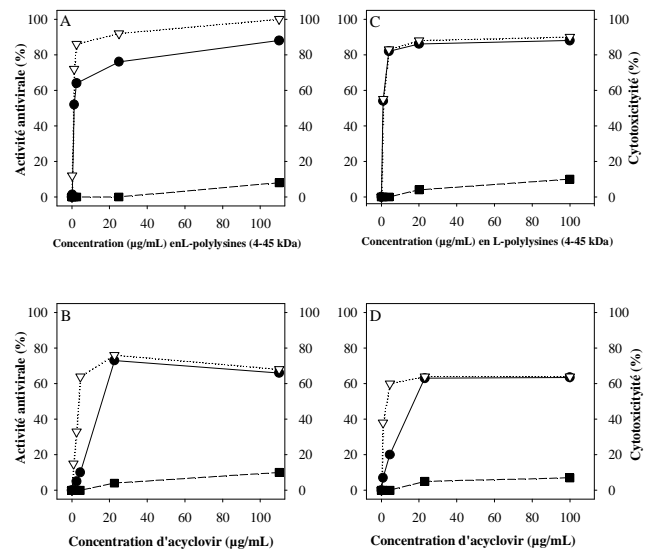


Figure 4 : Activité antivirale de (A et C) L-polylysines (4-15 kDa) et de (B et D) acyclovir envers une souche HSV-1 résistante à l'ACV [(●) 100% CPE, (▽) 50% CPE] inoculée dans des cellules Vero en suspension (A et B) ou fixées (C et D), après 72 h d'incubation à 37°C. (■): cytotoxicité.

respectivement 3,3 et 15 $\mu\text{g/mL}$ pour l'ACV, en fonction de la concentration de virus utilisée. Comme attendu, le faible effet inhibiteur de l'ACV est dû à la résistance de la souche utilisée. Il a été établi que HSV produit des mutations dans les gènes codant la thymidine kinase ou des mutations de l'ADN polymérase [12]. L'ACV, analogue de la guanine, requiert la thymidine kinase virale pour sa

phosphorylation, alors que l'ACV triphosphate inhibe l'ADN polymérase virale [13]. Par conséquent, un manque d'activité de cette thymidine kinase rend l'ACV inactive envers l'ADN polymérase virale. La plus grande efficacité des L-polylysines par rapport à l'ACV est spécialement évidente quand on utilise une faible concentration en protéines lactosériques estérifiées (0-20 µg/mL). De plus, l'activité antivirale maximale de l'ACV était clairement plus basse que celle des L-polylysines quand on utilisait les deux formes de lignées cellulaires. L'activité antivirale de l'ACV n'était jamais supérieure à 65%, alors que celle des L-polylysines était de l'ordre de 90%.

3.5 Activité antivirale des protéines du lactosérum estérifiées envers une souche d'HSV-1 résistante à l'ACV

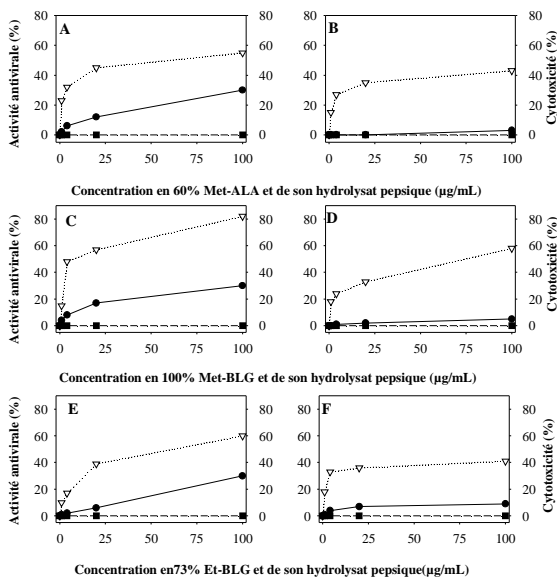


Figure 5 : Activité antivirale de (A) 60% Met-ALA et (B) de son hydrolysate pepsique, (C) 100% Met-BLG et (D) son hydrolysate pepsique, (E) 73% Et-BLG et (F) son hydrolysate pepsique contre une souche d'HSV-1 résistante à l'ACV [(●) 100% CPE, (▽) 50% CPE] inoculée à des cellules fixées, après 72 h d'incubation à 37°C. (■): cytotoxicité.

Les résultats présentés Fig. 5 montrent que 60% Met-ALA (Fig. 5A) et son hydrolysate pepsique (Fig. 5B) sont tous les deux actifs envers une souche d'HSV-1 ACV

résistante avec une IC₅₀ de 58 µg/mL pour 60% Met-ALA en utilisant 50% CPE. Cette activité antivirale est légèrement inférieure à celle observée pour la souche d'HSV-1 sensible à l'ACV (IC₅₀ de 20 µg/mL). L'efficacité de 60% Met-ALA envers les souches d'HSV-1 sensible et résistante à l'ACV indique que l'activité antivirale de l'ALA estérifiée fonctionne à travers des voies qui diffèrent de celles utilisées par les drogues à base de guanine. Le même phénomène a été observé avec 100% Met-BLG et 73% Et-BLG, et leurs hydrolysats pepsiques (Fig. 5 C, D et 5 E, F). Les IC₅₀ étaient respectivement de 8 et 75 µg/mL pour 100% Met-BLG et son hydrolysate pepsique, et de 62 µg/mL pour 73% Et-BLG, en utilisant 50% CPE. Comme observé avec 60% Met-ALA, l'IC₅₀ n'était pas mesurable avec l'hydrolysate pepsique de 73% Et-BLG.

La différence observée dans les activités antivirales des deux formes estérifiées de la BLG est apparemment due à leur taux d'estérification différent et par conséquent, à la quantité de charges positives présentes sur les molécules modifiées. L'activité antivirale des protéines lactosériques estérifiées envers la souche d'HSV-1 résistante à l'ACV est inférieure à celle observée avec les L-polylysines à cause de la grande différence de densité de charges positives.

L'utilisation de protéines extrinsèques modifiées pour contrecarrer l'action des virus peut s'avérer utile puisque les virus ont adopté des stratégies pour échapper aux effets inhibiteurs des protéines naturelles antivirales (interféron), en plus des mutants résistants à l'ACV.

3.6 Influence de la concentration en protéines lactosériques estérifiées sur la survie des cellules Vero après infection par le poliovirus de type 1 ou le virus Coxsackie B6

La Fig. 6A montre l'activité antivirale de 100% Met-BLG et de 68% Met-ALA envers les cellules Vero infectées par 1 MOI de poliovirus de type 1, après 48 h d'incubation. L'IC₅₀ moyenne est de 20 µg/mL. Aucun signe de cytotoxicité n'était observé. Les formes non modifiées d'ALA et de BLG ne présentaient aucune activité antivirale. La Fig. 6B montre l'activité antivirale de 100% Met-BLG envers les cellules Vero infectées par 0,01, 0,1 et 1 MOI de virus Coxsackie, après respectivement 3, 2 et 1 jour(s) d'incubation. Dans chaque cas, l'activité antivirale de la Met-BLG dépendait de sa concentration.

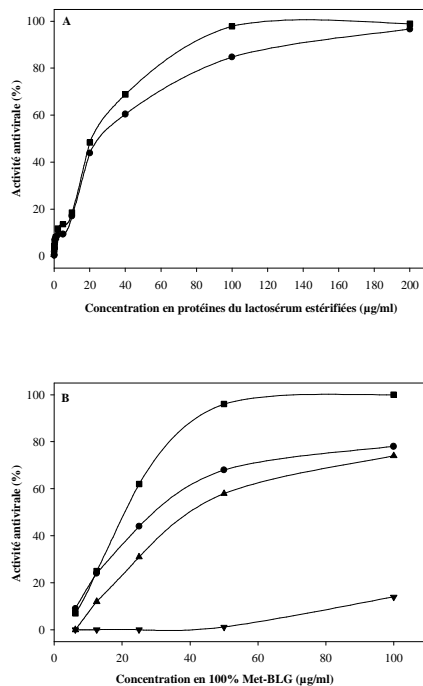


Figure 6 : Influence de la concentration en protéines du lactosérum estérifiées sur leur activité antivirale. (A): activité de 68% Met-ALA (●) et 100% Met-BLG (■) contre le poliovirus de type 1 (1.0 MOI) inoculé dans des cellules Vero, après 48 h d'incubation à 37°C. (B): activité de 100% Met-BLG contre le virus Coxsackie B6 après incubation à 37°C en présence de 5% CO₂ pendant 24 h (■: 1.0 MOI), 48 h (●: 0.1 MOI; ▼: 1.0 MOI), et 72 h (▲: 0.01 MOI).

L'augmentation de la charge virale jusqu'à 1 MOI accélérât l'infection. L'activité antivirale maximale envers le virus Coxsackie B6 était induite par environ 80 μg/mL de Met-BLG après 24 h d'incubation. Cette activité est supérieure à celle observée en présence de 0,1 et 0,01 MOI après respectivement 48 h et 72 h d'incubation. Parallèlement, l'IC₅₀ de Met-BLG changeait en fonction de la MOI appliquée et du temps d'incubation, atteignant 20 μg/mL en présence de 1 MOI et 40 μg/mL en présence de 0,01 MOI après respectivement 24 h et 72 h d'incubation. L'activité antivirale maximale décroissait de façon significative quand on prolongeait l'incubation jusqu'à 48 h. Cette chute d'activité inhibitrice envers le virus Coxsackie en fonction du temps peut être due à la consommation de Met-BLG par les protéases extra et intra cellulaires (si Met-BLG pénètre les cellules Vero). La diminution de la quantité de molécules actives de Met-BLG permettrait alors au virus d'échapper à leur action antivirale et de pénétrer dans les cellules Vero afin d'achever ses activités de réplication et cytotolytiques.

La présence de concentrations croissantes de BLG estérifiée diminuait considérablement la quantité d'ARN génomique sans l'éliminer totalement. Cet effet était maximum en présence de 50 μg/mL de Met-BLG (résultats

non montrés). Les différences maximales de quantités d'ARN génomique en absence et en présence de Met-BLG étaient observées durant une période de 24-36 h, correspondant à la période de plus forte activité virale. La présence de Met-BLG et son contact avec le virus inhibait la multiplication virale.

3.7 Effet du temps d'addition de la BLG estérifiée

La Met-BLG était ajoutée à une concentration de 20 et 40 μg/mL à des cellules Vero infectées par le poliovirus de type 1 (0,5 et 1 MOI) et à une concentration de 25, 50 et 100 μg/mL à des cellules Vero infectées par le virus Coxsackie B6 (0,1 et 1 MOI) à différents temps (0-120 min) après l'infection. Les plaques 96 puits étaient alors incubées pendant 16 h dans le cas du poliovirus de type 1, et pendant 24 et 48 h dans le cas du virus Coxsackie B6 (pour respectivement 1 et 0,1 MOI).

En ce qui concerne l'infection par le virus Coxsackie (Fig. 7), l'activité antivirale maximale de la Met-BLG était observée lors d'une addition simultanée du virus et de la Met-BLG, dès le début de l'infection des cellules Vero. Retarder l'addition de la Met-BLG conduisait à une diminution de son activité antivirale.

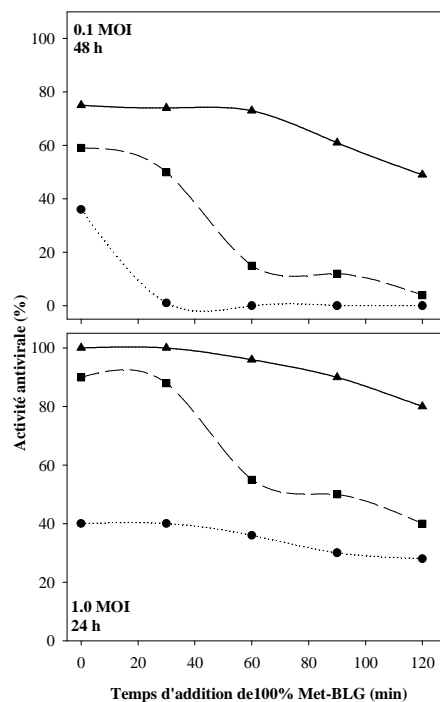


Figure 7 : Influence du temps d'addition de 100% Met-BLG [25 (●), 50 (■) et 100 (▲) μg/mL] sur son activité antivirale envers les cellules Vero infectées par le virus Coxsackie B6 après 48 h (0.1 MOI) et 24 h (1.0 MOI) d'incubation à 37°C en présence de 5% CO₂.

La comparaison de l'activité antivirale de la Met-BLG obtenue avec différentes concentrations en protéine estérifiée (25, 50 et 100 μg/mL) montre que la

concentration la plus élevée était la plus efficace, même après une addition retardée. La plus forte activité antivirale de la Met-BLG utilisée à la plus forte concentration (100 µg/mL) envers la plus grande MOI testée (1,0) n'était observée que pendant 30 min. Cela indique que l'activité antivirale dépend à la fois de la quantité relative de Met-BLG et du titre infectieux au moment de l'interaction. La chute d'activité antivirale observée pour de faibles concentrations de Met-BLG ajoutée tard après le début de l'infection est probablement due à son hydrolyse ou à son impossibilité de traverser la membrane cellulaire et d'interagir avec l'ARN viral à l'intérieur des cellules Vero.

En ce qui concerne les cellules Vero infectées par le poliovirus de type 1, l'activité antivirale maximale de la Met-BLG était observée quand la protéine était ajoutée avec le virus (Fig. 8). Retarder l'addition de Met-BLG diminuait son activité antivirale sans pour autant la supprimer. Ceci pouvait être compensé par l'addition d'une plus grande concentration de Met-BLG (40 µg/mL). Même après une addition retardée de 2 h après l'infection, la Met-BLG présentait encore 63% de son activité antivirale. Ceci peut indiquer que les mécanismes d'action de la Met-BLG ne sont pas seulement limités à l'inhibition de la pénétration virale mais peuvent aussi être mis en jeu durant la multiplication virale. L'ARN viral, une fois pénétré dans la cellule hôte peut échapper à l'inhibition par la Met-BLG et se propager. Ceci était particulièrement évident quand la concentration de Met-BLG était suffisamment élevée (40 µg/mL) et la MOI moyenne (0,5) quand les cellules étaient infectées après 16 h (2 cycles de réplication). Il est donc recommandé d'ajouter fréquemment de la Met-BLG au système cellulaire infecté.

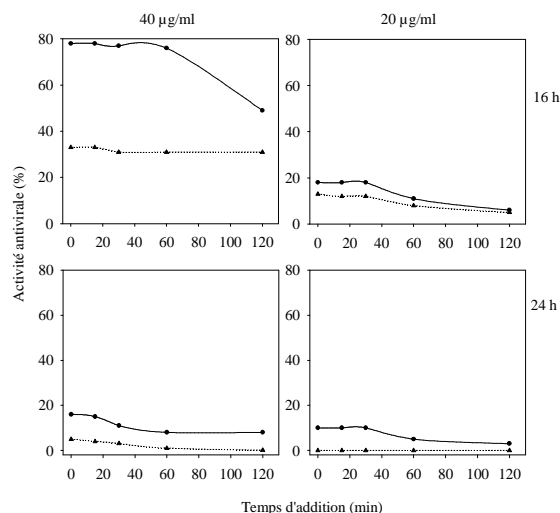


Figure 8 : Influence du temps d'addition de 100% Met-BLG (20 ou 40 µg/mL) sur son activité antivirale envers le poliovirus de type 1 [0.5 (●) ou 1.0 (▲) MOI]. Les mesures étaient réalisées après 16 h d'incubation à 37°C en présence de 5% CO₂.

La quantité relative d'ARN viral répliqué après 16 h d'incubation dans des cellules Vero infectées par le poliovirus de type 1 en présence de Met-BLG ajoutée à différents temps après l'infection diminuait de manière significative quand la protéine estérifiée était ajoutée dans les 30 min après l'infection (Fig. 9). L'addition de Met-BLG 1 à 2 h après l'infection ne réduisait pas significativement la quantité relative d'ARN. Bien que ce résultat n'explique pas la réduction significative de l'activité antivirale observée après de tels intervalles de temps, on peut supposer que la quantité relative d'ARN viral observée peut correspondre à la quantité totale d'ARN mais pas nécessairement à la quantité d'ARN libre, actif et fonctionnel. Alors, la grande proportion d'ARN détectée peut être inactive à cause de son interaction avec la Met-BLG, après la réplication. Certains virus peuvent avoir échappé à l'interaction avec la Met-BLG durant la multiplication à cause du délai dans l'addition de la Met-BLG mais il apparaît qu'une grande partie des molécules virales nouvellement synthétisées soit inactivée par la Met-BLG.

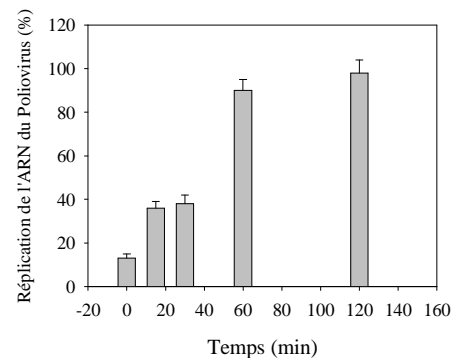


Figure 9 : Quantité relative d'ARN répliqué dans le poliovirus de type 1 (0.5 MOI) en présence de 100% Met-BLG (40 µg/mL) ajouté à différents temps après l'infection de cellules Vero. Les mesures étaient réalisées après 16 h d'incubation à 37°C en présence de 5% CO₂.

4. Conclusions

L'étendue de l'inhibition du virus herpes, du poliovirus et du virus Coxsackie est liée au degré de cationisation des protéines du lactosérum estérifiées ainsi qu'à la taille du squelette peptidique des protéines. Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec ceux obtenus durant les études de l'action antivirale d'autres protéines cationiques.

Dans cette étude préliminaire, le mécanisme d'activité antivirale des protéines du lactosérum estérifiées peut être dû aux facteurs suivants :

- 1- Liaison saturante à l'ARN viral par des interactions de nature coulombienne, inhibant la réplication et la transcription du virus ;
- 2- Interactions hydrophobes avec les protéines de la capsid virale ;
- 3- Perturbation des interactions ARN viral-protéines conduisant à une inhibition de la traduction des protéines virales ;
- 4- Interférence avec les sites d'entrée viraux localisés sur les membranes cellulaires.

Cependant, quelque soit l'effet qui prévaut, les protéines du lactosérum estérifiées peuvent présenter des avantages par rapport aux autres protéines cationiques décrites par d'autres auteurs : elles sont disponibles en grandes quantités et la simplicité de leur modification les favorise comme agents antiviraux efficaces et bon marché qui pourraient être utilisés avec succès pour la désinfection de surfaces solides et de liquides. Leur sensibilité aux protéases peut être un grand avantage leur permettant d'être rapidement recyclées dans l'environnement [14].

Références

- [1] Pan, Y., Lee, A., Wan, J., Coventry, M.J., Michalski, W.P., Shiell, B. & Roginski, H. (2006). Antiviral properties of milk proteins and peptides. *International Dairy Journal*, 16, 1252-1261.
- [2] Matthews, T.H.J., Nair, C.D.G., Lawrence, M.K. & Tyrrel, D.A.J. (1976). Antiviral activity in milk and possible clinical importance. *Lancet*, 308, 1387-1389.
- [3] McCann, K.B., Lee, A., Wan, J., Roginski, H. & Coventry, M.J. (2003). The effect of bovine lactoferrin and lactoferricin B on the ability of feline calicivirus (a norovirus surrogate) and poliovirus to infect cell cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 1026-1033.
- [4] Waarts, B., Aneke, O.J.C., Smit, J.M., Kimata, K., Bittman, R., Meijer, D.K.F. & Wilschut, J. (2005). Antiviral activity of human lactoferrin: inhibition of alphavirus interaction with heparin sulfate. *Virology*, 333, 284-292.
- [5] Swart, P.J., Kuipers, M.E., Smit, C., Van der Strate, B.W.A., Harmsen, M.C. & Meijer, D.K.F. (1998). Lactoferrin: Antiviral activity of lactoferrin. In: G. Spik, D. Legrand, J. Mazurier, A. Pierce, J.P. Perraudin (Eds.), *Advances in lactoferrin research* (pp. 205-213). New York: Plenum Press.
- [6] Sitohy, M., Chobert, J.-M., Gaudin, J.-C. & Haertlé, T. (2002). When positively charged milk proteins can bind to DNA. *Journal of Food Biochemistry*, 26, 511-532.
- [7] Mailliart, P. & Ribadeau Dumas, B. (1988). Preparation of β -lactoglobulin and β -lactoglobulin-free proteins from whey retentate by NaCl salting out at low pH. *Journal of Food Sciences*, 53, 743-752.
- [8] Sitohy, M., Chobert, J.-M. & Haertlé, T. (2001). Simplified short-time method for the esterification of milk proteins. *Milchwissenschaft*, 56, 127-131.
- [9] Oliveira, J.C.R., Montes de Oca, H., Duarte, M.M., Diniz, C.R. & Fortes-Dias, C.L. (2002). Toxicity of South American snake venoms measured by an *in vitro* cell culture assay. *Toxicon*, 40, 321-325.
- [10] Sitohy, M., Chobert, J.-M., Gaudin, J.-C. & Haertlé, T. (2002). When positively charged milk proteins can bind to DNA. *Journal of Food Biochemistry*, 26, 511-532.
- [11] Saldanha, C.E., Lubinski, J., Martin, C., Nagashunmugam, T., Wang, L., van der Keyl, H., Tal-Singer, R. & Friedman, H.M. (2000). Herpes simplex virus type 1 glycoprotein E domains involved in virus spread and disease. *Journal of Virology*, 74, 6712-6719.
- [12] Gaudreau, A., Hill, E., Balfour, H.H., Erice, Jr.A. & Boivin, G. (1998). Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant herpes simplex viruses from immuno-compromised patients. *Journal of Infectious Diseases*, 178, 297-303.
- [13] O'Hare, P. (1993). The virion transactivator of herpes simplex virus. *Seminars in Virology*, 4, 145-155.
- [14] Chobert, J.-M. & Haertlé, T. (2003). Composition pour l'inactivation de particules virales et applications d'une telle composition. French patent # FR-03/06786.

Les figures présentées sont extraites des publications suivantes :

Sitohy, M., Billaudel, S., Haertlé, T. & Chobert, J.-M. (2007). Antiviral activity of esterified α -lactalbumin and β -lactoglobulin against herpes simplex virus type 1. Comparison with the effect of acyclovir and L-polylysines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (sous presse) DOI 10.1021/jf0724421.

Sitohy, M., Chobert, J.-M., Dalgalarondo, M. Nowoczin, M., Besse, B., Billaudel, S. & Haertlé, T. The effect of bovine whey proteins on the ability of poliovirus and Cocksackie virus to infect Vero cells cultures. *International Dairy Journal* (accepté).